

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

ESTUDOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS BRASILEIROS
COMO FONTE DE COMPOSTOS DE ALTO VALOR
AGREGADO: MÉTODOS VERDES PARA A EXTRAÇÃO DE
FLAVONOIDES DERIVADOS DE RESÍDUOS DE LARANJA

Luize Zola Ramin*

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

Orientador(a): Profa. Dra. Vânia Gomes Zuin

*** bolsista CAPES**

São Carlos - SP
2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Luíze Zola Ramin, realizada em 07/07/2017:

Prof. Dra. Vânia Gomes Zuin
UFSCar

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim
UFSCar

Prof. Dra. Maria Olimpia de Oliveira Rezende
IQSC/USP

À minha família,
por toda confiança e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À minha família: Lisete, Marcel e Alessandra por terem me apoiado, incentivado e vivido junto comigo essa etapa da minha vida. O amor de vocês é a maior fonte de energia para que eu siga adiante com os meus sonhos.

Ao meu pai Cornélio, em memória, que conseguiu me mostrar em apenas 13 anos os valores que considero essenciais à vida. Ele foi meu maior exemplo de que devemos lutar e persistir para alcançar nossos objetivos.

Aos meus cunhados, Pedro Ivo e Juliana, que completaram a família da forma mais doce e sempre me apoiam nos momentos de necessidade.

À Profa. Dra. Vânia Gomes Zuin, pela orientação, ensinamentos, credibilidade, paciência e incentivo. Seu apoio foi essencial para que esse trabalho fosse desenvolvido e concluído.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de Produtos Naturais. Em especial agradeço a Clara, Bárbara, Luis, Marília, Marina e Alana, que estiveram sempre presentes em todos os momentos, comemorando os sucessos e apoiando nos obstáculos.

Aos meus colegas e amigos do Grupo de Estudo e Pesquisa em Química Verde, Sustentabilidade e Educação (GPQV) por todas as valiosas discussões e troca de conhecimento. Em especial agradeço a Danielle e Karine, que ao desenvolverem seus projetos de iniciação científica, puderam me auxiliar nessa pesquisa, e ao Higor e João, pelo carinho e amizade, mostrando-se sempre presentes em todos os momentos de necessidade.

Aos amigos do Departamento de Química, em especial ao Daniel, Rafaella e Bruno Amaral, que sempre se mostraram dispostos a ajudar nessa pesquisa, compartilhando conhecimentos e oferecendo suporte emocional e profissional.

Aos meus amigos Leyser, David, Mariana, Leonardo, Bárbara, Emmanuelle, Marianne, Rayta, Tiago, Débora, Ewerton, Géssica, Paula, Angélica e Isabela que mesmo estando em outras cidades, estiveram presentes nessa etapa da minha vida.

À Profa. Dra. Maria Olímpia de Oliveira Rezende e à Dra. Lucimar Lopes Fialho, pelas contribuições na banca avaliadora do seminário de qualificação desse projeto.

Ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho, pela paciência e disponibilidade na ajuda do tratamento de dados desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nobrega, por disponibilizar o seu espaço de trabalho e equipamentos para desenvolver parte dessa pesquisa.

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPESP e Newton Fund.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Os 12 princípios da química verde	8
TABELA 2. Variáveis avaliadas e níveis utilizados na otimização das condições de extração dos flavonoides de interesse derivados do resíduo de laranja por meio do método convencional com homogeneização por ultra-turrax.	24
TABELA 3. Planejamento proposto para a otimização da extração dos flavonoides selecionados por meio do método convencional com homogeneização por ultra-turrax.	24
TABELA 4. Planejamento proposto para otimização da extração dos flavonoides selecionados por meio do método de micro-ondas.	26
TABELA 5. Variáveis avaliadas e níveis utilizados na otimização das condições de extração dos flavonoides de interesse derivados do resíduo de laranja por meio do método de ultrassom.	27
TABELA 6. Planejamento proposto para otimização da extração dos flavonoides selecionados por meio do método de ultrassom.	28
TABELA 7. Variáveis avaliadas na otimização das condições cromatográficas por HPLC-UV para análises dos flavonoides selecionados, derivados do resíduo de laranja.	29
TABELA 8. Concentrações (mg/mL) referentes às soluções padrão e aos pontos utilizados para a construção de ambas as curvas de calibração (no extrato e em metanol) dos flavonoides analisados.	31
TABELA 9 – Condições cromatográficas otimizadas para a análise do extrato de resíduo de laranja por HPLC-UV.	34
TABELA 10. Tempo de retenção determinado para cada padrão de flavonoide de interesse.	35
TABELA 11. Avaliação das curvas de calibração preparadas no extrato de laranja e em metanol. Equações da reta para as curvas correspondentes a cada analito, bem como seus valores de coeficiente de determinação e a razão entre os coeficientes angulares para verificar se estão paralelas.	37
TABELA 12. Valores de desvio padrão para os coeficientes lineares e angulares e limites de quantificação e detecção (mg/mL) para os flavonoides analisados.	37
TABELA 13. Resultados obtidos para os experimentos do planejamento fatorial da extração dos flavonoides selecionados, derivados do resíduo de laranja, por meio do método convencional com homogeneização por ultra-turrax.	38
TABELA 14. Resultados obtidos para os experimentos do planejamento fatorial da extração dos flavonoides selecionados, derivados do resíduo de laranja, por meio do método do ultrassom.	43
TABELA 15. Comparação das concentrações dos flavonoides de interesse presentes no extrato do resíduo de laranja, de acordo com para cada metodologia avaliada.	46

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esqueleto básico da estrutura dos flavonoides.....	5
FIGURA 2. Estruturas das principais classes de flavonoides encontradas em citrus.....	5
FIGURA 3. Processo de extração sólido-líquido em um material vegetal (adaptado de MASON e VINATORU, 2017).....	11
FIGURA 4. Processo da cavitação, promovida pelas zonas de rarefação e compressão das ondas de ultrassom (adaptado de MASON e VINATORU, 2017).....	15
FIGURA 5. Fragmentação da amostra, causada pelas bolhas de cavitação. A e B representando o ciclo de rarefação e compressão, respectivamente. Seguido pelo colapso da microbolha (C), próximo do material vegetal. Conseqüentemente, ocorre a liberação de microjatos e ondas de choque que rompem a parede celular. Finalmente, o material intracelular é lançado na solução (D). (adaptado de ESCLAPEZ <i>et al.</i> , 2011).	16
FIGURA 6. Representação esquemática das etapas de uma análise por cromatografia (adaptado de DONG, 2006).	17
FIGURA 7. Cromatogramas referentes à separação do extrato do resíduo de laranja nas três composições de gradiente exploratório, ACN/MeOH (50/50%) v/v (vinho), ACN 100% (verde) e MeOH 100% (azul).	33
FIGURA 8. Cromatogramas referentes à separação do extrato do resíduo de laranja na vazão de 0,5 mL.min ⁻¹ (azul) e 1,0 mL.min ⁻¹ (verde)	34
FIGURA 9. Cromatograma da amostra de extrato do resíduo de laranja (azul) com a sobreposição dos padrões de hesperidina (verde), naringenina (rosa), hesperetina (vermelho) e nobiletina (amarelo), nas condições apresetadas na tabela 10.	35
FIGURA 10. Curvas de calibração construídas no extrato de resíduo de laranja (azul) e em metanol (vermelho) para hesperidina (A), naringenina (B), hesperetina (C) e nobiletina (D).	36
FIGURA 11. Gráfico de efeitos referente à extração convencional com homogeneização por ultra-turrax de hesperidina (A) e dos outros três flavonoides selecionados (B). As variáveis analisadas foram razão amostra/solvente (1), concentração de EtOH (2), tempo (3) e rotação (4).	39
FIGURA 12. Gráfico de efeitos referente à extração por ultrassom de hesperidina (A) e dos outros três flavonoides selecionados (B). As variáveis analisadas foram tempo (1) e concentração de EtOH (2).	44
FIGURA 13. Estrela Verde com áreas calculadas para a extração convencional com homogeneização por ultra-turrax (A), ultrassom (B) e micro-ondas (C).	49

RESUMO

ESTUDOS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS BRASILEIROS COMO FONTE DE COMPOSTOS DE ALTO VALOR AGREGADO: MÉTODOS VERDES PARA A EXTRAÇÃO DE FLAVONOIDES DERIVADOS DE RESÍDUOS DE LARANJA

Atualmente, verifica-se uma necessidade cada vez maior em se realizar estudos voltados ao aproveitamento de resíduos agroindustriais e florestais em todo o mundo. A indústria alimentícia global tem produzido uma enorme quantidade de resíduo, dentre eles os resíduos de citrus, que possuem elevado potencial de valor agregado, tais como açúcares solúveis, celulose, hemicelulose, pectina, *d*-limoneno, etanol e flavonoides. Diante deste contexto, o principal objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento de métodos verdes aplicados à extração e análise de compostos bioativos naturais, caso de flavonoides provenientes de matrizes como casca de citrus derivados do processamento convencional e alternativo (orgânico). O preparo de amostra foi realizado com base em técnicas verdes (extração assistida por micro-ondas e ultrassom, utilização de homogeneizador de amostra para melhor desempenho de extrações convencionais), e a determinação qualitativa e quantitativa por meio de técnicas cromatográficas acopladas a detector UV-Vis. A fim de entender o comportamento dos compostos bioativos dessa matriz foram estudados quatro flavonoides de interesse (hesperidina, naringenina, hesperetina e nobiletina). Os resultados indicam que esses compostos têm um comportamento semelhante frente às variáveis estudadas, como solvente extrator, temperatura, tempo, dentre outras, mas apresentam diferenças quando estas são aplicadas conjuntamente aos diferentes métodos.

ABSTRACT

STUDIES OF BRAZILIAN AGROINDUSTRIAL RESIDUES AS A SOURCE OF HIGH VALUE COMPOUNDS: GREEN METHODOLOGIES FOR FLAVONOID EXTRACTION FROM ORANGE WASTE

Currently, there is a need to increase the research aimed at the recovery of agro-industrial and forest residues worldwide. The food industry has produced an enormous amount of waste globally, among them the citrus waste that has a high potential to added value compounds, such as soluble sugars, cellulose and hemicellulose, pectin, *d*-limonene, ethanol and flavonoids. In this context, the aim of this project is to develop green methodologies applied to the extraction and analysis of natural bioactive compounds, such as flavonoids from orange waste derived of conventional and organic farming process. The sample preparation was carried out based on green techniques (microwave assisted extraction, ultrasound, conventional extraction with homogenizer aid), and a quantitative and qualitative determination through chromatography's techniques coupled to UV-Vis detector. In order to understand the behavior of the bioactive compounds of this matrix, four flavonoids (hesperidin, naringenin, hesperetin and nobiletin) were studied. The results showed that these compounds have a similar behavior to the variables tested, such as solvent extractor, temperature, time, among others, however they present differences when those are applied together in the different methods.

SUMÁRIO

1 - Introdução	1
1.1 - Plataformas de pesquisa baseadas em biomassa: de resíduo aos compostos de alto valor agregado	1
1.2 - Resíduos agroindustriais	2
1.2.1 - A importância do resíduo de citrus	3
1.3 - Flavonoides	4
1.4 - Química Verde	6
1.5 - O processo de extração de produtos bioativos	9
1.5.1 - Extração convencional	9
1.5.2 - Extração por Micro-ondas	11
1.5.3 - Extração por Ultrassom	15
1.6 - Identificação dos compostos bioativos de interesse derivados de matrizes vegetais.....	16
1.7 - Validação do método analítico	18
1.7.1 - Seletividade	19
1.7.2 - Linearidade e faixa de aplicação	19
1.7.3 - Limite de detecção e quantificação	20
2 - Objetivos	21
2.1 - Objetivos Gerais	21
2.2 - Objetivos Específicos.....	21
3 - Parte Experimental.....	22
3.1 - Padrões analíticos, solventes e reagentes	22
3.2 - Material Vegetal: resíduo de laranja	22
3.3 - Procedimentos de extração	23
3.3.1 - Extração convencional com homogeneização por ultra-turrax	23
3.3.2 - Extração por micro-ondas	25
3.3.3 - Extração por ultrassom.....	26
3.4 - Análise cromatográfica	28
3.4.1 - Instrumentação.....	28
3.4.2 - Delineamento experimental.....	29

3. 5 - Validação	30
3. 5.1 - Seletividade	30
3.5.2. Linearidade e faixa de aplicação	31
3.5.3. Limite de detecção e quantificação	31
4 - Resultados e Discussão	32
4.1 - Análise cromatográfica: desenvolvimento do método de identificação	32
4.1.1 - Composição da fase móvel	32
4.1.2 – Vazão	33
4.2 - Validação do método analítico	35
4.2.1 - Seletividade	35
4.2.2 - Limite de quantificação e detecção	37
4. 3 - Quantificação dos flavonoides	38
4. 3.1 – Extração convencional com homogeneização por ultra-turrax	38
4.3.2 – Extração por micro-ondas.....	41
4.3.3 – Extração por ultrassom.....	42
4.3.4 - Comparação entre os métodos de extração investigados para a quantificação de flavonoides de interesse em resíduos de casca de laranja ..	46
4.3.5 - Estrela Verde.....	48
5 – Considerações Finais	50
6 – Referências	53
ANEXO I.....	60
APÊNDICE – A.....	61
APÊNDICE – B.....	63
APÊNDICE – C	65

1 - Introdução

1.1 - Plataformas de pesquisa baseadas em biomassa: de resíduo aos compostos de alto valor agregado

O Laboratório Nacional de Energia Renovável da Europa (*National Renewable Energy Laboratory*, NREL) define biomassa como qualquer matéria orgânica de origem vegetal. No entanto, existe uma definição mais abrangente, que considera biomassa como sendo o material biológico derivado de organismos vivos ou recentemente vivos (PFALTZGRAFF, 2014) incluindo assim a matéria orgânica de origem animal.

Os estudos que envolvem o conceito de biomassa surgem com a necessidade de se buscar alternativas para as atuais fontes de energia e outros compostos. A biomassa é um recurso que pode ser renovado dentro de um intervalo de tempo que parece se adequar ao atual padrão de consumo (PFALTZGRAFF, 2014). De acordo com a literatura, ela é a única alternativa sustentável para combustíveis fósseis como fonte de carbono para as nossas necessidades químicas e materiais (CLARK *et al.*, 2009).

Esse material representa uma fonte bastante heterogênea e quimicamente complexa (RIVAS-CANTU *et al.*, 2013), uma vez que para a utilização de energia de forma sustentável pode-se utilizar, por exemplo, herbáceas, culturas lenhosas e alimentares, resíduos de culturas agrícolas, madeira, plantas aquáticas e outros resíduos incluindo alguns urbanos.

Dentre as diferentes fontes de biomassa, o resíduo proveniente da indústria de alimentos merece um destaque, uma vez que ao ser produzido em larga escala tem se tornado problemático, representando 50% do resíduo total gerado por alguns países (LIN *et al.*, 2013).

1.2 - Resíduos agroindustriais

Dentre os resíduos gerados pela indústria de processamento de alimentos, o resíduo agroindustrial tem sido estudado nos últimos anos, com diversos trabalhos que almejam reaproveitá-lo (GOULA *et al.*, 2017; FIDALGO *et al.*, 2016; DHAMOLE *et al.*, 2016; TOH *et al.*, 2016; LIEW *et al.*, 2016).

O resíduo agroindustrial, que também pode ser considerado um resíduo alimentício, tem um significativo potencial para ser empregado como matéria-prima para a produção de combustíveis e produtos químicos. Isso porque o seu volume em escala global é bastante abundante e, por possuir uma diversidade de componentes químicos funcionais, possibilita a geração de produtos com valor agregado (PFATTZGRAFF *et al.*, 2013).

Atualmente, a maior parte desse resíduo é utilizada principalmente como ração animal. A quantidade que sobra é utilizada em compostagem, incinerada ou depositada em aterros (LIN *et al.*, 2013). Quando manipulado de maneira incorreta (compostagem, incineração etc.) pode causar emissões de metano (CH₄) em quantidades significativas, o que contribui com as mudanças climáticas (PHAM *et al.*, 2015).

Dentre as alternativas adotadas, o uso para a produção de ração animal é a menos impactante. No entanto, esse uso pode ser considerado aquém quando comparado ao seu potencial, uma vez que as funcionalidades químicas do material não são completamente aproveitadas. A considerável quantidade de moléculas funcionais (carboidratos, proteínas, triglicerídeos, ácidos graxos, compostos fenólicos, etc.) que estão disponíveis em grande quantidade nesses resíduos é um dos principais motivos para se desenvolver práticas avançadas de sua valorização (PFATTZGRAFF *et al.*, 2013).

Nesse sentido, o Brasil é um país que possui marcante potencial para contribuir nessa área. A agroindústria brasileira gera cerca de 597 milhões de toneladas de resíduo por ano (FERREIRA-LEITAO *et al.*, 2010). Além de ser um dos principais exportadores agrícola do mundo, o país é reconhecido principalmente por sua exportação de açúcar, café, suco de laranja, dentre outros (USDA, 2015).

1.2.1 - A importância do resíduo de citrus

Considerando o setor agroindustrial, o Brasil destaca-se por ser o líder mundial na produção de citrus (LIN *et al.*, 2013). Dentre as árvores frutíferas, citrus é a que apresenta a colheita mais abundante no mundo. Sua produção anual chega a aproximadamente 115,5 milhões de toneladas, sendo 60% representadas por laranjas (LEDESMA-ESCOBAR e CASTRO, 2014).

Devido ao seu alto teor de matéria orgânica, o resíduo de citrus não pode ser tão facilmente descartado (TRIPODO *et al.*, 2004). A grande quantidade de carboidrato presente nesse resíduo faz com que seja altamente fermentável, gerando uma rápida degradação e produção de metano quando não manuseado de forma adequada (CLARK *et al.*, 2013). Sendo assim, o grande volume de resíduo gerado pela indústria de suco causa diversos problemas ambientais e, conseqüentemente, econômicos.

O subproduto do processamento de citrus representa 50% de seu peso, sendo composto principalmente de casca (flavedo e albedo), polpa e sementes. Esse resíduo, por sua vez, representa uma fonte de gordura, açúcares, ácidos, carboidratos insolúveis, enzimas, flavonoides, óleos essenciais, pectina e pigmentos (BOUKROUFA *et al.*, 2015).

Diversas pesquisas têm mostrado que o resíduo de citrus oferece uma oportunidade para a obtenção de produtos químicos úteis (PFALTZGRAFF *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2013; BICU e MUSTATA, 2011; CLARK *et al.*, 2013; ATTARD *et al.*, 2014; BALU, 2012; CLARK *et al.*, 2012a; CLARK *et al.*, 2012b). A transformação desse resíduo em produtos de alto valor agregado permitiria às indústrias diminuir gastos com tratamentos, gerar lucros e aumentar a sua competitividade (LIN *et al.*, 2013 e CLARK *et al.*, 2013).

A recuperação e processo de valorização dos subprodutos têm se tornado uma necessidade quando considerado o desenvolvimento sustentável e proteção ambiental, algo cobrado pela legislação em vários países e pela sociedade em geral (CLARK *et al.*, 2013). No entanto, encontrar uma maneira eficiente e sustentável de se extrair produtos naturais bioativos de materiais vegetais tem sido um desafio nas últimas décadas (MADEIRA e MACEDO, 2015).

Dentre os principais componentes do resíduo úmido da casca de laranja estão água (80%), açúcares solúveis, celulose e hemicelulose, pectina, *d*-limoneno, etanol e flavonoides (PFALTZGRAFF *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2013; CLARK *et al.*, 2013; ATTARD *et al.*, 2014; BALU *et al.*, 2012), destacando um mercado importante para o desenvolvimento de futuras práticas e estratégias de valorização. Assim, ao transformar o resíduo em um produto de alto valor é também possível reduzir os gastos com seu tratamento e, ainda, gerar lucros e melhorar a competitividade das indústrias de processamento de citrus (Clark *et al.*, 2013).

1.3 - Flavonoides

Os fenólicos de citrus são responsáveis pelas qualidades atribuídas à cor, amargura, adstringência, atividade antioxidante e sabor (LEGUA *et al.*, 2014). Sendo assim, os diferentes tipos e quantidades de compostos fenólicos conferem as características de cada espécie de citrus. Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos e observados em diferentes espécies de plantas. O material vegetal pode conter muitos miligramas de compostos fenólicos por grama de material seco (SHIRSATH *et al.*, 2012), sendo esses compostos relevantes para a dieta humana. Os dois maiores grupos de compostos fenólicos que participam de nossa dieta são os ácidos fenólicos e flavonoides (MARIKO *et al.*, 2017).

Os flavonoides são conhecidos por comporem um dos grupos mais amplos dentre os metabólitos secundários de plantas. Esses compostos possuem em sua estrutura um esqueleto comum de C6-C3-C6, em que dois anéis aromáticos são conectados por uma ponte de 3 carbonos (SANTOS-BUELGA e FELICIANO, 2017), conforme mostrado na figura 1. As diferentes classes de flavonoides são classificadas de acordo com o grau de insaturação e o padrão de substituição.

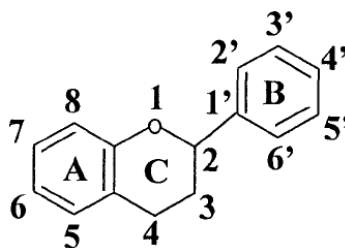


FIGURA 1. Esqueleto básico da estrutura dos flavonoides

Diversos flavonoides têm sido identificados em plantas e, portanto a sua natureza química, complexidade estrutural, comportamento físico-químico e concentrações variam muito de acordo com a matriz (SANTOS-BUELGA e FELICIANO, 2017).

As principais classes de flavonoides presentes em frutas cítricas são as flavonas e flavanonas (RUSSO et al., 2015), que diferem em seu esqueleto básico apenas pela instauração no carbono 2, conforme apresentado na figura 2.

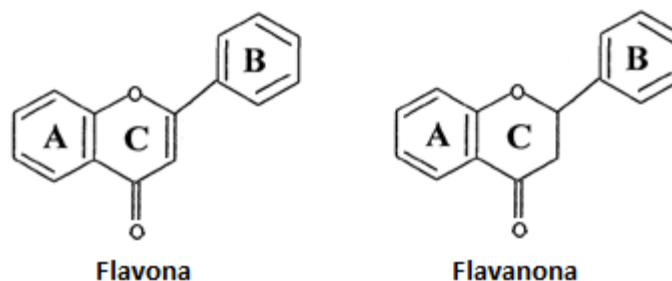


FIGURA 2. Estruturas das principais classes de flavonoides encontradas em citrus.

De maneira geral, ambas as classes exibem efeitos benéficos, tais como atividades anti-inflamatórias, antimicrobiana, antiviral, antialérgicas, dentre outras (SANTOS-BUELGA e FELICIANO, 2017). Justamente por essas propriedades, muitos trabalhos têm buscado a extração e isolamento desses compostos nessa matriz (ASSEFA *et al.*, 2017; GUNESER *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2015; CHINAPONGTITIWAT *et al.*, 2013). No entanto, não existe um protocolo de extração que englobe todos os tipos de flavonoides e matrizes semelhantes (SANTOS-BUELGA e FELICIANO, 2017; GATTUSO *et al.*, 2007) e, assim, o preparo de amostra e com

ênfase às condições de extração geralmente precisa ser otimizado levando-se em conta a natureza da amostra, analitos alvos e objetivo do estudo.

Nas frutas cítricas, os flavonoides estão presentes principalmente na sua forma glicosilada. As agliconas (quando não possuem a fração dos açúcares) são menos presentes no suco devido a sua natureza lipofílica e consequente baixa solubilidade em água (GATTUSO *et al.*, 2007). No entanto, elas podem ser encontradas na casca, que possui em sua composição os óleos essenciais, tornando o resíduo de citrus uma fonte importante para sua remoção. A presença das flavonas polimetoxiladas, também merece destaque, uma vez que elas são encontradas quase que exclusivamente no gênero Citrus (LI *et al.*, 2006) e têm despertado interesse para estudos recentes sobre o seu potencial nutracêutico (YAO *et al.*, 2009; XIAO *et al.*, 2009).

As análises desses metabólitos têm sido exploradas de duas maneiras distintas na literatura: determinação de fenólicos totais ou determinação dos compostos individuais (LEDESMA-ESCOBAR e CASTRO, 2014). Um dos métodos bastante explorados no primeiro caso é o método Folin-Ciocalteu (SHAH *et al.*, 2015; SHAMLOO *et al.*, 2015; IRKIN *et al.*, 2015), que se baseia em características fotométricas para fornecer informações a respeito do conteúdo total de fenóis. No entanto, essa metodologia é limitada para determinações gerais, impossibilitando informações mais precisas sobre determinados compostos (LEDESMA-ESCOBAR e CASTRO, 2014). Já para a determinação de compostos individuais, os métodos têm sido baseados na cromatografia líquida acoplada a um detector (arranjo de diodo - DAD, espectrometria no UV-Visível, espectrometria de massas – MS, dentre outros) (BILBAO *et al.*, 2007; MOLINA-CALLE *et al.*, 2015; LEDESMA-ESCOBAR *et al.*, 2016). Esse tipo de análise permite que a identificação e quantificação desses compostos sejam feitas com uma aceitável precisão, baseando-se no seu espectro de absorção, massas e tempos de retenção de cada composto.

1.4 - Química Verde

A necessidade de reduzir os resíduos gerados pela agroindústria, atrelada a grande potencialidade dessa biomassa em fornecer compostos de alto valor

agregado, justifica a importância em se estudar formas mais sustentáveis para extraí-los. Como o foco inicial é reduzir o impacto ambiental, é importante que tais ferramentas para esse processo não gerem ainda mais resíduos tornando esse exercício um paradoxo. Assim, surge a necessidade em se explorar uma química mais sustentável e verde.

A química analítica moderna oferece muitas técnicas e instrumentos para a determinação de um dado analito em diferentes amostras. Quando introduzido o conceito de química analítica verde, as metas a serem alcançadas por meio dessa ferramenta passam a considerar a eliminação ou redução do uso de substâncias químicas, minimização do consumo de energia, manejo correto do resíduo das análises e aumento da segurança do operador (GAŁUSZKA *et al.*, 2013).

O termo “química verde” foi definido pela primeira vez por Anastas e colaboradores no começo dos anos 90. Nesse momento, o conceito de sustentabilidade havia se tornado um foco de atenção considerável tanto para a indústria como para a sociedade como um todo (SHELDON, 2012).

A preocupação com os inconvenientes resultantes da explosão do crescimento global promoveu um aumento de pressão sobre as indústrias químicas e demais fontes poluidoras. Sendo assim, tanto a sociedade civil quanto as autoridades governamentais, iniciaram a cobrança por um aprimoramento no desenvolvimento de processos e materiais que fossem cada vez menos prejudiciais ao meio ambiente (CORRÊA e ZUIN, 2009).

Em termos gerais, a principal ideia da química verde é a possibilidade de se usar a química, sem esquecer que suas consequências vão além das propriedades da molécula de interesse, ou da eficácia do reagente utilizado (ANASTAS e WILLIAMSON, 1994). Seus impactos são sentidos pela sociedade e pelo ambiente a nossa volta. O conceito de química verde foi definido por Anastas (1999) como sendo o “uso de técnicas químicas e metodologias que reduzem ou eliminam o uso ou geração de matéria-prima, produtos, subprodutos, solventes, reagentes, etc. que oferecem riscos à saúde humana ou ao ambiente”. Esse conceito se aplica ao longo do ciclo de vida de um produto, incluindo o seu desenho, manufatura, uso, e a sua eliminação final. Paul Anastas e John Warner elencaram 12 princípios, descritos na tabela 1, (FARIAS e FÁVARO, 2011) para introduzir este conceito:

TABELA 1. Os 12 princípios da química verde

1) Prevenção:	Evitar a produção do resíduo é melhor do que tratá-lo ou "limpá-lo" após sua geração.
2) Economia de Átomos:	Deve-se procurar desenhar metodologias sintéticas que possam maximizar a incorporação de todos os materiais de partida no produto final.
3) Síntese de Produtos Menos Perigosos:	Sempre que praticável, a síntese de um produto químico deve utilizar e gerar substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana e ao ambiente.
4) Desenho de Produtos Seguros:	Os produtos químicos devem ser desenhados de tal modo que realizem a função desejada e ao mesmo tempo não sejam tóxicos.
5) Solventes e Auxiliares mais Seguros:	O uso de substâncias auxiliares (solventes, agentes de separação, secantes, etc.) precisa, sempre que possível, tornar-se desnecessário e, quando utilizadas, estas substâncias devem ser inócuas.
6) Busca pela Eficiência de Energia:	A utilização de energia pelos processos químicos precisa ser reconhecida pelos seus impactos ambientais e econômicos e deve ser minimizada. Se possível, os processos químicos devem ser conduzidos à temperatura e pressão ambientes.
7) Uso de Fontes Renováveis de Matéria-Prima:	Sempre que possível, técnica e economicamente, o uso de matérias-primas renováveis deve ser escolhido em detrimento de fontes não-renováveis.
8) Evitar a Formação de Derivados:	A derivatização desnecessária (uso de grupos bloqueadores, proteção/desproteção, modificação temporária por processos físicos e químicos) deve ser minimizada ou, se possível, evitada, porque estas etapas requerem reagentes adicionais e podem gerar resíduos.
9) Catálise	Reagentes catalíticos (tão seletivos quanto possível) são melhores que reagentes estequiométricos.
10) Desenho para a Degradação	Os produtos químicos precisam ser desenhados de tal modo que, ao final de sua função, se fragmentem em produtos de degradação inócuos e não persistam no ambiente.
11) Análise em Tempo Real para a Prevenção da Poluição	Será necessário o desenvolvimento futuro de metodologias analíticas que viabilizem um monitoramento e controle dentro do processo, em tempo real, antes da formação de substâncias nocivas.
12) Química Intrinsecamente Segura para a Prevenção de Acidentes	As substâncias, bem como a maneira pela qual uma substância é utilizada em um processo químico, devem ser escolhidas a fim de minimizar o potencial para acidentes químicos, incluindo vazamentos, explosões e incêndios.

Em um processo analítico, esse conceito pode ser explorado principalmente na etapa de preparo de amostra. Por utilizar grandes volumes de solventes orgânicos, essa etapa é considerada uma das mais impactantes (TOBISZEWSKI *et al.*, 2009). Sempre que possível essa etapa deve ser evitada escolhendo-se métodos analíticos diretos. No entanto, quando essa não é uma opção, as técnicas verdes apresentam uma alternativa para minimizar a poluição gerada.

Nos últimos anos, as técnicas verdes tem explorado o processo de extração, sendo inclusive introduzido o conceito de extração verde como “baseada na descoberta e desenho do processo de extração que irá reduzir o consumo de energia, permitir o uso de solventes alternativos e renováveis provenientes de produtos naturais e assegurar um extrato/produto seguro e de qualidade” (CHEMAT *et al.*, 2012, ZUIN e PEREIRA, 2013; ZUIN, 2016).

1.5 - O processo de extração de produtos bioativos

Por muito tempo, metodologias tradicionais como a maceração, percolação ou destilação a vapor eram as únicas técnicas disponíveis para a extração dos compostos de interesse de uma dada matriz. No entanto, com o avanço da tecnologia e as novas formas de energia, metodologias mais verdes como ultrassom e micro-ondas começaram a ser desenvolvidas e empregadas em maior extensão (MASON e VINATORU, 2017).

1.5.1 - Extração convencional

Existem diferentes métodos analíticos que se baseiam na extração por solvente. Dentre elas, as mais conhecidas para extração de produtos naturais são: maceração, percolação, Soxhlet, entre outras. A extração por solvente pode ocorrer como sendo uma extração líquido-líquido ou sólido-líquido. Na extração sólido-líquido, o material vegetal é colocado em contato com o solvente e passa por um processo em que os metabólitos são retirados do interior da estrutura celular desse material (SARKER *et al.*, 2006). Apesar de todo o processo ser dinâmico, ele pode ser dividido em três diferentes etapas, que serão mais bem detalhadas adiante e estão

representadas na figura 3. Em um primeiro momento, o solvente tem que se difundir dentro das células, na etapa seguinte ele deve solubilizar os metabólitos e, finalmente, ele tem que ser difundido para fora das células carregado com os metabólitos extraídos.

Na primeira etapa, em que o material vegetal é colocado em contato com o solvente, esse solvente é responsável por circundar as partículas do material vegetal, criando uma espécie de filme fino, onde diversos processos começam a ocorrer (MASON e VINATORU, 2017). Em um primeiro momento, o material vegetal sofre um inchaço, resultante da absorção do solvente pelo material seco. Inicialmente, enquanto esse material ainda está sendo encharcado pelo solvente, ocorre uma interação dinâmica na superfície, com solvente entrando no material vegetal e alguns compostos químicos (analitos) saindo para a solução (difusão 1, figura 3) (MASON e VINATORU, 2017). Entretanto, quando o inchaço atinge o seu máximo, o movimento dinâmico é reduzido e o solvente que circunda o material vegetal se torna menos móvel. Nesse momento, é formada uma camada fixa de solvente ao redor das partículas desse material vegetal. Essa camada obstrui a difusão direta que estava ocorrendo até então e diminui a eficiência de extração, devido ao gradiente de concentração (MASON e VINATORU, 2017). A segunda etapa de extração está relacionada com a difusão dos compostos das partículas solvatadas em direção à camada fixa de solvente (difusão 2, figura 3), que se encontra ao redor do material. Essa etapa é seguida pela terceira etapa, em que os compostos sofrem a difusão da camada fixa de solvente para o solvente total (difusão 3, figura 3) (MASON e VINATORU, 2017). Nesse sentido, o filme fino e fixo de solvente que circunda o material vegetal está agindo efetivamente como uma barreira de difusão que impede a extração. Vale ressaltar que esse impedimento é relativo a natureza do solvente, uma vez que sua espessura varia de acordo com sua interação com o material vegetal: soluções aquosas de etanol ou outros álcoois interagem fortemente com o material vegetal, criando uma camada mais grossa do que aquela produzida por solventes não polares (MASON e VINATORU, 2017).

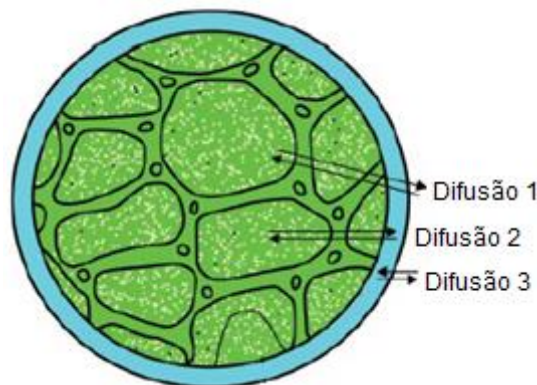


FIGURA 3. Processo de extração sólido-líquido em um material vegetal (adaptado de MASON e VINATORU, 2017).

Em geral, as extrações podem ser facilitadas através da moagem (diminuição do tamanho de partícula e conseqüentemente aumento da área superficial) e com o aumento da temperatura (o que favorece a solubilização). Além disso, a agitação constante ou ocasional pode aumentar a velocidade de extração (SARKER *et al.*, 2006).

1.5.2 - Extração por Micro-ondas

A extração assistida por micro-ondas (do inglês, *Microwave Assisted Extraction* - MAE) é um método avançado de extração que tem se tornado popular para a separação de compostos bioativos de plantas (ROUTRAY e ORSAT, 2012). A principal diferença entre essa técnica frente às convencionais é a de que sua extração ocorre devido a mudanças na estrutura celular causadas por ondas eletromagnéticas (VEGGI *et al.*, 2012). A técnica de micro-ondas utiliza ondas eletromagnéticas com uma frequência que varia de 300 MHz a 300 GHz. Ao passar pelo meio, sua energia é absorvida e convertida em energia térmica (ZHANG *et al.*, 2011). Esse aquecimento por micro-ondas é geralmente baseado em dois princípios: condução iônica e rotação dipolo.

A condução iônica acontece quando a amostra é irradiada e atua como um condutor elétrico. Os portadores de carga presentes na amostra (elétrons, íons, etc.) se movem sob a influência do campo magnético gerado pelas micro-ondas, resultando em uma polarização (NADAGOUDA *et al.*, 2011). Essas correntes induzidas causam

aquecimento na amostra devido à resistência elétrica gerada entre os portadores de carga e o meio. A rotação dipolo acontece quando moléculas dipolares tentam seguir, no mesmo alinhamento, o campo elétrico que está sendo aplicado. A oscilação induzida leva a colisões entre dipolos e as moléculas do entorno, gerando calor (ZHANG *et al.*, 2011).

A alta eficiência da técnica também está relacionada com a combinação sinérgica entre esse aquecimento e o gradiente de massa. No caso da extração por micro-ondas, ambos trabalham na mesma direção (VEGGI *et al.*, 2012), enquanto que na extração convencional a transferência de massa ocorre de dentro para fora e a de calor de fora para dentro do substrato. O processo de extração acontece em três etapas: a primeira, considerada como sendo a fase de equilíbrio, é responsável por remover o substrato da superfície externa da amostra - nessa etapa acontecem os fenômenos de solubilização e partição. A segunda etapa é uma fase de transição intermediária para a difusão, em que a resistência a transferência de massa começa a aparecer na interface sólido-líquido - nessa etapa a transferência de massa por convecção e difusão prevalece. Por fim, a terceira etapa é onde as interações que ligam o soluto à matriz são superadas e ele se difunde no solvente extrator (VEGGI *et al.*, 2012).

O principal objetivo de se utilizar o processo de micro-ondas é acelerar as reações a fim de evitar parâmetros reacionais desvantajosos (NÜCHER *et al.*, 2004). Sendo assim, a MAE oferece uma maior rapidez no processo de extração (na maioria dos casos inferior a 10 min), uso reduzido de solventes orgânicos quando comparado ao Soxhlet, possibilidade de extrações múltiplas quando usa o sistema com carrossel e a simplicidade de utilização. Essa tecnologia verde além de ser mais rápida promove menor degradação quando comparada a extração tradicional por solvente (CLARK *et al.*, 2009).

De forma geral, seu desempenho depende do modo operacional de aquecimento. Quando utilizado aquecimento constante a uma energia específica para o sistema de extração a prática torna-se eficiente para extrair compostos ativos termo-estáveis; já o aquecimento intermitente, que é fornecido por pulsos de micro-ondas a uma dada energia, é eficiente para extrair compostos termolábeis; e por fim, quando utilizada uma temperatura controlada, é possível promover a extração de compostos

ativos altamente degradáveis. Esses modos de aquecimento são amplamente adotados na MAE quando se trata de extração de plantas (CHAN *et al.*, 2015).

Dentre os fatores que afetam a eficiência de uma extração por micro-ondas, os principais são a composição do solvente, tempo, razão solvente/amostra, características da matriz, temperatura de extração e potência do micro-ondas.

A composição do solvente é um dos fatores mais importantes da extração por micro-ondas. Assim como nas extrações convencionais, o solvente escolhido deve possuir uma boa solubilidade, ser o mais seletivo possível para o composto de interesse, e deve ter uma boa interação com a amostra. No entanto, diferentemente dessas extrações, a seleção dos solventes para uma extração por micro-ondas depende também da capacidade deste de absorver energia, promovendo assim o seu aquecimento (VEGGI *et al.*, 2012). Dessa forma, deve-se levar em consideração a constante dielétrica desse solvente: quando maior for o valor da constante, maior será a sua capacidade de absorver energia micro-ondas e, conseqüentemente, maior será sua taxa de aquecimento (ROUTRAY e ORSAT, 2012).

A combinação de diferentes solventes também auxilia em uma melhor extração, uma vez que modifica as suas propriedades tanto em relação à seletividade como em termos de constante dielétrica. Além disso, alguns estudos tem mostrado que a adição de pequenas quantidades de água permite que haja uma melhor difusão da água para o interior celular da matriz, promovendo um melhor aquecimento e facilitando o transporte dos compostos para o solvente a uma taxa mais elevada de transferência de massa (VEGGI *et al.*, 2012). Essa escolha é também muito importante quando se tratando de compostos termo-lábeis. Nesse contexto, é possível promover uma combinação de solventes que garanta a alta seletividade ao mesmo tempo em que mantenha suas propriedades dielétricas relativamente baixas, podendo assegurar que a temperatura do solvente continuará baixa. Assim, a energia das micro-ondas irá interagir preferencialmente com a matriz e promoverá a liberação de seus compostos em um solvente de temperatura branda (ROUTRAY e ORSAT, 2012).

Geralmente, o tempo utilizado na MAE é bastante curto quando comparado a técnicas convencionais, variando de poucos minutos até meia hora, para evitar possíveis degradações ou oxidações. O aumento do tempo de extração pode

umentar o resultado do rendimento, no entanto a melhoria de extração é geralmente pequena frente ao aumento desse tempo (VEGGI *et al.*, 2012).

A razão entre volume de solvente/amostra é outro fator importante na MAE. De maneira geral, o volume de solvente deve ser tal que a amostra esteja suficiente imersa durante todo o tempo da irradiação. No entanto, ao contrário das extrações convencionais, esse volume deve ser o menor possível, uma vez que o excesso de solvente pode resultar em uma distribuição não uniforme das micro-ondas (MANDAL *et al.*, 2007, TATKE e JAISWAL, 2011).

As características da matriz tais como o tamanho de partícula e a natureza do material, podem afetar o rendimento da extração. Quanto menor for o tamanho de partícula, maior será a sua superfície de contato e por tanto melhor a penetração das micro-ondas (TATKE e JAISWAL, 2011).

A potência das micro-ondas está relacionada com a temperatura do sistema, uma vez que elevadas potências causam um aumento na temperatura. Assim, a temperatura é controlada pela incidência das micro-ondas que por sua vez controlam a quantidade de energia fornecida para a matriz (VEGGI *et al.*, 2012). Essa energia é convertida em calor quando em contato com o solvente dielétrico.

Temperaturas elevadas aumentam as interações intermoleculares dentro do solvente, o que resulta na diminuição da viscosidade e tensão superficial, facilitando a solubilização dos solutos e melhorando a capacidade de penetração desse solvente na matriz (ROUTRAY e ORSAT, 2012). Vale ressaltar que, quando MAE é utilizada em frascos fechados, existe a possibilidade da temperatura ultrapassar o ponto de ebulição do solvente, o que gera uma melhor eficiência de extração devido a dessorção dos solutos nos sítios ativos da matriz. Essa eficiência aumenta até um ponto ótimo a partir do qual começa a decrescer, devido principalmente a estabilidade do composto de interesse (VEGGI *et al.*, 2012). O aumento da temperatura pode gerar um aumento da pressão no interior da estrutura celular da amostra, resultando no seu rompimento e conseqüentemente aumentando a disponibilidade dos componentes no solvente (ROUTRAY e ORSAT, 2012). No entanto, se a ruptura da parede celular for muito rápida, impurezas podem ser difundidas para o solvente juntamente com o composto de interesse (VEGGI *et al.*, 2012). Além disso, quando se tratando de material vegetal, as altas temperaturas podem hidrolisar as ligações de éter da celulose, facilitando o

acesso do solvente extrator aos compostos de interesse que estão no interior da estrutura celular (MANDAL *et al.*, 2007).

1.5.3 - Extração por Ultrassom

A metodologia de extração por ultrassom tem sido bastante explorada como sendo uma maneira eficiente para extrações da indústria farmacêutica e de alimentos (ESCLAPEZ *et al.*, 2011). Tal eficiência de extração é atribuída à técnica devido as zonas de compressão e rarefação causadas pelas ondas de ultrassom, que geram o fenômeno da cavitação (MASON e VINATORU, 2017). A cavitação é o crescimento rápido e consequente colapso de microbolhas que são formadas quando se rompe a coesão de um líquido, conforme representado na figura 4. Esse rompimento pode ser gerado pela pressão da onda de ultrassom, já que quando é aplicado um aumento de pressão negativa a um líquido, as forças de van der Waals não são suficientemente fortes para manter essa coesão (CRAVOTTO e CINTAS, 2006). A implosão dessas bolhas leva a um acúmulo de energia em *hot-spots*, gerando temperaturas e pressões extremas (5000K, 1000atm) (SORIA e VILLAMIEL, 2010).

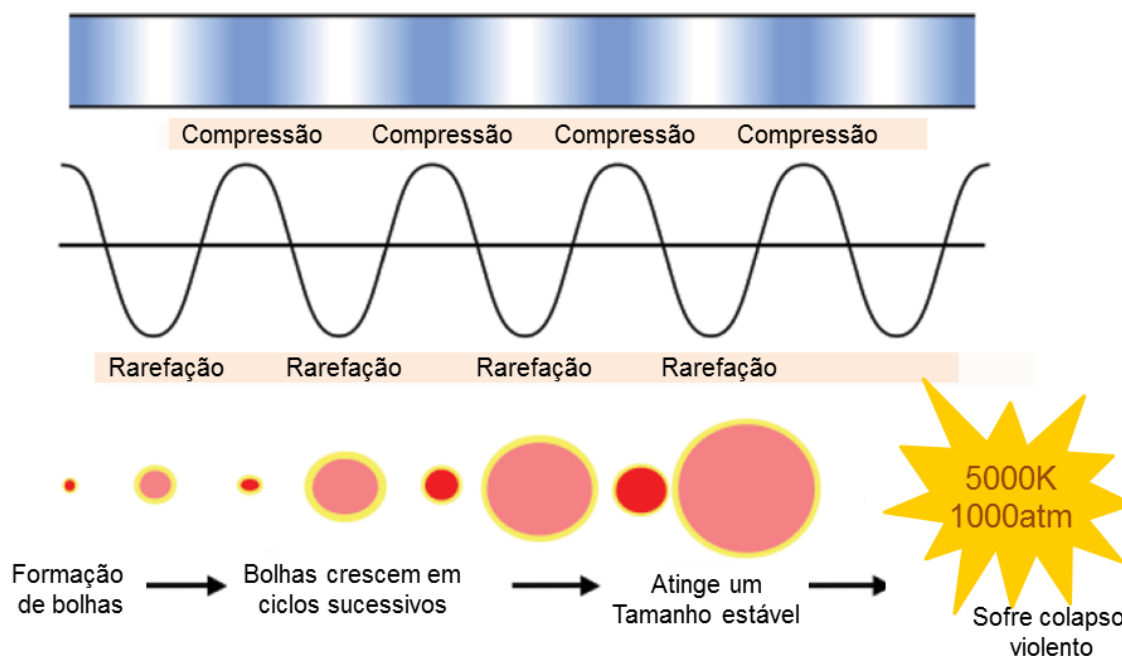


FIGURA 4. Processo da cavitação, promovida pelas zonas de rarefação e compressão das ondas de ultrassom (adaptado de MASON e VINATORU, 2017).

Quando se trata de uma matriz vegetal, o impacto físico gerado pelo ultrassom se dá não apenas por um único mecanismo, mas sim através da associação de diversos fatores que podem agir de maneiras independentes ou combinadas. (CHEMAT *et al.*, 2017). Dentre esses fatores, destacam-se as colisões inter-partículas e as ondas de choques criadas pelo colapso das bolhas de cavitação, que resultam em uma fragmentação da amostra (CHEMAT *et al.*, 2017), conforme ilustrado na figura 5. Essa fragmentação, por sua vez, gera um aumento da superfície de contato do sólido, o que resulta em uma maior transferência de massa e um aumento da taxa de extração. Outro impacto gerado pelo ultrassom é a erosão, que permite uma melhor acessibilidade da água como solvente, melhorando a solubilização e consequentemente a extração em si. Por fim, o fenômeno da capilaridade também tem sido bastante estudado, uma vez que ele gera uma melhoria da extração ao aumentar a profundidade e velocidade de penetração do líquido dentro dos poros da amostra (MASON, 2015).

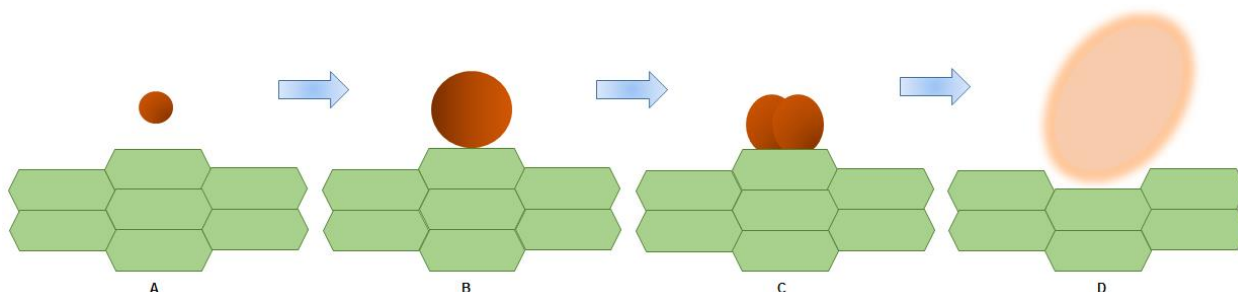


FIGURA 5. Fragmentação da amostra, causada pelas bolhas de cavitação. A e B representando o ciclo de rarefação e compressão, respectivamente. Seguido pelo colapso da microbolha (C), próximo do material vegetal. Consequentemente, ocorre a liberação de microjatos e ondas de choque que rompem a parede celular. Finalmente, o material intracelular é lançado na solução (D). (adaptado de ESCLAPEZ *et al.*, 2011).

1.6 - Identificação dos compostos bioativos de interesse derivados de matrizes vegetais

As matrizes vegetais são complexas e apresentam uma grande quantidade de substâncias químicas que dependem de fatores ambientais e do seu processamento. Assim, são precisas técnicas analíticas altamente seletivas, sensíveis e

versáteis para a adequada caracterização da sua composição fitoquímica (CASS e CASSIANO, 2015). Dentre as diversas técnicas aplicadas a análise de extratos vegetais, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) tem se destacado na análise de flavonoides.

A cromatografia líquida é uma técnica de separação física que é conduzida em fase líquida. Nessa técnica, os componentes de uma amostra são separados em seus constituintes (ou analitos) através da interação seletiva entre eles e duas fases, uma estacionária e outra móvel. A fase estacionária refere-se à coluna cromatográfica, ou seja, um cilindro rígido no interior do qual se encontra um material de enchimento formado por pequenas partículas. A fase móvel ou solvente flui continuamente através do sistema, arrastando a amostra injetada pela coluna para o detector (CHUST, 1990). O termo HPLC se refere a uma forma moderna dessa técnica em que a fase sólida constitui-se de colunas com tamanho de partícula menor do que as utilizadas em colunas preparativas de bancada, por onde a fase móvel passa com alta pressão. Uma forma esquemática do processo cromatográfico é apresentada na figura 6.

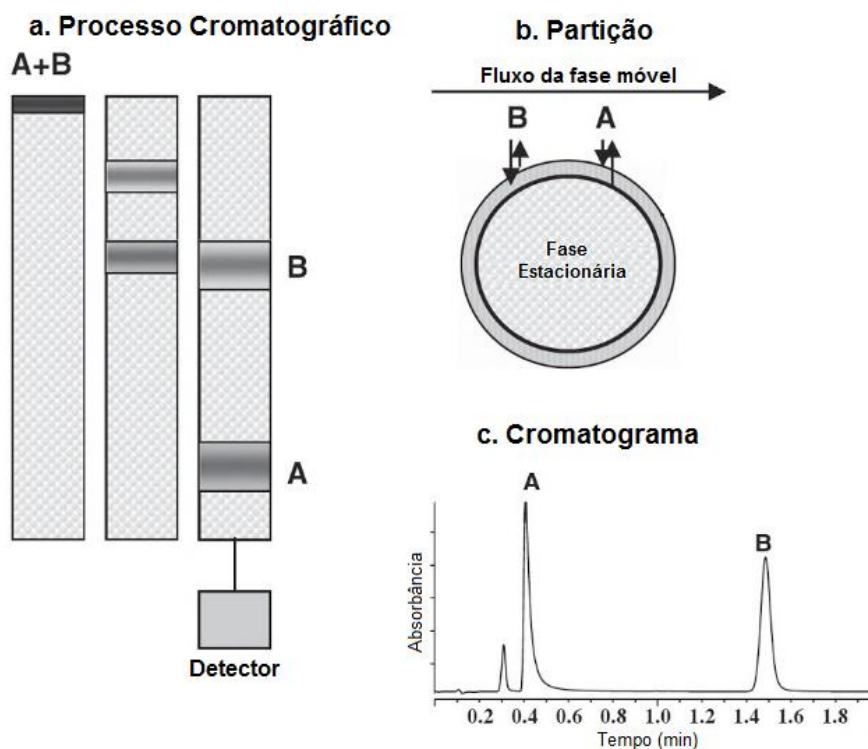


FIGURA 6. Representação esquemática das etapas de uma análise por cromatografia (adaptado de DONG, 2006).

A figura 6 mostra uma mistura de analitos A e B que estão sendo separados em duas bandas distintas na medida em que migram ao longo da coluna preenchida pela fase estacionária (figura 6a). O processo de partição dos analitos, que ocorre entre a fase móvel e estacionária, está representado na figura 6b e, por fim, é mostrado na figura 6c como que o detector monitora a concentração de cada componente separado em sua respectiva banda, gerando o que chamamos de cromatograma.

Apesar de ter surgido como uma técnica de separação, hoje a HPLC ocupa um lugar de destaque como técnica analítica qualitativa e quantitativa (COLLINS *et al.*, 2006). Isso porque seus recursos, tal como a automatização, permite fornecer análises quantitativas rápidas e precisas, além de ser bastante sensível. No entanto, não existe um detector universal que seja ao mesmo tempo sensível e seletivo, sendo assim essas características da análise dependem do detector a ela acoplado.

São muitos os fatores que influenciam uma análise cromatográfica. Dentre eles, a escolha da fase móvel e estacionária são os mais importantes, mas também é fundamental analisar o volume de injeção, vazão, temperatura e comprimento de onda (caso o detector se baseie na absorção). Um bom perfil cromatográfico é aquele que gera picos bem definidos, devidamente separados, utilizando o menor tempo de análise.

1.7 - Validação do método analítico

Atualmente, tem-se exigido cada vez mais a necessidade de se mostrar a qualidade das medições químicas nos diversos trabalhos publicados (RIBANI *et al.*, 2004). Isso pode ser feito através da comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade em um processo denominado *validação*. Tal processo tem o objetivo de assegurar que o método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra.

Os parâmetros analíticos, também conhecidos como *figuras analíticas de mérito*, que normalmente são utilizados na validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (RIBANI *et al.*, 2004).

1.7.1 - Seletividade

A seletividade de um método é a capacidade de avaliar o composto de interesse na presença de outras substâncias da matriz que podem interferir com a sua determinação. Esse parâmetro garante a resposta do método para um determinado analito, mesmo na presença de outras substâncias endógenas e também garante que a sua quantificação não será afetada pelo efeito de matriz. O efeito de matriz pode ser determinado de várias maneiras, dentre elas quando não existe a possibilidade de se obter a matriz isenta do composto de interesse, utiliza-se o método da adição de padrão. Para esse caso, pode ser feita uma comparação entre uma curva analítica sem a presença da matriz com uma curva analítica feita com adição da substância de interesse. Caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, portanto o método é seletivo (RIBANI *et al.*, 2004).

1.7.2 - Linearidade e faixa de aplicação

A linearidade de um método é a capacidade de relacionar a concentração do analito de interesse com o sinal medido (área ou altura da banda) de maneira diretamente proporcional e dentro de uma faixa de aplicação. Tal relação pode ser obtida a partir de uma equação de reta conhecida como *curva analítica*. A curva analítica fornece os coeficientes de regressão a e b (angular e intercepto, respectivamente) e o coeficiente de correlação r , a partir do qual é possível avaliar o grau de dispersão do conjunto de pontos e, portanto, a qualidade da curva (RIBANI *et al.*, 2004), que também pode ser avaliada pelo coeficiente de determinação r^2 (LEITE, 2008). A quantidade de pontos necessários para a construção da curva, assim como o valor mínimo necessário de r ou r^2 para considerá-la ideal varia de acordo com o protocolo de validação que se pretende seguir. A faixa de aplicação, também conhecida como *faixa linear dinâmica*, é um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida para a qual a curva analítica construída será válida.

1.7.3 - Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração em que o composto de interesse pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, utilizando um determinado procedimento experimental. Já o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração em que esse composto pode ser medido. Ambos são expressos como uma concentração, mas a determinação do LQ atrela sua concentração à precisão e exatidão. Portanto, quando necessário uma maior precisão, maior será o valor de LQ (RIBANI *et al.*, 2004).

2 - Objetivos

2.1 - Objetivos Gerais

Esse trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento e validação de métodos analíticos verdes para a extração de compostos de potencial valor agregado a partir de resíduos de laranja.

2.2 - Objetivos Específicos

- ✓ Desenvolver um método cromatográfico com base em HPLC-UV/Vis para a determinação de flavonoides (hesperidina, naringenina, hesperetina e nobiletina) presentes na amostra de resíduo de laranja;
- ✓ Otimizar três técnicas de extração verdes para o isolamento dos flavonoides selecionados derivados do resíduo de laranja;
- ✓ Comparar as técnicas frente ao seu caráter verde, considerando também os critérios da química analítica.

3 - Parte Experimental

3. 1 - Padrões analíticos, solventes e reagentes

Os padrões de alta pureza (> 98%) dos flavonoides analisados - hesperidina, naringenina, hesperetina e nobiletina - foram obtidos da Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil). As soluções padrão foram preparadas em metanol (grau HPLC, Sigma-Aldrich®) na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹ (hesperidina e nobiletina) e 5,0 mg.mL⁻¹ (naringenina e hesperetina), todas armazenadas a 4°C. Soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução estoque nas concentrações de 0,2 mg.mL⁻¹ (hesperidina e nobiletina) e 1,0 mg.mL⁻¹ (naringenina e hesperetina) no mesmo solvente. Para a extração dos compostos de interesse foi utilizado etanol (grau HPLC, Panreac®) e água ultrapura. Os solventes utilizados na separação cromatográfica foram acetonitrila (grau HPLC, Panreac®), metanol (grau HPLC, Panreac®), isopropanol (grau HPLC, Panreac®) e água ultrapura (sistema Milli-Q, Millipore®).

3. 2 - Material Vegetal: resíduo de laranja

A amostra de resíduo de laranja foi obtida por meio de uma empresa brasileira processadora de laranja em março de 2015. As laranjas (*Citrus Sinensis*) foram plantadas em Santa Cruz do Rio Pardo, São Paulo, e colhidas quando atingido o estado de maturação. Após a produção de suco, o resíduo gerado foi seco a 40°C em uma estufa de fluxo contínuo de ar circulante (Technal) por nove dias. Uma vez seca, a amostra foi triturada com um liquidificador industrial (Fiochi) e peneirada a fim de obter tamanhos de partículas uniformes, menores do que 18 mesh. Posteriormente a amostra foi acondicionada em recipiente de vidro ao abrigo de luz, umidade e calor.

3. 3 - Procedimentos de extração

Esse trabalho se propõe a comparar três diferentes técnicas de extração. Para tanto, foram desenvolvidos três procedimentos distintos, sendo eles uma extração convencional sólido-líquido, facilitada pelo uso de um homogeneizador ultra-turrax, extração por micro-ondas e extração por ultrassom.

3. 3. 1 - Extração convencional com homogeneização por ultra-turrax

A extração adotada como convencional para esse trabalho foi a extração sólido-líquido com o auxílio de um ultra-turrax para melhor homogeneização da amostra. A literatura recente (CRIZEL *et al.*, 2015; CANTERINO *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2012) tem mostrado que essa é uma metodologia eficiente para a extração de flavonoides provenientes de citrus, quando utilizadas diferentes proporções de álcool (metanol ou etanol) e água. A ampla gama de trabalhos na literatura que utilizam essa técnica (CRIZEL *et al.*, 2015; CANTERINO *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2012, PARK e IKEGAKI, 1998, ASSEFA *et al.*, 2017, GARCIA-CASTELLO *et al.*, 2015, ZAHOOR *et al.*, 2016) sugere condições distintas para proporção de solvente, tempo de utilização do ultra-turrax, bem como a velocidade de sua rotação e razão amostra/solvente utilizada para a extração. Sendo assim, foi proposta uma otimização do método convencional, utilizando um planejamento fatorial completo com 4 variáveis independentes (2^4) e triplicata no ponto central, a fim de avaliar o papel dessas diferentes variáveis. As condições escolhidas para realizar o planejamento estão descritas na tabela 2 e o álcool escolhido como solvente foi o etanol, uma vez que ele é considerado um solvente mais verde do que os demais álcoois disponíveis, por ser obtido de recursos renováveis e ser biodegradável (CHEMAT *et al.*, 2012).

TABELA 2. Variáveis avaliadas e níveis utilizados na otimização das condições de extração dos flavonoides de interesse derivados do resíduo de laranja por meio do método convencional com homogeneização por ultra-turrax.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Amostra/Solvente (m/v)	0,05	0,075	0,10
EtOH (%)	30	50	70
Tempo extração (min)	2	3	4
Ultra-Turrax (rpm)	16.800	21.200	25.600

Esse planejamento gerou 19 experimentos, sendo que três deles correspondem a uma triplicata no ponto central. O planejamento com as condições de cada experimento está descrito na tabela 3.

TABELA 3. Planejamento proposto para a otimização da extração dos flavonoides selecionados por meio do método convencional com homogeneização por ultra-turrax.

Experimentos	Variáveis Independentes			
	Amostra/Solvente	%EtOH	Tempo	Rotação
1	+1	+1	+1	+1
2	-1	+1	+1	+1
3	+1	-1	+1	+1
4	-1	-1	+1	+1
5	+1	+1	-1	+1
6	-1	+1	-1	+1
7	+1	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1	+1
9	+1	+1	+1	-1
10	-1	+1	+1	-1
11	+1	-1	+1	-1
12	-1	-1	+1	-1
13	+1	+1	-1	-1
14	-1	+1	-1	-1
15	+1	-1	-1	-1
16	-1	-1	-1	-1
17	0	0	0	0
17	0	0	0	0
17	0	0	0	0

Todos os experimentos seguiram o mesmo procedimento: as extrações foram feitas a partir da pesagem do material seco (0,25 – 0,50 g) e posterior adição de 5 mL da solução de EtOH/H₂O (30 – 70%). Esse conjunto foi submetido ao Ultra-Turrax (Ultra Turrax, IKA, T10 basic) por um determinado tempo (2 – 4 min) a temperatura ambiente. Posteriormente, a solução resultante foi submetida à centrifugação (10°C, 15 min, 10000 rpm). O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma Pipeta de Pasteur e filtrado em uma membrana PVDF de 0,25 µm para posterior análise no HPLC.

3. 3. 2 - Extração por micro-ondas

A extração assistida por micro-ondas adotada foi baseada na literatura recente para extração de flavonoides. Por exemplo, M'hiri *et al.* (2015) fazem um estudo da estabilidade de alguns flavonoides e relatam que a hesperidina possui uma melhor extração com o aumento da potência do micro-ondas, mas que ocorre um decréscimo quando a potência ultrapassa esse valor. Por outro lado, essa situação não se repete com os flavonoides polimetoxilados, que apresentaram uma ótima extração com o limite superior de potência estipulado pelos pesquisadores. De acordo com os autores, 200 W corresponderia a uma temperatura de 67°C enquanto que 400 W atingia 108°C no equipamento utilizado. Milutinovic *et al.* (2014) por sua vez, descrevem uma extração de flavonoides totais utilizando um micro-ondas doméstico. Apesar das suas diferenças e restrições, esse trabalho apresenta uma análise multivariada entre tempo de extração, concentração de etanol, razão líquido/sólido e potência das micro-ondas. É importante ressaltar que todas as variáveis se mostraram significantes nesse trabalho, quando levado em consideração as interações entre elas. E, ainda, que o ponto ótimo obtido através dos resultados indica que a melhor extração acontece em condições intermediárias dessas variáveis.

Sendo assim, foi proposta a otimização da extração assistida por micro-ondas utilizando um planejamento fatorial fracionário com 4 variáveis independentes (2^{4-1}) e 2 réplicas em um experimento para avaliar o erro puro do sistema. Esse planejamento gerou 9 experimentos que avaliam a importância das diferentes variáveis quando considerados os quatro flavonoides de interesse. O tempo de extração é uma

variável de interesse, pois determina o contato entre a amostra e as micro-ondas, facilitando o processo de extração e/ou degradação dos analitos de interesse (tabela 4).

TABELA 4. Planejamento proposto para otimização da extração dos flavonoides selecionados por meio do método de micro-ondas.

Experimento	Variáveis Independentes			
	Tempo	Temperatura	%Solvente	A/S
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1

Assim como na extração anterior, todos os experimentos seguiram o mesmo procedimento. As extrações foram feitas a partir da pesagem do material seco e posterior adição de diferentes proporções de misturas de solvente já diretamente no frasco revestido por TFM™-PTFE do micro-ondas. A mistura foi levemente agitada, o frasco foi fechado e posicionado no micro-ondas. Para todos os experimentos, respeitou-se uma rampa de temperatura até alcançar a temperatura desejada. Após a extração, os frascos foram deixados em repouso até que atingissem a temperatura ambiente. A solução foi transferida para um tubo Falcon e centrifugada (10°C, 15 min, 10000 rpm). O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma Pipeta de Pasteur e filtrado em uma membrana PVDF de 0,25 μm para posterior análise no HPLC.

3. 3. 3 - Extração por ultrassom

A extração por ultrassom adotada nesse trabalho foi baseada nos resultados das extrações anteriores e nas limitações do equipamento. A fim de comparar se, em um mesmo tempo de extração, o ultrassom seria mais eficiente do que o micro-ondas, utilizou-se a mesma faixa de tempo estudada (5 – 25 min), maior do que

aquela permitida pela limitação do ultra-turrax na extração convencional. Para as concentrações de EtOH a faixa escolhida foi de 30 – 70% (v/v).

Sendo assim, para as extrações utilizando o ultrassom, optou-se por desenvolver um planejamento de composto central. Nesse caso, as variáveis foram avaliadas em 5 níveis diferentes, entre $-\sqrt{2}$ a $+\sqrt{2}$. As condições utilizadas para tal estão descritas na tabela 5.

TABELA 5. Variáveis avaliadas e níveis utilizados na otimização das condições de extração dos flavonoides de interesse derivados do resíduo de laranja por meio do método de ultrassom.

Variáveis	Níveis				
	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$+\sqrt{2}$
Tempo (min)	5	10	15	20	25
EtOH (%)	30	40	50	60	70

Esse planejamento gerou 11 experimentos, sendo que 3 deles correspondem a uma triplicata no ponto central. O planejamento com as condições de cada experimento estão descritos na tabela 6.

TABELA 6. Planejamento proposto para otimização da extração dos flavonoides selecionados por meio do método de ultrassom.

Experimento	Variáveis Independentes	
	Tempo	EtOH %
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	0	0
5	0	0
5	0	0
6	+√2	0
7	-√2	0
8	0	+√2
9	0	-√2

Assim como nas extrações anteriores, todos os experimentos seguiram o mesmo procedimento. As extrações foram feitas a partir da pesagem de 0,25 g do material seco e posterior adição de 5 mL da solução de EtOH/H₂O (30 – 70% v/v) em tubos de ensaio de vidro com tampa de rosca. A solução foi agitada por 5 segundos em vórtex (IKA®, lab dancer) e posteriormente cada tubo foi colocado no banho ultrassom de acordo com o tempo definido pelo planejamento (5 – 25 min).

Após a extração, a solução foi transferida para um tubo Falcon e centrifugada (10°C, 15 min, 10000 rpm). O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma Pipeta de Pasteur e filtrado em uma membrana PVDF de 0,25 μm para posterior análise por HPLC.

3.4 - Análise cromatográfica

3.4.1 - Instrumentação

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent Technologies® (1260 Infinity) acoplado a um detector UV-Vis.

A separação dos compostos de interesse foi realizada por uma coluna analítica de fase reversa Zorbax Eclipse – XDB de fase estacionária C18 (150 x 4,6 mm d.i., 5 μm).

3.4.2 - Delineamento experimental

A fim de se determinar as condições ótimas de análise para a separação dos diferentes compostos encontrados na amostra, avaliaram-se alguns parâmetros cromatográficos. Dentre os diferentes fatores que influenciam a separação cromatográfica dos analitos, foram avaliados: composição da fase móvel, comprimento de onda e vazão, conforme indicado na tabela 7.

TABELA 7. Variáveis avaliadas na otimização das condições cromatográficas por HPLC-UV para análises dos flavonoides selecionados, derivados do resíduo de laranja.

Variáveis	Níveis		
	Independentes		
	Baixo	Alto	
Vazão	0,5 mL.min ⁻¹	1,0 mL.min ⁻¹	
Composição da fase móvel	ACN/H ₂ O		
	MeOH/H ₂ O		
	ACN/MeOH/H ₂ O		
	Solventes (%)		
	H ₂ O	ACN	MeOH
Gradiente	90	10	0
	90	0	10
	90	5	5

Os parâmetros propostos foram avaliados a partir de análises do extrato da amostra, utilizando a metodologia da extração por ultra-turrax (0,25 g de material vegetal em 5 mL de EtOH). A avaliação da eficiência da separação cromatográfica foi determinada em função da separação dos picos e intensidade dos sinais obtidos nos cromatogramas.

3. 5 - Validação

3. 5.1 - Seletividade

Para comprovar a seletividade do método foi realizado um teste de pureza para os picos cromatográficos dos 4 analitos (hesperidina, naringenina, hesperetina e nobiletina) presentes nos extratos. Assim, foi realizada uma comparação baseada no tempo de retenção dos picos obtidos pela análise do extrato e os picos obtidos pelas análises das soluções padrão. Como não é possível obter uma matriz isenta dos compostos de interesse, a seletividade foi avaliada através do método de adição de padrão. Assim, foi construída uma curva analítica com adição da substância de interesse (hesperidina, naringenina, hesperetina e nobiletina) na amostra e comparada com uma curva analítica, por padronização externa, em solvente sem a presença da matriz.

Inicialmente foram preparadas soluções padrão da substância de interesse em metanol. As concentrações dessas soluções estão descritas na tabela 9, sendo que para naringenina e hesperetina foi necessário o preparo de uma solução trabalho na concentração de 0,200 e 0,150 mg/mL, respectivamente, a partir da solução padrão inicial. De posse dessas soluções, ambas as curvas foram construídas, seguindo as diretrizes do protocolo da *International Conference Harmonization* (ICH). Portanto, para cada curva foi necessário um mínimo de 6 níveis de concentração e as injeções foram feitas em replicatas ($n = 4$). As concentrações referentes a cada ponto da curva estão descritas na tabela 8, para preparar esses pontos foram utilizados redutores de volume, de tal maneira que o volume final de todas as soluções fossem sempre 400 μ m. A matriz utilizada para a curva que recebeu a adição de padrão foi um extrato proveniente do método de ultraturrax (0,25 g de material vegetal em 5 mL de EtOH).

TABELA 8. Concentrações (mg/mL) referentes às soluções padrão e aos pontos utilizados para a construção de ambas as curvas de calibração (no extrato e em metanol) dos flavonoides analisados.

(mg/mL)	Solução Padrão	1º Ponto	2º Ponto	3º Ponto	4º Ponto	5º Ponto	6º Ponto
Hesperidina	0,308	0,0540	0,1040	0,1540	0,2040	0,2540	0,3040
Naringenina	1,014	0,0078	0,0126	0,0174	0,0222	0,0270	0,0318
Hesperitina	1,010	0,0052	0,0080	0,0108	0,0136	0,0164	0,0192
Nobiletina	0,212	0,0100	0,0220	0,0340	0,0460	0,0580	0,0700

3.5.2. Linearidade e faixa de aplicação

Como dito anteriormente, para que seja considerado que um método tenha linearidade é necessário que os resultados obtidos (área do pico) sejam diretamente proporcionais à concentração da substância a ser analisada. A fim de construir uma relação matemática entre esses fatores, o sinal e a concentração da substância devem ser determinados empiricamente a partir de sinais medidos para concentrações conhecidas. Essa relação matemática pode ser expressa como uma equação de reta. Para ambas as curvas analíticas (com e sem a matriz) foram verificadas se os pontos estavam dentro de uma faixa linear, de acordo com as respostas relativas.

3.5.3. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com o método baseado em parâmetros da curva analítica. Para tal foram respeitadas as seguintes relações:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta - nesse trabalho foi considerado como sendo os valores de coeficiente linear - e S é o coeficiente angular da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

4 - Resultados e Discussão

4.1 - Análise cromatográfica: desenvolvimento do método de identificação

A otimização das condições operacionais é necessária para que seja possível o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a determinação de flavonoides por HPLC. Assim, os parâmetros descritos na tabela 8 foram otimizados. Inicialmente, estudou-se a composição da fase móvel, dado que esta interfere diretamente no tempo de retenção e na seletividade nessa técnica.

4.1.1 - Composição da fase móvel

Merken e Beecher (2000) relatam em sua revisão sobre determinação de flavonoides por HPLC que os solventes comumente usados na separação são H₂O, ACN, e MeOH. Assim, foram feitos gradientes exploratórios com H₂O/ACN, H₂O/MeOH e H₂O/ACN/MeOH para entender como a amostra se comportaria frente a esses solventes. O perfil cromatográfico do extrato nesses três casos está demonstrado na figura 7.

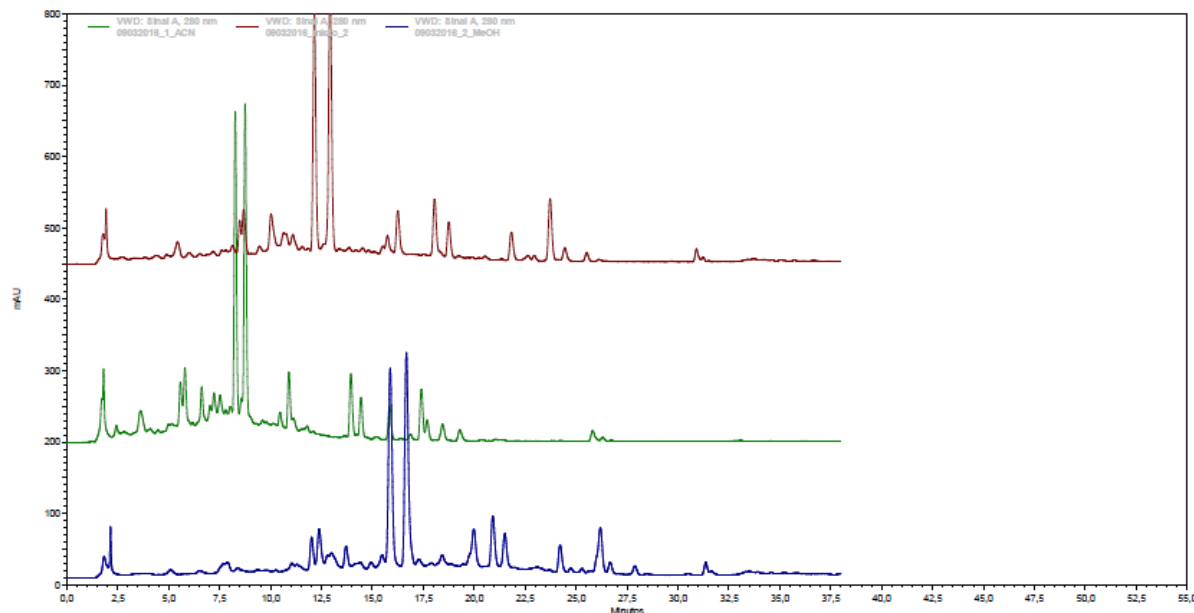


FIGURA 7. Cromatogramas referentes à separação do extrato do resíduo de laranja nas três composições de gradiente exploratório, ACN/MeOH (50/50%) v/v (vinho), ACN 100% (verde) e MeOH 100% (azul).

Verificou-se assim que o cromatograma referente ao gradiente com MeOH apresentou a coeluição de alguns picos e um aumento no tempo de retenção quando comparado ao método com gradiente de ACN. Apesar de a ACN ter promovido uma melhor separação, os compostos saíam próximos ao começo da análise cromatográfica, o que pode ser negativo devido ao volume morto da análise. Já o terceiro método, com a condição em que proporções iguais de MeOH e ACN eram utilizadas, apresentou uma boa separação e definição dos picos, sendo portanto adotada para as análises posteriores.

4.1.2 – Vazão

A vazão selecionada ao longo de uma análise cromatográfica pode alterar os tempos de retenção dos compostos analisados e, portanto, o tempo final de análise. Assim, foram testadas as vazões de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Os resultados estão mostrados na figura 8.

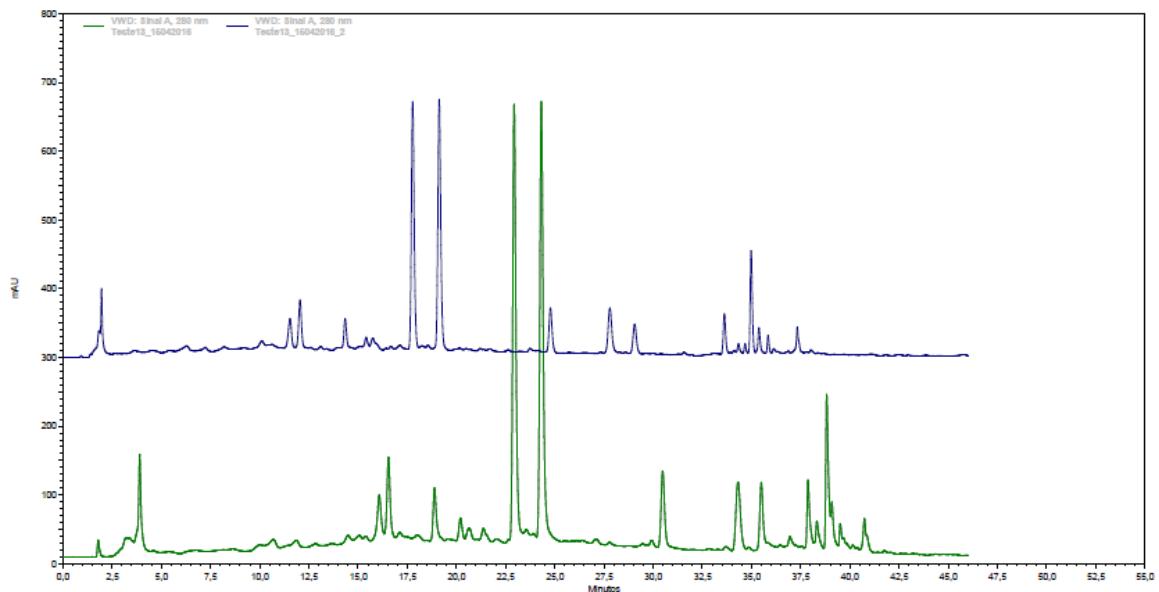


FIGURA 8. Cromatogramas referentes à separação do extrato do resíduo de citrus na vazão de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (azul) e $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (verde)

Como pode ser verificado, a vazão de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ apresentou uma melhor separação de bandas, definição de linha de base e diminuição do tempo de retenção dos compostos de interesse. Além disso, o uso de menor vazão contribuiu para um menor consumo de solvente e foi, portanto, escolhido para esse trabalho.

Assim, após definir a fase móvel e vazão mais adequadas, outros parâmetros como temperatura e proporções da fase móvel foram modificados. Os parâmetros utilizados nesse trabalho estão descritos na tabela 9.

TABELA 9 – Condições cromatográficas otimizadas para a análise do extrato de resíduo de laranja por HPLC-UV.

Tempo (min)	H ₂ O %	ACN %	MeOH %
0	90	6	4
30	30	50	20
35	0	30	70
36	0	0	100
46	0	0	100
47	90	6	4
vazão = $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ $\lambda = 256 \text{ nm}$ $T = 35^\circ\text{C}$			

4.2 - Validação do método analítico

4.2.1 - Seletividade

O teste de pureza para os picos cromatográficos mostrou que a separação dos picos foi eficiente para a separação dos compostos de interesse. Assim, os flavonoides utilizados para avaliar as extrações desse trabalho encontram-se bem separados, e seus tempos de retenção correspondem àquele obtido pelo respectivo padrão, como indicado na tabela 10. O cromatograma da amostra sobreposto ao de cada padrão individual pode ser observado na figura 9.

TABELA 10. Tempo de retenção determinado para cada padrão de flavonoide de interesse

Padrão	Tempo de retenção
Hesperidina	16,978
Naringenina	23,732
Hesperetina	24,752
Nobiletina	31,161

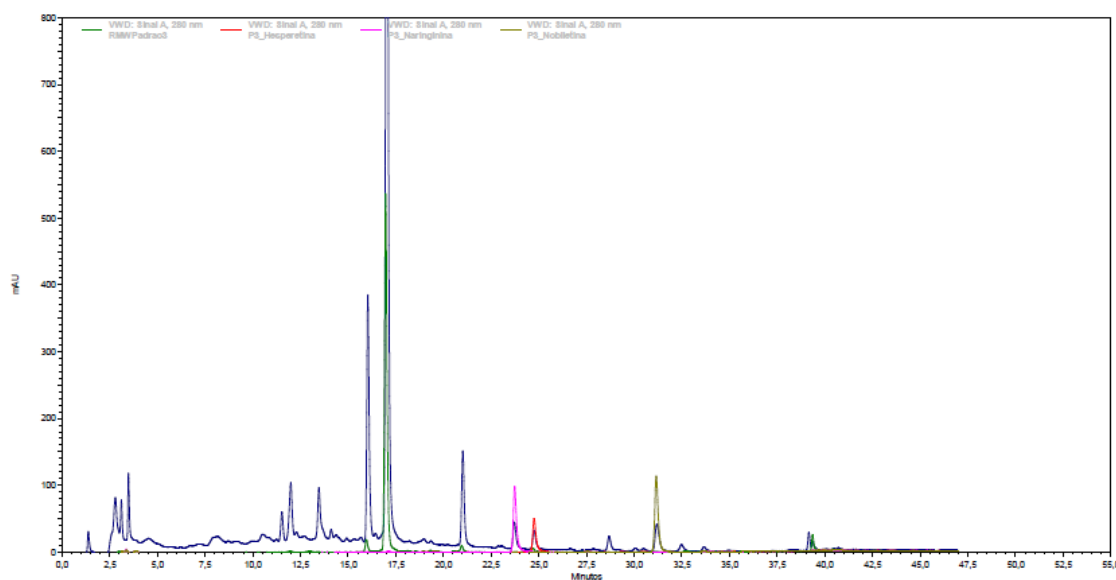


FIGURA 9. Cromatograma da amostra de extrato do resíduo de citrus (azul) com a sobreposição dos padrões de hesperidina (verde), naringenina (rosa), hesperetina (vermelho) e nobiletina (amarelo), nas condições apresentadas na tabela 10.

A fim de avaliar a seletividade do método frente ao efeito de matriz, foram construídas duas curvas analíticas para cada flavonoide analisado. Assim, a figura 10 mostra a resposta de cada analito na presença e ausência de matriz. Vale ressaltar que para as curvas construídas na matriz foi feita uma correção descontando o valor do branco (extrato de laranja sem adição de padrão). As concentrações de cada ponto da curva estão indicadas na tabela 8.

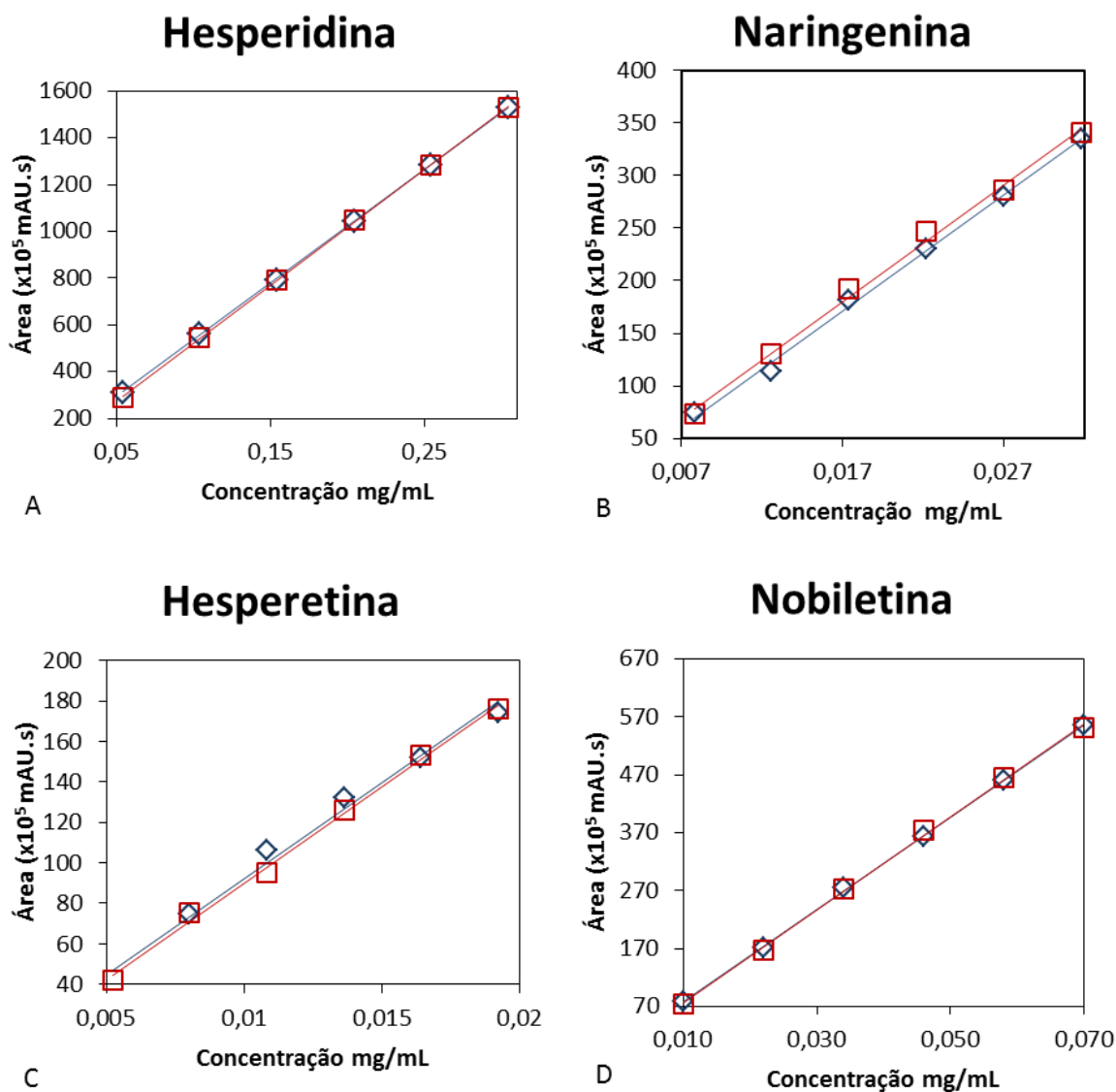


FIGURA 10. Curvas de calibração construídas no extrato de resíduo de laranja (azul) e em metanol (vermelho) para hesperidina (A), naringenina (B), hesperetina (C) e nobiletina (D).

Todas as curvas foram feitas a partir de injeções em quadruplicatas e os coeficientes de variação de todos os pontos dos 4 analitos não ultrapassaram o valor de 2,17%, conforme mostrado no Apêndice A.

Para avaliar se as curvas na presença ou ausência da matriz estavam paralelas, utilizou-se o valor do coeficiente angular (CA) de cada curva. Assim, quando a razão entre seus valores de CA for próxima de 1, considera-se que são paralelas e portanto não há interferência da matriz e o método é seletivo. As equações da reta para cada curva, bem como os valores do coeficiente de determinação (r^2) e a razão entre os coeficientes angulares das curvas preparadas na matriz e no solvente estão demonstrados na tabela 11.

TABELA 11. Avaliação das curvas de calibração preparadas no extrato de laranja e em metanol. Equações da reta para as curvas correspondentes a cada analito, bem como seus valores de coeficiente de determinação e a razão entre os coeficientes angulares para verificar se estão paralelas.

Flavonoide	Matriz		Solvente		CA _m /CA _s
	Equação	r ²	Equação	r ²	
Hesperidina	$y = 4,87 \times 10^8 x + 5,00 \times 10^6$	0,9999	$y = 4,95 \times 10^8 x + 2,67 \times 10^6$	0,9998	0,9838
Naringenina	$y = 1,10 \times 10^9 x - 1,57 \times 10^5$	0,9971	$y = 1,11 \times 10^9 x - 7,72 \times 10^5$	0,9958	0,9910
Hesperetina	$y = 9,51 \times 10^8 x - 2,87 \times 10^5$	0,9877	$y = 9,54 \times 10^8 x - 5,11 \times 10^5$	0,9967	0,9969
Nobiletina	$y = 8,05 \times 10^8 x - 4,67 \times 10^5$	0,9990	$y = 8,05 \times 10^8 x - 4,67 \times 10^5$	0,9990	1,0000

CA_m = Coeficiente angular das curvas de calibração preparadas no extrato.

CA_s = Coeficiente angular das curvas de calibração preparadas em metanol.

4.2.2 - Limite de quantificação e detecção

Os valores de desvio padrão para os coeficientes lineares (s) e angulares (S) da curva de cada analito, bem como os valores de LD e LQ (mg/mL) estão descritos na tabela 12.

TABELA 4. Valores de desvio padrão para os coeficientes lineares e angulares e limites de quantificação e detecção (mg/mL) para os flavonoides analisados.

Marcadores	s	S	LD	LQ
Hesperidina	$3,60 \times 10^5$	$4,95 \times 10^8$	$2,40 \times 10^{-3}$	$7,28 \times 10^{-3}$
Naringenina	$3,68 \times 10^5$	$5,16 \times 10^9$	$2,35 \times 10^{-4}$	$7,13 \times 10^{-4}$
Hesperetina	$3,20 \times 10^5$	$9,69 \times 10^8$	$1,09 \times 10^{-3}$	$3,30 \times 10^{-3}$
Nobiletina	$8,22 \times 10^4$	$8,04 \times 10^8$	$3,37 \times 10^{-4}$	$1,02 \times 10^{-3}$

4. 3 - Quantificação dos flavonoides

4. 3.1 – Extração convencional com homogeneização por ultra-turrax

As concentrações dos flavonoides presentes nos extratos de cada experimento do planejamento fatorial estão demonstradas na tabela 13. A tabela também indica a condição de cada variável utilizada em cada experimento individual.

TABELA 13. Resultados obtidos para os experimentos do planejamento fatorial da extração dos flavonoides selecionados, derivados do resíduo de laranja, por meio do método convencional com homogeneização por ultra-turrax.

Experimentos	Variáveis Independentes				Resposta			
	A/S (g/mL)	[EtOH] (v/v %)	Tempo (min)	Rotação (rpm)	Hesperidina	Naringenina	Hesperetina	Nobiletina
					Concentração (mg/g)			
1	0,100	70	4	25600	3,14	$1,65 \times 10^{-1}$	$1,05 \times 10^{-1}$	$2,37 \times 10^{-1}$
2	0,050	70	4	25600	3,99	$1,70 \times 10^{-1}$	$9,94 \times 10^{-2}$	$2,24 \times 10^{-1}$
3	0,100	30	4	25600	1,40	$1,02 \times 10^{-1}$	$5,49 \times 10^{-2}$	$1,25 \times 10^{-1}$
4	0,050	30	4	25600	1,75	$1,42 \times 10^{-1}$	$7,31 \times 10^{-2}$	$1,67 \times 10^{-1}$
5	0,100	70	2	25600	2,66	$1,50 \times 10^{-1}$	$9,19 \times 10^{-2}$	$2,25 \times 10^{-1}$
6	0,050	70	2	25600	3,78	$1,80 \times 10^{-1}$	$1,03 \times 10^{-1}$	$2,37 \times 10^{-1}$
7	0,100	30	2	25600	1,18	$1,01 \times 10^{-1}$	$5,42 \times 10^{-2}$	$1,22 \times 10^{-1}$
8	0,050	30	2	25600	1,99	$1,43 \times 10^{-1}$	$7,46 \times 10^{-2}$	$1,61 \times 10^{-1}$
9	0,100	70	4	16800	2,66	$1,55 \times 10^{-1}$	$9,48 \times 10^{-2}$	$2,25 \times 10^{-1}$
10	0,050	70	4	16800	3,79	$1,78 \times 10^{-1}$	$9,52 \times 10^{-2}$	$2,41 \times 10^{-1}$
11	0,100	30	4	16800	1,39	$1,13 \times 10^{-1}$	$6,22 \times 10^{-2}$	$1,49 \times 10^{-1}$
12	0,050	30	4	16800	1,79	$1,39 \times 10^{-1}$	$7,74 \times 10^{-2}$	$1,27 \times 10^{-1}$
13	0,100	70	2	16800	2,47	$1,33 \times 10^{-1}$	$7,73 \times 10^{-2}$	$1,98 \times 10^{-1}$
14	0,050	70	2	16800	3,43	$1,73 \times 10^{-1}$	$9,36 \times 10^{-2}$	$2,32 \times 10^{-1}$
15	0,100	30	2	16800	1,15	$1,05 \times 10^{-1}$	$5,95 \times 10^{-2}$	$1,42 \times 10^{-1}$
16	0,050	30	2	16800	1,61	$1,44 \times 10^{-1}$	$7,51 \times 10^{-2}$	$1,66 \times 10^{-1}$
17	0,075	50	3	21200	2,99	$1,66 \times 10^{-1}$	$9,93 \times 10^{-2}$	$2,30 \times 10^{-1}$
17	0,075	50	3	21200	3,26	$1,73 \times 10^{-1}$	$1,05 \times 10^{-1}$	$2,39 \times 10^{-1}$
17	0,075	50	3	21200	3,30	$1,70 \times 10^{-1}$	$1,01 \times 10^{-1}$	$2,30 \times 10^{-1}$

A/S = razão entre amostra e solvente

Esses resultados mostram que o planejamento fatorial se fez necessário, uma vez que a eficiência de extração sofreu alteração significativa quando os parâmetros de extração são modificados. A hesperidina apresentou um valor mínimo de

concentração de 1,15 mg/g que é aproximadamente 30% menor do valor máximo extraído de 3,99 mg/g. Já os outros três flavonoides extraídos apresentaram uma diferença superior a 50% entre o valor mínimo e máximo extraído.

Além disso, esses resultados nos permitem avaliar o efeito que cada variável possui no sistema. O gráfico de efeito apresentado na figura 11 representa a amplitude que cada variável, ou interação entre elas, teve nesse conjunto de experimentos para a extração convencional. Como a hesperidina apresentou magnitude de efeito muito distinta dos demais flavonoides, seus valores estão dispostos em um gráfico separado.

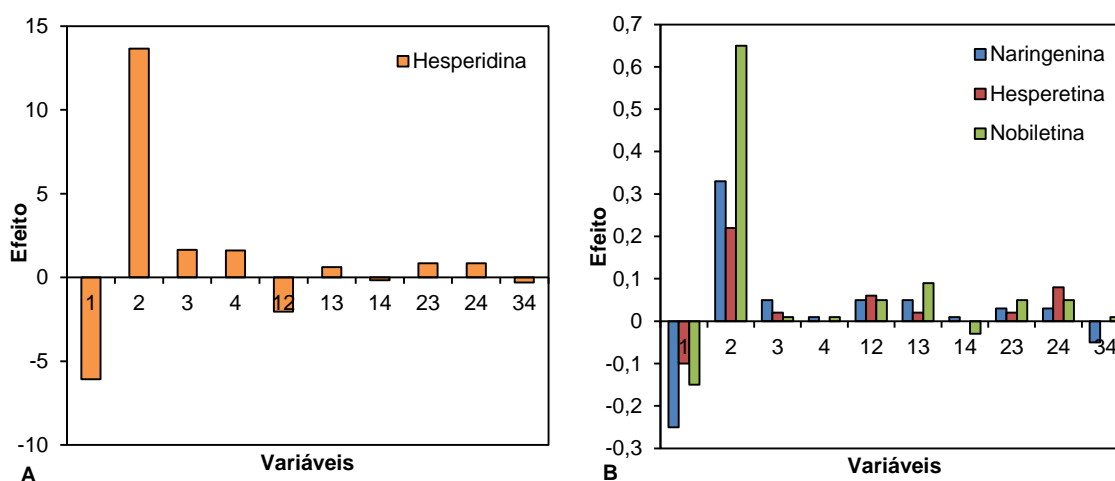


FIGURA 11. Gráfico de efeitos referente à extração convencional com homogeneização por ultra-turrax de hesperidina (A) e dos outros três flavonoides selecionados (B). As variáveis analisadas foram razão amostra/solvente (1), concentração de EtOH (2), tempo (3) e rotação (4).

Visualmente é possível perceber que no caso da hesperidina a variável 1 e as interações entre a variável 1 e 2, 1 e 4, 3 e 4 apresentam efeitos negativos ao sistema. Já as variáveis 2, 3 e 4, assim como as interações 1 e 3, 2 e 3, 2 e 4, apresentam efeitos positivos. Quando considerado a porcentagem que cada um desses efeitos representa, temos que o efeito da variável 1 é responsável por 15,7% e a variável 2 por 79,4%, enquanto que as demais variáveis e interações equivalem a uma porcentagem menor que 10% e, portanto, não representam um valor significativo para o sistema. Um resultado semelhante é encontrado para os demais flavonoides, com exceção da nobiletina, que apresenta apenas a variável 2 como sendo significativa.

Esse estudo do efeito das variáveis indica que a variável 1 (relação amostra/solvente), prejudica a extração à medida em que o seu nível aumenta. Ou seja, para uma extração mais eficiente, essa variável deve ser mantida em um nível mínimo: quanto menor for a relação amostra/solvente, melhor será a extração. Esse resultado está coerente com o princípio da transferência de massa, em que o principal responsável pela eficiência em transferir o analito da matriz sólida para o solvente é o gradiente de concentração entre o sólido e o líquido. Esse gradiente é maior quanto maior for a razão solvente/sólido (ou menor for a razão sólido/solvente) utilizada ao longo do processo de extração (MEIRELES, 2008). O mesmo foi verificado para a extração de flavonoides de resíduo de citrus (ASSEFA *et al.*, 2017) e no resíduo de uva realizado por Pinelo *et al.* (2005), mostrando uma melhoria na eficiência de extração à medida que aumentava o volume de solvente.

A variável 2 (concentração de etanol), apresentou um efeito positivo e, portanto, favorece a extração à medida em que o seu nível aumenta. Ou seja, para que a extração seja mais eficiente, essa variável deve ser mantida em um nível máximo. O etanol reduz a constante dielétrica da água, portanto quanto mais etanol, maior será a solubilidade e difusão desses flavonoides no solvente extrator (GARCIA-CASTELLO *et al.*, 2015), considerando uma solução binária de EtOH/H₂O. Assafa *et al.* (2017) avaliaram a eficiência de extração de flavonoides proveniente de casca de citrus, utilizando diferentes concentrações de etanol. Nesse estudo foi verificado um aumento na extração desses compostos à medida que a concentração de etanol aumentava. No entanto, um máximo de extração foi atingido quando utilizado solução 80% de etanol e, ao aumentar essa concentração, a eficiência da extração diminuiu. O mesmo foi observado na extração de flavonoides de própolis (PARK e IKEGAKI, 1998), que mostrou uma melhor eficiência de extração quando a concentração de etanol aumentava de 10 para 60% e um posterior decréscimo dessa eficiência ao continuar aumentando a concentração de etanol.

Vale ressaltar que nesse conjunto de experimentos não foi testada a condição de 100% etanol. Isso se deve ao fato da literatura (LI *et al.*, 2012) ter indicado que a água é responsável por promover um inchaço no material vegetal, o que resulta em um aumento da superfície de contato entre a matriz vegetal e o solvente, permitindo uma extração mais efetiva quando em presença de água. Além disso, o uso de etanol

puro poderia levar a uma desidratação e ao colapso das células vegetais, assim como a uma desnaturação das proteínas da parede celular, dificultando a difusão dos flavonoides da planta para o solvente extrator (GARCIA-CASTELLO *et al.*, 2015). Quando testadas soluções puras e aquosas de metanol e etanol, Zahoor *et al.* (2016) observaram que a eficiência de extração dos compostos antioxidantes provenientes de cinco diferentes tipos de citrus era maior em solução aquosa. Sendo assim, é possível inferir que, para que uma extração convencional com homogeneização por ultra-turrax seja o mais eficiente possível, ela deve manter um baixo nível da relação amostra/solvente, um alto nível de concentração de etanol e, como o tempo e a rotação do ultra-turrax não interferiram no sistema, essas variáveis também podem ser mantidas em um nível inferior. O conjunto de condições tido como ideal para a extração convencional pode ser representado pelo experimento 14. Ao analisar o resultado que esse experimento gerou, verifica-se que eles não são os resultados ótimos do planejamento fatorial, mas estão bastante próximos dos valores ótimos. A extração de hesperidina para esse experimento foi 14% inferior ao valor ótimo e a extração dos outros 3 flavonoides analisados 6%.

4.3.2 – Extração por micro-ondas

Os resultados obtidos mostram que a eficiência de extração pode sofrer uma grande variação de acordo com o conjunto de condições utilizadas para as variáveis independentes. Isso ficou mais evidente quando considerado o flavonoide majoritário, que apresentou uma eficiência de extração capaz de alcançar uma concentração da ordem de mg/g para um conjunto de condições, enquanto que para um outro conjunto extraiu menos que 0,5 mg/g. Apesar dessa diferença não ser tão pronunciada nos outros flavonoides ela ainda existe, uma vez que a melhor extração possui uma eficiência no mínimo 5 vezes maior do que a extração menos eficiente. Ou seja, dentre as condições trabalhadas, o aumento da temperatura promoveu uma melhor extração. A literatura mostra que a razão sólido/líquido apresenta um efeito na extração de nobiletina em um sistema de micro-ondas. Zhang *et al.* (2013) fazem esse estudo através da análise por superfície de resposta, identificando um aumento na eficiência de extração à medida em que a razão sólido/líquido decresce. A quantidade

de material vegetal seco interage com o campo eletromagnético e influencia diretamente o processo de transferência de energia. A energia das micro-ondas é absorvida e dispersa por uma maior quantidade de material seco, fazendo com que prejudique o processo (GAO *et.al.*, 2006) quando essa razão está muito elevada, e melhorando a extração ao diminuí-la. No entanto, quando um determinado ponto é atingido, essa eficiência de extração se inverte, diminuindo com o decréscimo da razão sólido/líquido. O mesmo perfil é observado por Zhang *et al.* (2009), que apresentou uma melhoria na extração de outros flavonoides quando a razão solvente/amostra foi aumentada de 20 para 40, atingindo um máximo em 40, e posterior decréscimo à medida que essa razão continuou sendo aumentada até chegar a 60. No entanto, é importante ressaltar que o aumento da temperatura não é linear, uma vez que os compostos fenólicos são sensíveis, ou seja, a alta temperatura e/ou pressão pode causar sua degradação ou alterar suas atividades biológicas (M'HIRI *et al.*, 2015). A literatura reporta que, de maneira geral, o aumento de temperatura ou potência na extração por micro-ondas promove um aumento na eficiência de extração até determinado ponto e, a partir desse ponto, tal eficiência regride (INOUE *et al.*, 2010; M'HIRI *et al.*, 2015). No entanto, a interação entre as variáveis pode interferir na degradação de determinado composto.

4.3.3 – Extração por ultrassom

As concentrações dos flavonoides presentes nos extratos de resíduo de laranja de cada experimento do planejamento fatorial da extração por ultrassom estão demonstradas na tabela 14. A tabela também indica a condição de cada variável utilizada em cada experimento individual.

TABELA 14. Resultados obtidos para os experimentos do planejamento fatorial da extração dos flavonoides selecionados, derivados do resíduo de laranja, por meio do método do ultrassom.

Experimento	Variáveis Independentes		Respostas			
	Tempo (min)	[EtOH] (%)	Hesperidina	Naringenina	Hesperetina	Nobiletina
			Concentração (mg/g)			
1	10	40	2,10	$1,12 \times 10^{-1}$	$6,46 \times 10^{-2}$	$1,69 \times 10^{-1}$
2	10	60	3,27	$1,25 \times 10^{-1}$	$8,46 \times 10^{-2}$	$1,91 \times 10^{-1}$
3	20	40	2,07	$1,13 \times 10^{-1}$	$7,30 \times 10^{-2}$	$1,61 \times 10^{-1}$
4	20	60	4,45	$1,57 \times 10^{-1}$	$1,09 \times 10^{-1}$	$2,35 \times 10^{-1}$
5	15	50	2,41	$1,24 \times 10^{-1}$	$8,42 \times 10^{-2}$	$1,91 \times 10^{-1}$
5	15	50	2,37	$1,24 \times 10^{-1}$	$8,22 \times 10^{-2}$	$1,90 \times 10^{-1}$
5	15	50	2,29	$1,12 \times 10^{-1}$	$7,28 \times 10^{-2}$	$1,65 \times 10^{-1}$
6	25	50	3,01	$1,10 \times 10^{-1}$	$7,37 \times 10^{-2}$	$1,64 \times 10^{-1}$
7	5	50	2,88	$1,05 \times 10^{-1}$	$7,03 \times 10^{-2}$	$1,64 \times 10^{-1}$
8	15	70	3,25	$1,35 \times 10^{-1}$	$8,57 \times 10^{-2}$	$2,12 \times 10^{-1}$
9	15	30	1,31	$8,22 \times 10^{-2}$	$4,91 \times 10^{-2}$	$1,13 \times 10^{-1}$

A/S = razão entre amostra e solvente

Assim como para a extração convencional, a extração por ultrassom também sofreu alteração significativa, principalmente quando observados os valores do flavonoide majoritário, a hesperidina. Conforme pode ser observado na tabela 15 o experimento 4 resultou em uma melhor extração desse composto, enquanto que o experimento 9 extraiu apenas 29% desse resultado. Quando avaliados os demais analitos essa diferença foi menor, mas a melhor eficiência de extração ainda apresenta-se como sendo o dobro do que o obtido pela extração menos eficiente. Apesar de apenas duas variáveis terem sido exploradas, foi possível construir um gráfico de efeito, apresentado na figura 12, para ilustrar o quanto que cada variável ou a interação entre as duas influenciam no sistema.

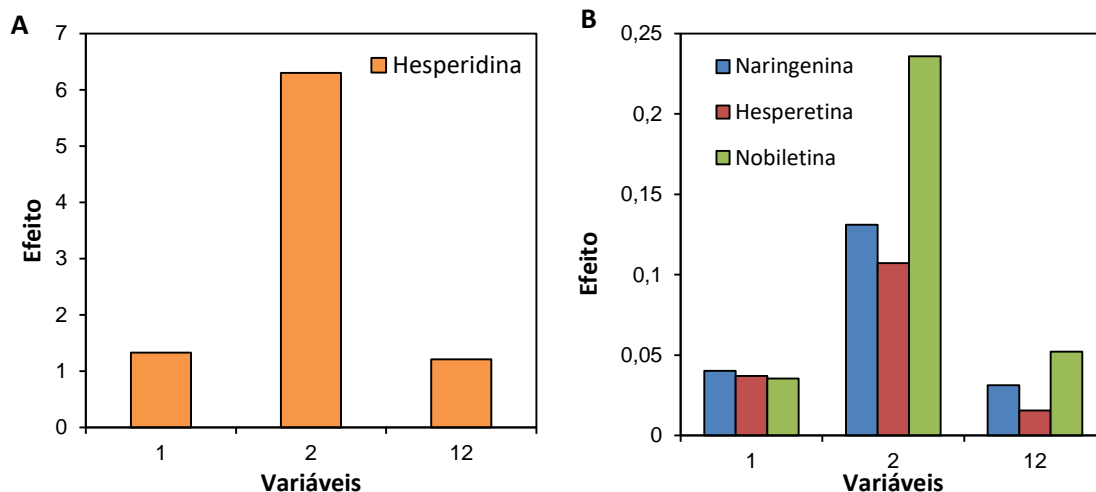


FIGURA 12. Gráfico de efeitos referente à extração por ultrassom de hesperidina (A) e dos outros três flavonoides selecionados (B). As variáveis analisadas foram tempo (1) e concentração de EtOH (2).

Ao analisar o gráfico de efeitos, é possível perceber que, as duas variáveis bem como a interação entre elas, apresentam efeitos positivos ao sistema. Apesar disso, a variável 2 possui um efeito predominante que equivale a aproximadamente 92% do efeito total para a hesperidina e 87%, 88% e 93% para naringenina, hesperetina e nobiletina, respectivamente. Isso significa que essa é a única variável significativa desse conjunto de experimentos para todos os analitos, exceto para a hesperetina que apresentou um efeito de 10% para a variável 1 (tempo).

Sendo assim, a extração por ultrassom é mais efetiva quanto maior for a composição hidro alcoólica de etanol (70%). Esse resultado está de acordo com o observado por Pan *et al.* (2012), que ao extraírem flavonoides da semente de espinheiro obtiveram como resultado que uma concentração de 72% de etanol era a melhor condição de extração desses compostos. Nesse trabalho a faixa de concentração escolhida foi de 55 a 85%, mostrando que um aumento na concentração de etanol gerou uma melhoria na eficiência de extração até atingir seu máximo, onde começou a prejudicar a extração. No entanto, concentrações menores de etanol foram preferidas em outros estudos. Huang *et al.* (2009) avaliaram o efeito da concentração de etanol variando de 20 a 100%. Os resultados obtidos mostraram que houve um aumento na eficiência de extração quando a concentração de etanol aumentou de 25 para 42% e esse perfil foi prejudicado quando a concentração estava mais elevada que 42%. De acordo com esses autores, o aumento da concentração de etanol favorece a

mudança de polaridade do solvente, o que levaria a um aumento na extração de impurezas. A concentração de etanol também foi uma variável avaliada por Yang *et al.* (2010), em uma otimização por superfície de resposta para a extração de flavonoides da flor de *Citrus aurantium*. Os resultados obtidos mostraram que a eficiência de extração aumentou com o aumento da concentração de etanol de 40 para 50%, mas diminuiu quando a concentração de etanol era superior a 50%.

O tempo de extração não influenciou a resposta da maioria dos analitos avaliados, e seu efeito foi muito próximo ao limite mínimo necessário para ser considerado significativo no caso da hesperetina. O mesmo foi observado para a extração de flavanonas de casca de tangerina (MAGWAZA *et al.*, 2016). O estudo foi feito com 150 mg de amostra seca em 5 mL de solvente e o tempo variou de 10 a 30 min, o que gerou um aumento na concentração de ácidos fenólicos, mas não alterou a concentração de flavanonas. Ma *et al.* (2008) avaliaram o rendimento de extração por ultrassom, para obtenção de hesperidina em casca de citrus e, ao utilizar uma ampla faixa de tempo em seus experimentos, puderam observar a importância dessa variável no sistema. Os resultados obtidos mostram que o tempo de extração foi bastante significativo quando aumentado de 20 para 60 min, tendo um grande aumento na eficiência de extração. No entanto, quando esse tempo de extração foi continuamente aumentado de 60 para 160 min o rendimento de extração não sofreu alteração significativa. Esse perfil foi observado nas três frequências testadas, mas foi menos acentuado na frequência menor, tendo uma mudança mais sutil na eficiência de extração com o acréscimo de tempo. Esse comportamento pode ser relacionado ao fato do ultrassom melhorar, de maneira significativa, a taxa extração, fazendo com que o equilíbrio seja atingido em tempos curtos (GARCIA-CASTELLO *et al.*, 2015). Isso indica que a faixa escolhida para avaliar a concentração dos analitos escolhidos pode ter sido muito reduzida, ou que o equilíbrio de extração tenha sido atingido com pouco tempo de extração.

Os experimentos 2, 4 e 8 são os que apresentam os três melhores resultados de extração dos flavonoides analisados e todos esses apresentam maiores níveis da variável 2.

4.3.4 - Comparação entre os métodos de extração investigados para a quantificação de flavonoides de interesse em resíduos de casca de laranja

Para fins de comparação foram utilizados os resultados das melhores extrações dos analitos de interesse obtidos a partir de cada método. Assim, para o método convencional com homogeneização por ultra-turrax escolheu-se o experimento 14, que apresentava cada variável no seu nível ótimo desejado. No caso do ultrassom foram utilizados os resultados obtidos no experimento 8, uma vez que apresentava o maior nível da variável tida como significativa. O mesmo foi feito para a extração por micro-ondas, em que o experimento 7 foi escolhido. Os resultados estão apresentados na tabela 15 e ilustrados na figura 14.

TABELA 15. Comparação das concentrações dos flavonoides de interesse presentes no extrato do resíduo de laranja, de acordo com para cada metodologia avaliada e validada.

Método de extração	Rendimento de extração (mg/g)			
	Hesperidina	Naringenina	Hesperetina	Nobiletina
Convencional	$3,43 \times 10^0 \pm 1,68 \times 10^{-1}$	$1,73 \times 10^{-1} \pm 3,51 \times 10^{-3}$	$9,36 \times 10^{-2} \pm 2,93 \times 10^{-3}$	$2,32 \times 10^{-1} \pm 5,20 \times 10^{-3}$
Ultrassom	$3,25 \times 10^0 \pm 6,11 \times 10^{-2}$	$1,35 \times 10^{-1} \pm 6,93 \times 10^{-3}$	$8,57 \times 10^{-2} \pm 6,09 \times 10^{-3}$	$2,12 \times 10^{-1} \pm 1,47 \times 10^{-3}$

Esses resultados indicam que a hesperidina é o flavonoide majoritário dentre os 4 analisados, independente da metodologia aplicada, como também verificado por Nogata *et al.* (2006) e Escobedo-Avellaneda *et al.* (2014). No entanto, a extração por micro-ondas foi significativamente mais efetiva para a extração de hesperidina, hesperetina e nobiletina, quando comparada com as outras técnicas. Essa extração promoveu uma quantidade 6 vezes maior do que a obtida por meio dos outros métodos para o primeiro analito, 1,7 para o segundo e foi 1,2 vezes mais efetiva para o terceiro. Já a extração por ultrassom, mostrou-se menos eficiente do que a convencional com homogeneização por ultra-turrax para todos os analitos. A melhoria na eficiência de extração desses compostos pela técnica de micro-ondas foi também descrita por M'hiri *et al.* (2015). Em seu trabalho, os autores compararam diversas técnicas de extração de flavonoides, dentre as quais a extração por ultrassom e micro-

ondas estavam inseridas, além da extração sólido-líquido convencional. No entanto, diferentemente do que foi obtido no presente trabalho, M'hiri *et al.* (2015) verificaram que a extração por ultrassom foi mais efetiva do que a convencional. Quando comparadas as duas metodologias, a extração por ultrassom pode aumentar significativamente a eficiência de extração. Ao utilizar uma potência de 100 W no banho de ultrassom, a extração de hesperidina foi 1,5 vezes maior do que a obtida pela extração convencional. Um resultado semelhante foi apresentado para a nobiletina, que teve um rendimento de extração 1,7 vezes maior quando utilizado o ultrassom nessa mesma potência.

Zhu *et al.* (2010) também comparam diferentes técnicas para a extração de flavonoides em plantas medicinais. Dentre as diversas técnicas avaliadas, a extração por maceração, ultrassom e micro-ondas são as que se assemelham a esse trabalho. Apesar desses autores terem mudado drasticamente o tempo de extração para cada técnica, os resultados foram bastante semelhante entre si, com o micro-ondas tendo a melhor eficiência de extração. É importante destacar que esse trabalho buscava uma técnica não só eficiente, mas que fosse vantajosamente mais rápida. Os resultados obtidos mostraram que a extração por micro-ondas durando 9 min é mais efetiva do que a extração por ultrassom em 60 min e maceração em 48 h. Assim, a extração por micro-ondas pode ser considerada uma técnica rápida e eficiente.

Em seu estudo sobre a influência dos métodos de extração na estabilidade dos flavonoides, Biesaga (2011) avalia a diferença na alteração estrutural da amostra após o processo de extração por cada técnica. De acordo com esse autor, a técnica convencional de extração sólido-líquido, baseada em refluxo de solvente aquecido, faz com que a extração ocorra por permeação do solvente na amostra e solubilização dos analitos a uma elevada temperatura. Assim, essa técnica promove uma micro-destruição na amostra, formando pequenas rupturas na sua superfície, mas não deixando a amostra muito diferente do original. Já a extração por ultrassom se destaca pelo efeito mecânico da técnica, que promove uma penetração mais efetiva do solvente dentro do material celular, através dos efeitos de cavitação, favorecendo a liberação dos analitos para o solvente. O ultrassom, de acordo com Biesaga (2011), induz subseqüentes mudanças na superfície, gerando uma grande quantidade de fendas no material vegetal. Essas mudanças facilitam a ruptura do material vegetal e

melhoram a liberação dos analitos para o solvente, mas a superfície da amostra após utilizar essa técnica fica destruída. A extração por micro-ondas, por sua vez, causa uma maior destruição do que a extração convencional, mas é menos agressiva do que a extração por ultrassom. A principal característica dessa técnica é o aumento repentino de temperatura e o conseqüente aumento de pressão interna, promovendo a liberação dos analitos no solvente, uma vez que a parede do material vegetal se rompe.

4.3.5 - Estrela Verde

A potencialidade de uma técnica ser efetivamente verde varia de acordo com uma série de fatores, tais como a natureza química dos seus componentes, caráter ambiental, energia desprendida, entre outros. Sendo assim, faz-se necessário o uso de uma métrica para a comparação das diferentes metodologias. A Estrela Verde se adequa a essa necessidade, uma vez que é baseada nos princípios da química verde. Assim, a Estrela Verde é constituída por uma estrela com tantas pontas quantas forem necessárias para analisar os Princípios da Química Verde desejados, sendo destinada uma ponta para cada princípio (RIBEIRO *et al.*, 2010). Para a construção da estrela verde é necessário medir os riscos e gastos de cada substância envolvida na metodologia. Nesse sentido, atribui-se um valor de 1 a 3 (máximo de grau verde) a cada um dos doze Princípios da Química Verde, de acordo com os critérios disponíveis no Anexo 1 (RIBEIRO *et al.*, 2010). No caso de atividades laboratoriais que não envolvam sínteses, o número de princípios fica reduzido a seis (RIBEIRO e MACHADO, 2014). A área da estrela calculada para cada extração está indicada na figura 13.

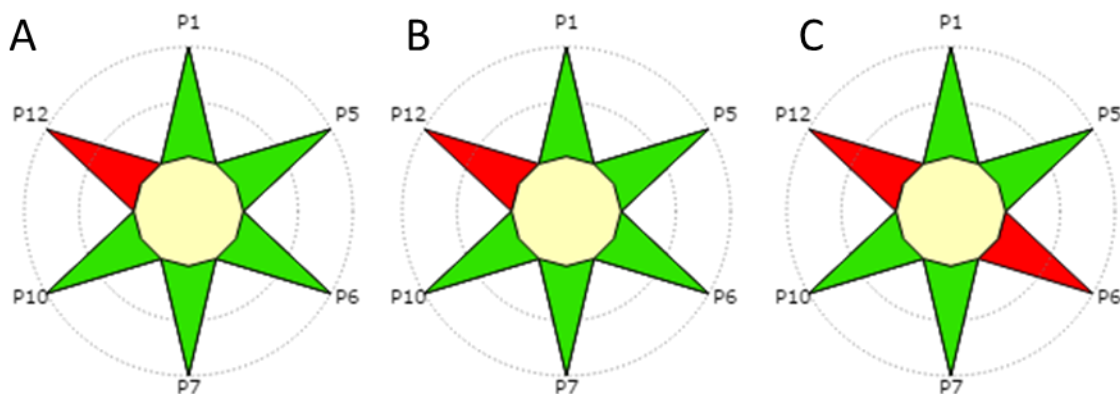


FIGURA 13. Estrela Verde com áreas calculadas para a extração convencional com homogeneização por ultra-turrax (A), ultrassom (B) e micro-ondas (C).

A comparação entre as áreas possibilita perceber que o método de extração por ultrassom se aproxima ao método convencional e que o método de extração por micro-ondas destacou-se como a opção menos verde. Isso se deve ao fato de que os três métodos apresentam a mesma área em 5 das 6 pontas referentes aos princípios da química verde, diferenciando apenas no princípio 6 - Planificação para conseguir eficácia energética. Nesse princípio foi atribuído o menor valor de grau verde para a extração por micro-ondas, uma vez que ela utiliza elevada temperatura e pressão.

5 – Considerações Finais

Os resíduos de citrus oferecem uma quantidade e variedade significativa de materiais de elevado valor agregado. O estado de São Paulo, responsável por 72% da produção brasileira e um dos líderes mundiais, possui um lugar de destaque para estudos que têm como meta o isolamento de produtos naturais a partir de biomassa residual, caso de bagaço e casca de laranja. Como objetivado, neste trabalho foram desenvolvidos, validados e aplicados métodos verdes de extração de 4 flavonoides que se encontram em quantidades expressivas em resíduos de laranja. As técnicas de extração verdes foram otimizadas, com a meta de se verificar a melhor condição de extração para cada método. A aplicação de ferramentas quimiométricas, tais como os planejamentos fatoriais e gráficos de efeitos ocupou um lugar de destaque para o desenvolvimento desse trabalho. Isso porque elas permitiram que, com um número reduzido de experimentos, pudesse ser investigada a interação multivariada entre os diversos fatores que afetam uma extração. Além disso, foi possível entender quanto que cada variável interfere em cada uma das técnicas estudadas.

Assim, no contexto desse trabalho é válido ressaltar que a extração convencional com homogeneização por ultra-turrax apresentou dependência maior da concentração do solvente e da razão amostra/solvente frente às outras variáveis estudadas. Estes resultados foram compatíveis com os apresentados na literatura, uma vez que se adequa ao princípio da transferência de massa e as características de solubilidade do solvente. No entanto, estudos têm mostrado que quando extrapolada a faixa de concentração, o efeito do solvente no sistema pode ter uma resposta contrária, diminuindo a eficiência da remoção dos analitos. Entende-se então que para uma maior exploração dessa variável na metodologia de extração convencional, uma faixa maior deve ser aplicada, esperando encontrar um ponto máximo a partir do qual a eficiência de extração sofre um declínio. Esse declínio é esperado uma vez que concentrações altas de solventes orgânicos podem causar desidratação e colapso do material vegetal e desnaturação das proteínas da parede celular, o que dificultaria a difusão dos analitos da amostra para o solvente extrator.

Já na extração por micro-ondas, as condições fornecidas pelo planejamento fatorial apresentaram resultados bastante distintos. O uso do gráfico de efeitos permitiu avaliar a magnitude da interferência de cada variável e entender porque os experimentos tiveram comportamentos tão variados. A literatura apresenta resultados semelhantes nesse sentido, pois quando feitas avaliações de flavonoides individuais essa diferença em relação à concentração para cada composto é um fator que se mostra presente. Já quando a avaliação se dá por flavonoides totais, ou atividade antioxidante, a literatura considera que a eficiência de extração melhora em função do solvente. Além das consequências relacionadas com o material vegetal, já discutidas em relação à extração convencional, o solvente interfere na absorção e dissipação das micro-ondas durante a extração. A água tem uma maior habilidade, em relação ao etanol, em absorver a energia das micro-ondas; o efeito da razão amostra/solvente não foi significativo para essa metodologia, apesar de estudos anteriores mostrarem que o material vegetal sofre interferência do campo eletromagnético, podendo influenciar na transferência de energia e melhorar a eficiência de extração quanto menor for essa relação. Entende-se que para poder avaliar melhor essa variável, uma faixa maior deve ser aplicada ao estudo.

Por fim, para a extração por ultrassom as variáveis tempo e solvente foram exploradas. O tempo foi uma variável significativa apenas para um dos analitos estudados, mas, com efeito, bastante próximo ao limite considerado significativo. A literatura mostra que o tempo não afeta a eficiência de extração quando a sua mudança não é drástica. Ou seja, variando até 30 min o tempo de extração não parece interferir no sistema, mas quando a extração dura cerca de 1 h é possível ver algumas mudanças com relação às concentrações dos analitos nos extratos. Isso, no entanto, só ocorre se o equilíbrio da extração já não for atingido em um tempo curto, característica para essa técnica. A concentração de etanol, no entanto, foi significativa e teve um efeito positivo para todos os analitos, mostrando que a eficiência de extração aumenta à medida que se aumenta a concentração de etanol. Assim como na extração convencional com homogeneização por ultra-turrax, a literatura mostra que a mudança da polaridade do solvente é o principal fator que justifica esse comportamento, mas que muitas vezes essa característica faz com que ocorra a extração de impurezas, além do analito de interesse, prejudicando a extração e uso posterior da fração obtida.

As três técnicas mostraram que o solvente extrator tem um efeito bastante relevante para a extração desses analitos. De maneira similar, a variável tempo não apresentou efeito significativo para os três casos estudados. Quando os métodos foram avaliados de acordo com o seu caráter verde, a extração por micro-ondas apresentou uma estrela de menor grau verde. Isso se deve exclusivamente ao princípio 6 avaliado - Planificação para conseguir eficácia energética. Devido o uso da temperatura a 150°C, essa ponta da estrela recebeu a pontuação mínima de benignidade. Isso, por sua vez, pode ser compensado quando avaliado seu caráter analítico, tais como sua eficiência de extração e precisão, que estão fora da estrela e foram discutidos anteriormente.

6 – Referências

- ANASTAS, P. T. "Green chemistry and the role of analytical methodology development". *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **29**:167, 1999.
- ANASTAS, P. T.; WILLIAMSON, T. S. "Green Chemistry: Designing Chemistry for the Environment". Washington DC: ACS, 1994, p.1-15.
- ASSEFA, A. D., SAINI, R. K., & KEUM, Y. S. "Extraction of antioxidants and flavonoids from yuzu (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka) peels: a response surface methodology study". *Food Measure*. **11**: 364, 2017.
- ATTARD, T. M., WATTERSON, B., BUDARIN, V. L., CLARK, J. H., & HUNT, A. J. "Microwave assisted extraction as an important technology for valorising orange waste". *New J. Chem.*, **38**:2278, 2014.
- BALU, A. M., BUDARIN, V., SHUTTLEWORTH, P. S., PFALTZGRAFF, L. A., WALDRON, K., LUQUE, R., & CLARK, J. H. "Valorisation of orange peel residues: waste to biochemicals and nanoporous materials". *ChemSusChem*, **5**:1694, 2012.
- BICU, I.; MUSTATA, F. "Cellulose extraction from orange peel using sulfite digestion reagents". *Bioresour. Technol.*, **102**:10013, 2011.
- BIESAGA, M. "Influence of extraction methods on stability of flavonoids". *J. Chromatogr. A*. **1218**: 2512, 2011.
- BILBAO, Maria de Lourdes Mata et al. "Determination of flavonoids in a Citrus fruit extract by LC–DAD and LC–MS". *Food Chem.*, **101**:1742, 2007.
- BOUKROUFA, M., BOUTEKEDJIRET, C., Petigny, L., RAKOTOMANOMANA, N., & CHEMAT, F. "Bio-refinery of orange peels waste: a new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin". *Ultrason. Sonochem.*, **24** : 72, 2015.
- CANTERINO, S., DONNO, D., MELLANO, M. G., BECCARO, G. L., & BOUNOUS, G. "Nutritional and sensory survey of *Citrus sinensis* (L.) cultivars grown at the most Northern limit of the Mediterranean latitude". *J. Food Qual.*, **35** : 108, 2012.
- CASS, Q. B. e CASSIANO, N. "Cromatografia Líquida: Novas tendências e aplicações". 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- CHAN, C. H., LIM, J. J., YUSOFF, R., & NGOH, G. C. "A generalized energy-based kinetic model for microwave-assisted extraction of bioactive compounds from plants". *Sep. Purif. Technol.*, **143**:152, 2015.
- CHEMAT, F., ROMBAUT, N., SICAIRE, A. G., MEULLEMIESTRE, A., FABIANO-TIXIER, A. S. e ABERT-VIAN, M. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review". *Ultrason. Sonochem.*, **34**:540, 2017.
- CHEMAT, F., VIAN, M. A., & CRAVOTTO, G. "Green extraction of natural products: concept and principles". *Int. J. Mol. Sci.* **13**:8615, 2012.
- CHEN, J., ZHANG, H., PANG, Y., CHENG, Y., DENG, X., & XU, J. "Comparative study of flavonoid production in lycopene-accumulated and blonde-flesh sweet oranges (*Citrus sinensis*) during fruit development". *Food Chem.*, **184**:238, 2015.

- CHINAPONGTITIWAT, V., JONGAROONTAPRANGSEE, S., CHIEWCHAN, N., & DEVAHASTIN, S. "Important flavonoids and limonin in selected Thai citrus residues". *Journal of Functional Foods*, **5**:1151, 2013.
- CHUST, R. B. "Introdução à Cromatografia de Líquidos (HPLC)". *Boletim SPQ*, **39**:43, 1990.
- CLARK, J. H., FITZPATRICK, E. M., MACQUARRIE, D. J., PFALTZGRAFF, L. A., & SHERWOOD, J. "p-Cymenesulphonic acid: An organic acid synthesised from citrus waste". *Catal. Today*, **190**:144, 2012b.
- CLARK, J. H., MACQUARRIE, D. J., & SHERWOOD, J. "A quantitative comparison between conventional and bio-derived solvents from citrus waste in esterification and amidation kinetic studies. *Green Chem.*, **14**:90, 2012a.
- 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** : 1625, 2013.
- CLARK, J., EI DESWARTE, F., & J FARMER, T. "The integration of green chemistry into future biorefineries". *Biofuels, Bioprod. Biorefin.*, **3**: 72, 2009.
- COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S.; *Fundamentos de Cromatografia*, Ed. da Unicamp: Campinas, 2006.
- CORRÊA, A. G.; ZUIN, V. G. "Química Verde: fundamentos e aplicações". 1 ed. São Carlos: EDUFSCar. 2009.
- CRAVOTTO, G; CINTAS, P. "Power ultrasound in organic synthesis: moving cavitation chemistry from academia to innovative and large-scale applications". *Chem. Soc. Rev.*, **35**:180, 2006.
- CRIZEL, T. D. M., RIOS, A. D. O., THYS, R. C. S., & FLÔRES, S. H. " Effects of orange by-product fiber incorporation on the functional and technological properties of pasta". *Food Sci. Technol.***35** : 546, 2015.
- DHAMOLE, P. B., CHAVAN, S., PATIL, R. G., FENG, H., BULE, M., & KINNINGE, P. "Extraction of p-coumaric acid from agricultural residues and separation using 'sugaring out'". *Korean J. Chem. Eng.*, **33**:1860, 2016.
- DONG, M. W. "Modern HPLC for practicing scientists". Wareham: John Wiley & Sons, 2006.
- DOS SANTOS, A. C. "A Agrofloresta Agroecológica: Um momento de síntese da agroecologia, uma agricultura que cuida do meio ambiente". *Boletim eletrônico – Conjuntura Agrícola* 2007.
- ESCLAPEZ, M. D., GARCÍA-PÉREZ, J. V., MULET, A., & CÁRCEL, J. A. "Ultrasound-assisted extraction of natural products". *Food Eng. Rev.***3**:108, 2011.
- ESCOBEDO-AVELLANEDA, Z., GUTIÉRREZ-URIBE, J., VALDEZ-FRAGOSO, A., TORRES, J. A., & WELTI-CHANES, J. "Phytochemicals and antioxidant activity of juice, flavedo, albedo and comminuted orange". *J. Funct. Foods*. **6**: 470, 2014.
- FARIAS, L. A., & FÁVARO, D. I.. "Vinte anos de química verde: conquistas e desafios". *Química Nova*, **34**, 2011.
- FERREIRA-LEITAO, V., GOTTSCHALK, L. M. F., FERRARA, M. A., NEPOMUCENO, A. L., MOLINARI, H. B. C., & BON, E. P. "Biomass residues in Brazil: availability and potential uses". *Waste Biomass Valorization*, **1**:65, 2010.
- FIDALGO, A., CIRIMINNA, R., CARNAROGLIO, D., TAMBURINO, A., CRAVOTTO, G., GRILLO, G. & PAGLIARO, M. "Eco-Friendly Extraction of Pectin and Essential Oils from Orange and Lemon Peels". *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **4**:2243, 2016.

- GAŁUSZKA, A., MIGASZEWSKI, Z., & NAMIEŚNIK, J. "The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **50**:78, 2013.
- GAO, M., SONG, B. Z., & LIU, C. Z. "Dynamic microwave-assisted extraction of flavonoids from *Saussurea medusa* Maxim cultured cells". *Biochem. Eng. J.* **32**: 79, 2006.
- GARCIA-CASTELLO, E. M., RODRIGUEZ-LOPEZ, A. D., MAYOR, L., BALLESTEROS, R., CONIDI, C., & CASSANO, A. "Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes". *LWT-Food Sci. Technol.*, **64**: 1114, 2015.
- GATTUSO, G., BARRECA, D., GARGIULLI, C., LEUZZI, U., & CARISTI, C. "Flavonoid composition of citrus juices". *Molecules*, **12**:1641, 2007.
- GOULA, A. M., VERVERI, M., ADAMOPOULOU, A., & KADERIDES, K. "Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils". *Ultrason. Sonochem.*, **34**:821, 2017.
- GUIDELINE, ICH Harmonized Tripartite et al. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1), v. 1, 2005.
- GUNESER, B. A., & YILMAZ, E. "Bioactives, Aromatics and Sensory Properties of Cold-Pressed and Hexane-Extracted Lemon (*Citrus Limon* L.) Seed Oils". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **94**:723, 2017.
- HAYAT, K., ZHANG, X., CHEN, H., XIA, S., JIA, C., & ZHONG, F. "Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity". *Sep. Purif. Technol.*, **73**: 371, 2010.
- HUANG, W., XUE, A., NIU, H., JIA, Z., & WANG, J. "Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro". *Food Chem.* **114**: 1147, 2009.
- HUNTER, D., FOSTER, M., MCARTHUR, J. O., OJHA, R., PETOCZ, P., & SAMMAN, S. "Evaluation of the micronutrient composition of plant foods produced by organic and conventional agricultural methods". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **51**: 571, 2011.
- INOUE, T., TSUBAKI, S., OGAWA, K., ONISHI, K., & AZUMA, J. I. "Isolation of hesperidin from peels of thinned *Citrus unshiu* fruits by microwave-assisted extraction". *Food Chem.*, **123**: 542, 2010.
- IRKIN, R., DOGAN, S., DEGIRMENCIOGLU, N., DIKEN, M. E., & GULDAS, M. "Phenolic content, antioxidant activities and stimulatory roles of citrus fruits on some lactic acid bacteria". *Archives of Biological Sciences*, **67**:1313, 2015.
- KARACABEY, E., & MAZZA, G. "Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology". *Food Chem.* **119**: 343, 2010.
- KIM, J. K., BAIK, M. Y., HAHM, Y. T., & KIM, B. Y. Development and optimization of a drink utilizing *Citrus unshiu* peel extract. *J. Food Process Eng.*, **35**: 557, 2012.
- LEDESMA-ESCOBAR, C. A., & DE CASTRO, M. D. L. "Towards a comprehensive exploitation of citrus". *Trends Food Sci. Technol.* **39**: 63, 2014.
- LEDESMA-ESCOBAR, C. A., PRIEGO-CAPOTE, F., & DE CASTRO, M. D. L. "Comparative study of the effect of sample pretreatment and extraction on the determination of flavonoids from lemon (*Citrus limon*)". *PloS one*, **11**:e0148056, 2016.
- LEGUA, P., FORNER, J. B., HERNÁNDEZ, F., & FORNER-GINER, M. A. "Total phenolics, organic acids, sugars and antioxidant activity of mandarin (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.): Variation from rootstock." *Sci. Hortic.* **174**:60, 2014.

- LEITE, F. Validação em análise química. Campinas, SP: Editora Átomo, 2008. 5ª edição.
- LI, S., LO, C. Y., & HO, C. T. "Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel". *J. Agric. Food Chem.*, **54**:4176, 2006.
- LI, W., WANG, Z., WANG, Y. P., JIANG, C., LIU, Q., SUN, Y. S., & ZHENG, Y. N. "Pressurised liquid extraction combining LC–DAD–ESI/MS analysis as an alternative method to extract three major flavones in *Citrus reticulata* 'Chachi'(Guangchenpi)". *Food Chem*, **130**:1044, 2012.
- LIEW, S. Q., CHIN, N. L., YUSOF, Y. A., & SOWNDHARARAJAN, K. "Comparison of Acidic and Enzymatic Pectin Extraction from Passion Fruit Peels and Its Gel Properties". *J. Food Process Eng.* **39**: 501, 2016.
- LIN, C. S. K., PFALTZGRAFF, L. A., HERRERO-DAVILA, L., MUBOFU, E. B., ABDERRAHIM, S., CLARK, J. H., & THANKAPPAN, S. "Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective". *Energy Environ. Sci.*, **6**:464, 2013.
- M'HIRI, N., IOANNOU, I., BOUDHRIOUA, N. M., & GHOUL, M. "Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel." *Food Bioprod. Process.* **96**:161, 2015.
- MA, Y., YE, X., HAO, Y., XU, G., XU, G., e LIU, D. "Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel". *Ultrason. Sonochem.* **15**:227, 2008.
- MADEIRA, J. V., & MACEDO, G. A. "Simultaneous extraction and biotransformation process to obtain high bioactivity phenolic compounds from brazilian citrus residues". *Biotechnol. Prog.* **31**:1273, 2015.
- MAGWAZA, L. S., OPARA, U. L., CRONJE, P. J., LANDAHL, S., ORTIZ, J. O., e TERRY, L. A. "Rapid methods for extracting and quantifying phenolic compounds in citrus rinds". *Food Sci. Nutr.* **4**: 4, 2016.
- MANDAL, V., MOHAN, Y., & HEMALATHA, S. "Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research". *Pharmacogn. Rev.*, **1**:7, 2007.
- MARIKO, N., HASSIMOTTO, A., & LAJOLO, F. M. "Brazilian Native Fruits as a Source of Phenolic Compounds". In: *Global Food Security and Wellness*. New York: Springer, 2017. p. 105-124.
- MASON, T. J. "Some neglected or rejected paths in sonochemistry—A very personal view". *Ultrason. Sonochem.* **25**:89, 2015.
- MASON, T. J. e VINATORU, M. "Ultrasonically Assisted Extraction in Food Processing and the Challenges of Integrating Ultrasound into the Food Industry. *Ultrasound in Food Processing: Recent Advances*". Chichester: John Wiley & Sons. p. 329-353. 2017
- MEIRELES, M. Angela A. (Ed.). *Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications*. London: CRC press. 2008.
- MERKEN, H. M., & BEECHER, G. R. "Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review". *J. Agric. Food Chem.* **48**:577, 2000.
- Michael W. Dong. "Modern HPLC for Practicing Scientists". Ed. John Wiley & Sons, 2006.
- MILUTINOVIĆ, M., RADOVANOVIĆ, N., RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M., ŠILER-MARINKOVIĆ, S., DIMITRIJEVIĆ, S., & DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ, S. "Microwave-

- assisted extraction for the recovery of antioxidants from waste *Equisetum arvense*". *Ind. Crops Prod.*, **61**:388, 2014.
- MITCHELL, A. E., HONG, Y. J., KOH, E., BARRETT, D. M., BRYANT, D. E., DENISON, R. F., e 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**: 6154, 2007.
- MIYATA, Y., SATO, T., IMADA, K., DOBASHI, A., YANO, M. e ITO, A. "A citrus polymethoxyflavonoid, nobiletin, is a novel MEK inhibitor that exhibits antitumor metastasis in human fibrosarcoma HT-1080 cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**: 168, 2008.
- MOLINA-CALLE, M., PRIEGO-CAPOTE, F., & DE CASTRO, M. D. L.. "Development and application of a quantitative method for determination of flavonoids in orange peel: Influence of sample pretreatment on composition". *Talanta*, **144**:349, 2015.
- NADAGOUDA, M. N., SPETH, T. F., & VARMA, R. S. "Microwave-assisted green synthesis of silver nanostructures". *Acc. Chem. Res.*, **44**:469, 2011.
- NÜCHTER, M., ONDRUSCHKA, B., BONRATH, W., & GUM, A. "Microwave assisted synthesis—a critical technology overview". *Green Chem.*, **6**:128, 2004.
- PAN, G., YU, G., ZHU, C., e QIAO, J. "Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS)". *Ultrason. Sonochem.* **19**: 486, 2012.
- PAPOUTSIS, K., PRISTIJONO, P., GOLDING, J. B., STATHOPOULOS, C. E., SCARLETT, C. J., BOWYER, M. C., & VAN VUONG, Q. "Impact of different solvents on the recovery of bioactive compounds and antioxidant properties from lemon (*Citrus limon* L.) pomace waste". *Food Sci. Biotechnol.* **25**: 971, 2016.
- PARK, Y. K., & IKEGAKI, M. "Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations". *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **62**: 2230, 1998.
- PFALTZGRAFF, L. A., COOPER, E. C., BUDARIN, V., & CLARK, J. H. "Food waste biomass: a resource for high value chemicals". *Green Chem.* **15**:307, 2013.
- PFALTZGRAFF, Lucie. The study & development of an integrated & additive-free waste orange peel biorefinery. University of York. 2014. Tese de Doutorado.
- PHAM, T. P. T., KAUSHIK, R., PARSHETTI, G. K., MAHMOOD, R., & BALASUBRAMANIAN, R. "Food waste-to-energy conversion technologies: Current status and future directions". *Waste Management*, **38**:399, 2015.
- PINELO, M., RUBILAR, M., JEREZ, M., SINEIRO, J., & NÚÑEZ, M. J. "Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace". *J. Agric. Food Chem.* **53**: 2111, 2005.
- REGANOLD, J. P., ANDREWS, P. K., REEVE, J. R., CARPENTER-BOGGS, L., SCHADT, C. W., ALLDREDGE, J. R. e ZHOU, J. "Fruit and soil quality of organic and conventional strawberry agroecosystems". *PLoS One*. **5**:12346, 2010.
- RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., & MELO, L. F. C. "Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos". *Quim. Nova*, **27**:771, 2004.
- RIBEIRO, M., COSTA, D., MACHADO, A. "Uma métrica gráfica para avaliação holística da verdura de reações laboratoriais – 'Estrela Verde'". *Quím. Nova*, São Paulo **33**:759-764, 2010.
- RIBEIRO, M., MACHADO, A. (2014) Disponível em:
<http://educa.fc.up.pt/catalogo/pt/construcao_ev> Acessado em junho/2017.

- RIVAS-CANTU, R. C., JONES, K. D., & MILLS, P. L. "A citrus wastebased biorefinery as a source of renewable energy: technical advances and analysis of engineering challenges". *Waste Manage. Res.* **31**:413, 2013.
- ROUTRAY, W., & ORSAT, V. Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food Bioprocess Technol.*, **5**:409, 2012.
- RUSSO, M., BONACCORSI, I., INFERRERA, V., DUGO, P., & MONDELLO, L. "Underestimated sources of flavonoids, limonoids and dietary fiber: Availability in orange's by-products". *Journal of Functional Foods*, **12**:150, 2015.
- SANTOS-BUELGA, C., & FELICIANO, A. S. "Flavonoids: From Structure to Health Issues". *Molecules*, **22**:477, 2017
- SARKER, S. D., LATIF, Z., GRAY, A. I. "Natural products isolation". 2 ed. New Jersey: Humana Press, 2006. p.28-32.
- SHAH, N. N. A. K., RAHMAN, R. A., SHAMSUDDIN, R., & ADZAHAN, N. M. "Effects of pectinase clarification treatment on phenolic compounds of pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) fruit juice". *Journal of food science and technology*, **52**:5057, 2015.
- SHAMLOO, M. M., SHARIFANI, M., GARMAKHANY, A. D., & SEIFI, E "Alternation of secondary metabolites and quality attributes in Valencia Orange fruit (*Citrus sinensis*) as influenced by storage period and edible covers". *Journal of food science and technology*, **52**:1936, 2015.
- SHELDON, R. A. "Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design". *Chem. Soc. Rev.*, **41**:1437, 2012.
- SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **53**:10, 2012.
- SORIA, A. C.; VILLAMIEL, M." Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review". *Trends Food Sci. Technol.*, **21**:323, 2010.
- TAROZZI, A., HRELIA, S., ANGELONI, C., MORRONI, F., BIAGI, P., GUARDIGLI, M. e HRELIA, P. "Antioxidant effectiveness of organically and non-organically grown red oranges in cell culture systems". *Eur. J. Nutr.* **45**:152, 2006.
- TATKE, P.; JAISWAL, Y. An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug research. *Res. J. Med. Plant*, **5**:21, 2011.
- THOMPSON, M., ELLISON, S. L., FAJGELJ, A., WILLETTS, P., & WOOD, R.. "Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement." *Pure Appl. Chem.*, **71**: 337, 1999.
- TOBISZEWSKI, M., MECHLIŃSKA, A., ZYGMUNT, B., & NAMIEŚNIK, J. "Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **28**:943, 2009.
- TOH, P. Y., LEONG, F. S., CHANG, S. K., KHOO, H. E., & YIM, H. S. "Optimization of extraction parameters on the antioxidant properties of banana waste." *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, **15**:65, 2016.
- TRIPODO, M. M., LANUZZA, F., MICALI, G., COPPOLINO, R., & NUCITA, F. "Citrus waste recovery: a new environmentally friendly procedure to obtain animal feed". *Bioresour. Technol.*, **91**:111, 2004.
- USDA. Valdes C. Trade Brazil. In: Economic Research Service. United State Department Agriculture. 2015. Disponível em <www.ers.usda.gov/topics/international-markets-trade/countries-regions/brazil/trade.aspx> Acesso junho/2017.

- VEGGI, P. C.; MARTINEZ, J.; MEIRELES, M. A. A. "Fundamentals of microwave extraction". In: Microwave-assisted extraction for bioactive compounds. Springer US, 2012. p. 15-52.
- WANG, Y. L., XI, G. S., ZHENG, Y. C., & MIAO, F. S. "Microwave-assisted extraction of flavonoids from Chinese herb *Radix puerariae* (Ge Gen)". *J. Med. Plants Res.* **4**: 304, 2010.
- WU, X., SONG, M., RAKARIYATHAM, K., ZHENG, J., GUO, S., TANG, Z. e XIAO, H. "Anti-inflammatory effects of 4'-demethylnobiletin, a major metabolite of nobiletin". *J. Funct. Foods.* **19**: 278, 2015.
- XIAO, H., YANG, C. S., LI, S., JIN, H., HO, C. T., & PATEL, T.. "Monodemethylated polymethoxyflavones from sweet orange (*Citrus sinensis*) peel inhibit growth of human lung cancer cells by apoptosis". *Mol. Nutr. Food Res.*, **53**:398, 2009.
- XIAO, W., HAN, L., e SHI, B. "Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix Astragali*". *Sep. Purif. Technol.* **62**: 614, 2008.
- YANG, L., CAO, Y. L., JIANG, J. G., LIN, Q. S., CHEN, J., e ZHU, L. "Response surface optimization of ultrasound-assisted flavonoids extraction from the flower of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl". *J. Sep. Sci.* **33**:1349, 2010.
- YAO, X., PAN, S., DUAN, C., YANG, F., FAN, G., ZHU, X., & XU, X. "Polymethoxylated flavone extracts from citrus peels for use in the functional food and nutraceutical industry". *Food Sci. Biotechnol.*, **18**:1237, 2009.
- ZAHOOR, S., ANWAR, F., MEHMOOD, T., SULTANA, B., & QADIR, R. "Variation in antioxidant attributes and individual phenolics of citrus fruit peels in relation to different species and extraction solvents". *J. Chil. Chem. Soc.* **61**: 2884, 2016.
- ZHANG, F., YANG, Y., SU, P., e GUO, Z. "Microwave-assisted extraction of rutin and quercetin from the stalks of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb". *Phytochem. Anal.* **20**: 33, 2009.
- ZHANG, H. F., YANG, X. H., & WANG, Y. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions". *Trends Food Sci. Technol.*, **22**: 672, 2011.
- ZHANG, Y., LI, H., DOU, H., HE, Z., WU, H., SUN, Z. e MA, Y. "Optimization of nobiletin extraction assisted by microwave from orange byproduct using response surface methodology". *Food Sci. Biotechnol.* **22**: 153, 2013.
- ZHU, H., WANG, Y., LIU, Y., XIA, Y. e TANG, T. "Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies". *Food Anal. Methods.* **3**:90, 2010.
- ZUIN, V. G. "Green sample preparation of complex matrices: towards sustainable separations of organic compounds based on the biorefinery concept". *Pure Appl. Chem.* **88**:29, 2016.
- ZUIN, V. G. e PEREIRA, C. A. M.. "Green sample preparation focusing on organic analytes in complex matrices". In: Mohammad, A.; Inamuddin. (Org.). *Green Chromatographic Techniques: Separation and Purification of Organic and Inorganic Analytes* . 1ed. London: Springer, 2013, v. 1, p. 1-52.

ANEXO I

Princípios da QV	Critérios	p
P1 – Prevenção	Todos os resíduos são inócuos (p=1, tabela 1a)	3
	Resíduos que envolvam um risco moderado para a saúde e ambiente (p=2, tabela 1a, pelo menos para uma substância, sem substâncias com p=3)	2
	Formação de pelo menos um resíduo que envolva um risco elevado para a saúde e ambiente (p=3, tabela 1a)	1
P2- Economia atômica	Reacções sem reagentes em excesso (10%) e sem formação de coprodutos	3
	Reacções com reagentes em excesso (>10%) e com formação de coprodutos	2
	Reacções com reagentes em excesso (>10%) e sem formação de coprodutos	2
	Reacções com reagentes em excesso (>10%) e com formação de coprodutos	1
P3 – Sínteses menos perigosas	Todas as substâncias envolvidas são inócuas (p=1, tabela 1a)	3
	As substâncias envolvidas apresentam um risco moderado para a saúde e ambiente (p=2, tabela 1a, pelo menos para uma substância, sem substâncias com p=3)	2
	Pelo menos uma das substâncias envolvidas apresenta um risco elevado para a saúde e ambiente (p=3, tabela 1a)	1
P5 – Solventes e outras substâncias auxiliares mais seguras	Os solventes e as substâncias auxiliares não existem ou são inócuas (p=1, tabela 1a)	3
	Os solventes e as substâncias auxiliares usadas envolvem um risco moderado para a saúde e ambiente (p=2, tabela 1a, pelo menos para uma substância, sem substâncias com p=3)	2
	Pelo menos um dos solventes ou uma das substâncias auxiliares usadas envolve um risco elevado para a saúde e ambiente (p=3, tabela 1a)	1
P6 – Planificação para conseguir eficácia energética	Temperatura e pressão ambientais	3
	Pressão ambiental e temperatura entre 0°C e 100°C que implique arrefecimento ou aquecimento	2
	Pressão diferente da ambiental e/ou temperatura muito afastada da ambiental	1
P7 – Uso de matérias primas renováveis	Todos os reagentes/matérias-primas/recursos envolvidos são renováveis (p=1, tabela 1c)	3
	Pelo menos um dos reagentes/matérias-primas/recursos envolvidos é renovável, não se considera a água (p=1, tabela 1c)	2
	Nenhum dos reagentes/matérias-primas/recursos envolvidos é renovável, não se considera a água (p=3, tabela 1c)	1
P8 – Redução de derivatizações	Não se usam derivatizações	3
	Usa-se apenas uma derivatização ou operação semelhante	2
	Usam-se várias derivatizações ou operações semelhantes	1
P9 – Catalisadores	Não se usam catalisadores ou os catalisadores são inócuos (p=1, tabela 1a) 3	3
	Utilizam-se catalisadores que envolvem um risco moderado para a saúde e ambiente (p=2, tabela 1a) 2	2
	Utilizam catalisadores que envolvem um risco elevado para a saúde e ambiente (p=3, tabela 1a)	1
P10 – Planificação para a degradação	Todas as substâncias envolvidas são degradáveis com os produtos de degradação inócuos (p=1, tabela 1c)	3
	Todas as substâncias envolvidas que não são degradáveis podem ser tratados para obter a sua degradação com os produtos de degradação inócuos (p=2, tabela 1c)	2
	Pelo menos uma das substâncias envolvidas não é degradável nem pode ser tratada para obter a sua degradação com produtos de degradação inócuos (p=3, tabela 1c)	1
P12 – Química inerentemente mais segura quanto à prevenção de acidentes	As substâncias envolvidas apresentam um baixo risco de acidente químico (p=1, tabela 1b)	3
	As substâncias envolvidas apresentam um risco moderado de acidente químico (p=2, tabela 1b, pelo menos para uma substância, sem substâncias com p=3)	2
	As substâncias envolvidas apresentam um risco elevado de acidente químico (p=3, tabela 1b)	1

APÊNDICE – A

Valores das áreas dos picos de cada flavonoide de interesse obtidos para a construção das curvas de calibração em metanol.

	Hesperidin Area [mAU.s]	Naringenin Area [mAU.s]	Hesperetin Area [mAU.s]	Nobiletin Area [mAU.s]		Hesperidin Area [mAU.s]	Naringenin Area [mAU.s]	Hesperetin Area [mAU.s]	Nobiletin Area [mAU.s]
1º Ponto					4º Ponto				
C6P111	28582283	7103373	3957034	7394590	C6P411	104506288	22688140	12388669	36767093
C6P112	28626524	7432479	4235540	7390842	C6P412	104234455	23165690	12628132	37518049
C6P113	28935379	7507968	4238291	7563069	C6P413	104794648	22933086	12703374	37559575
C6P114	28758613	7637355	4316848	7563278	C6P414	105926573	23115384	12576028	37610560
DP	158590,5246	227588,5194	157830,8609	98425,61472	DP	743448,4896	216112,9828	134188,409	399612,4558
CV %	0,552085853	3,067109296	3,769609878	1,316212115	CV %	0,708954378	0,940620563	1,067185203	1,069517153
2º Ponto					5º Ponto				
C6P211	54336361	11364952	7559772	16753489	C6P511	129289690	29453119	17310370	46277332
C6P212	54085733	11384212	7574433	16732401	C6P512	127355104	27966154	15364194	46444827
C6P213	54244938	11520740	7664495	16801612	C6P513	127235314	28057111	15306044	46284493
C6P214	55420292	11229153	7360398	16555532	C6P514	128825536	28034211	15352166	46867343
DP	607860,3152	119299,4774	128234,4773	107461,4942	DP	1036172,79	718019,9916	985103,2085	276911,496
CV %	1,114893436	1,048808352	1,700773376	0,643067723	CV %	0,808395852	2,530230739	6,221759423	0,595912292
3º Ponto					6º Ponto				
C6P311	80132904	18119220	9459265	27139891	C6P611	153012528	33366560	17504968	55028217
C6P312	78802214	18081816	9411259	27102683	C6P612	152604289	33556588	17673213	55316728
C6P313	78674841	18174767	9572969	27144128	C6P613	152654360	33931379	17885367	55579447
C6P314	79928934	18360363	9650023	27265204	C6P614		33167494	17307173	54767400
DP	752593,208	123594,9937	108288,7655	70649,308	DP	222654,6288	325338,4319	245871,8406	351819,2567
CV %	0,948032792	0,679689351	1,13708344	0,260094132	CV %	0,145757342	0,970999928	1,397580341	0,637666228

Valores das áreas dos picos de cada flavonoide de interesse obtidos para a construção das curvas de calibração em extrato de resíduo de laranja.

	Hesperidina Area [mAU.s]	Naringenina Area [mAU.s]	Hesperetina Area [mAU.s]	Nobiletina Area [mAU.s]		Hesperidina Area [mAU.s]	Naringenina Area [mAU.s]	Hesperetina Area [mAU.s]	Nobiletina Area [mAU.s]
BRANCO					4º Ponto				
BRI1	52299214	3695499	2357561	9673022	P4I1	123093513	26915503	14612551	41619889
BRI2	53945379	3633206	2397056	9579144	P4I2	121374555	26811185	14554961	41880847
BRI3	53950836	3530010	2371111	9556075	P4I3	123510991	26730536	14584765	41889706
BRI4	53802874	3544612	2351233	9670964	P4I4	122778911	26653570	14563004	41817891
DP	803167,5853	77859,61908	20313,22711	61003,06586	DP	926489,5479	112165,9661	25771,56781	125600,0323
CV%	1,501259728	2,162267623	0,857373038	0,634140605	CV %	0,755149874	0,418878292	0,176774028	0,300463571
1º Ponto					5º Ponto				
P1I1	75345339	10412382	6142327	16183822	P5I1	136245462	30225260	15993077	50408862
P1I2	75109930	10467559	6040210	16305874	P5I2	138675659	30676947	16465976	50777536
P1I3	75578761	10509932	6042528	16357570	P5I3	138533211	30253451	16414467	50543752
P1I4	75723580	10454371	5922509	16312527	P5I4	138538563	30237387	16353189	50674549
DP	269306,3394	40187,06171	89893,98112	74383,93975	DP	1170366,059	219427,8261	214089,6865	159967,327
CV %	0,356983659	0,384158564	1,489076809	0,456624776	CV %	0,848102263	0,723032612	1,312895836	0,316133623
2º Ponto					6º Ponto				
P2I1	91588825	15763808	9333987	24419661	P6I1	152915973	35306937	18280359	58923282
P2I2	91728004	15735547	9271868	24528929	P6I2	154971759	35224902	18309609	58888953
P2I3	92103465	15741438	9441855	24705106	P6I3	154824395	35482288	18323022	59308082
P2I4	91177091	15921466	9122821	24674615	P6I4				
DP	382578,4118	88112,52522	133222,4445	132794,4317	DP	1146737,892	131482,1074	21815,90642	232708,2003
CV %	0,417437142	0,558007434	1,433635097	0,54020833	CV %	0,743488981	0,372069585	0,119184403	0,39415275
3º Ponto									
P3I1	105374458	21348025	12048462	33739577	P3I4	104752616	21573906	12153055	33559968
P3I2	107465413	21797497	12278252	34117418	DP	1350393,898	236704,9056	145033,5831	290369,3211
P3I3	107245631	21872195	12380926	34154019	CV %	1,271443254	1,093430969	1,187323128	0,856730008

APÊNDICE – B

Análise de variância para os dados de regressão referentes às curvas de calibração utilizadas.

Tabela ANOVA - Hesperidina em metanol						
	SQ	g.l	MQ	F cal.	Ftab. (95%)	Razão
SQR	3,9E+16	1	3,9E+16	50040,09	4,30	11634,66
SQr	1,71E+13	22	7,79E+11			
SQT	3,9E+16	23				
SQEP	7,86E+12	17	4,62E+11	4,01	2,81	
SQFaj	9,28E+12	5	1,86E+12			

Tabela ANOVA - Hesperidina no extrato da amostra						
	SQ	g.l	MQ	F cal.	Ftab. (95%)	Razão
SQR	1,56E+16	1	1,56E+16	18431,04	4,30	4285,342
SQr	1,87E+13	22	8,48E+11			
SQT	1,56E+16	23				
SQEP	1,54E+13	17	9,08E+11	0,71	2,81	
SQFaj	3,21E+12	5	6,42E+11			

Tabela ANOVA - Naringenina em metanol						
	SQ	g.l	MQ	F cal.	Ftab. (95%)	Razão
SQR	1,81E+15	1	1,81E+15	5263,221	4,30	1223,735
SQr	7,56E+12	22	3,44E+11			
SQT	1,82E+15	23				
SQEP	2,1E+12	17	1,23E+11	8,87	2,81	
SQFaj	5,47E+12	5	1,09E+12			

Tabela ANOVA - Naringenina no extrato da amostra						
	SQ	g.l	MQ	F cal.	Ftab. (95%)	Razão
SQR	1,57E+15	1	1,57E+15	3988,696	4,30	927,399
SQr	8,63E+12	22	3,92E+11			
SQT	1,57E+15	23				
SQEP	4,13E+11	17	2,43E+10	67,68	2,81	
SQFaj	8,22E+12	5	1,64E+12			

Tabela ANOVA - Hesperetina em metanol						
	SQ	g.l	MQ	F cal.	Ftab. (95%)	Razão
SQR	4,77E+14	1	4,77E+14	1767,107	4,30	410,8643
SQr	5,94E+12	22	2,7E+11			
SQT	4,83E+14	23				
SQEP	3,2E+12	17	1,88E+11	2,91	2,81	
SQFaj	2,74E+12	5	5,48E+11			

Tabela ANOVA - Hesperetina no extrato da amostra						
	SQ	g.l	MQ	F cal.	Ftab. (95%)	Razão
SQR	3,79E+14	1	3,79E+14	1355,854	4,30	315,2453
SQr	6,15E+12	22	2,79E+11			
SQT	3,85E+14	23				
SQEP	2,81E+11	17	1,65E+10	70,98938	2,81	
SQFaj	5,87E+12	5	1,17E+12			

Tabela ANOVA - Nobiletina em metanol						
	SQ	g.l	MQ	F cal.	Ftab. (95%)	Razão
SQR	5,97E+15	1	5,97E+15	21757,95	4,30	5058,87
SQr	6,04E+12	22	2,75E+11			
SQT	5,98E+15	23				
SQEP	9,4E+11	17	5,53E+10	18,45	2,81	
SQFaj	5,1E+12	5	1,02E+12			

Tabela ANOVA - Nobiletina no extrato da amostra						
	SQ	g.l	MQ	F cal.	Ftab. (95%)	Razão
SQR	4,66E+15	1	4,66E+15	53717,75	4,30	12489,74
SQr	1,91E+12	22	8,67E+10			
SQT	4,66E+15	23				
SQEP	5,55E+11	17	3,26E+10	8,29	2,81	
SQFaj	1,35E+12	5	2,71E+11			

SQ: Soma Quadrática

gl: Graus de liberdade

SQT: Soma Quadrática Total

SQFaj: Soma Quadrática da Falta de ajuste

MQ: Média Quadrática

SQR: Soma Quadrática Regressão

SQEP: Soma Quadrática do Erro Puro

SQr: Soma Quadrática Resíduo

APÊNDICE – C

Análise de variância para os rendimentos de extração dos melhores resultados obtidos para cada metodologia estudada.

RESUMO HESPERIDINA

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Convencional	3	10,29	3,43	0,0289
Ultrassom	3	9,75	3,25	0,0036
Micro-ondas	3	64,89	21,63	0

ANOVA HESPERIDINA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	669,0968	2	334,5484	30881,39	9,17E-13	5,143253
Dentro dos grupos	0,065	6	0,010833			
Total	669,1618	8				

RESUMO NARINGENINA

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Convencional	3	0,51	0,17	0
Ultrassom	3	0,42	0,14	1E-04
Micro-ondas	3	0,51	0,17	0

ANOVA NARINGENINA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0018	2	0,0009	27	0,001	5,143253
Dentro dos grupos	0,0002	6	3,33E-05			
Total	0,002	8				

RESUMO HESPERETINA

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Convencional	3	0,27	0,09	2,89E-34
Ultrassom	3	0,27	0,09	0,0001
Micro-ondas	3	0,45	0,15	0

ANOVA HESPERETINA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0072	2	0,0036	108	1,97E-05	5,143253
Dentro dos grupos	0,0002	6	3,33E-05			
Total	0,0074	8				

RESUMO NOBILETINA

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Convencional	3	0,69	0,23	1E-04
Ultrassom	3	0,63	0,21	1E-04
Micro-ondas	3	0,84	0,28	0

ANOVA NOBILETINA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0078	2	0,0039	58,5	0,000116	5,143253
Dentro dos grupos	0,0004	6	6,67E-05			
Total	0,0082	8				