

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 14/08/2021.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**JÚLIA ASSIRATI**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS VERDES NA  
INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE RESÍDUOS DA CULTURA E  
DO PROCESSAMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**Botucatu, 2020**

**Júlia Assirati**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS VERDES NA  
INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE RESÍDUOS DA CULTURA E  
DO PROCESSAMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia de Botucatu da Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
como parte dos requisitos para a obtenção do  
título de Mestre.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Soleo de Funari

Botucatu, 2020

A848d Assirati, Júlia  
Desenvolvimento de metodologias verdes na investigação química de resíduos da cultura e do processamento de cana-de-açúcar / Júlia Assirati. -- Botucatu, 2020  
74 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu  
Orientador: Cristiano Soleo de Funari

1. Resíduos agrícolas. 2. Química verde. 3. Plantas Metabolismo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JÚLIA ASSIRATI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.**

Aos 14 dias do mês de agosto do ano de 2020, às 09:00 horas, no(a) por meio de videoconferência, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CRISTIANO SOLEO DE FUNARI - Orientador(a) do(a) Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônômicas - UNESP (Por meio de videoconferência), Profa. Dra. ISABEL DUARTE COUTINHO do(a) Instituto de Química / UNESP (Por meio de videoconferência), Prof. Dr. FERNANDO BATISTA DA COSTA do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP (Por meio de videoconferência), sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de JÚLIA ASSIRATI, intitulada **DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS VERDES NA INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE RESÍDUOS DA CULTURA E DO PROCESSAMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. CRISTIANO SOLEO DE FUNARI

Profa. Dra. ISABEL DUARTE COUTINHO

Prof. Dr. FERNANDO BATISTA DA COSTA



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todas as bênçãos em minha vida e por sempre iluminar meu caminho.

À minha família por todo o suporte e incentivo em cada etapa da minha vida, em especial ao meu irmão, Lucas, que sempre me ajudou e ensinou muito ao longo da minha jornada acadêmica.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cristiano Soleo de Funari, por todos os ensinamentos transmitidos e pela orientação neste trabalho de mestrado.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) pela estrutura fornecida para desenvolvimento do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de mestrado (processo 2018/09866-5), bem como pelo suporte financeiro para execução do projeto (processos 2017/06216-6, 2018/01786-1, 2014/50926-0).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

## RESUMO

As Nações Unidas preconizam pesquisas focadas na conversão de subprodutos agrícolas em recursos úteis para a sociedade, porque esses subprodutos podem contribuir para mudanças climáticas, contaminação da água e do solo e poluição do ar local. Os princípios da Química Verde devem conduzir a investigação de compostos de valor agregado em subprodutos, pois todo desenvolvimento de produto começa na escala analítica. Neste trabalho, nove diferentes abordagens de extração foram investigadas lado a lado para bagaço de cana-de-açúcar, incluindo três métodos de referência. *Two-Liquid-Phase Ultrasound-Assisted Extraction with Probe* ou *Two-Liquid-Phase Dynamic Maceration* com uma geometria de frasco adequada e com etanol e n-heptano, considerados mais verdes, compatíveis com análises e de alta disponibilidade, como alternativas para solventes de referência, como metanol e n-hexano, foram as duas melhores abordagens baseadas na extração e no desempenho ambiental. Eles foram aplicados aos três principais subprodutos sólidos do setor sucroenergético. Os extratos hidroetanólico e n-heptânico produzidos foram analisados, respectivamente, por cromatografia líquida de ultra alta eficiência e cromatografia gasosa, ambas acopladas à espectrometria de massas, sem a necessidade de utilizar etapas de preparação de amostra que exigem tempo, energia e consumo de solventes, como evaporação de solventes, concentração de metabólitos, resuspensões e derivatização. Foram identificados 111 compostos em um único subproduto, cobrindo desde a sacarose altamente polar até o apolar n-hexatriacontanal, em um único procedimento de extração. Orientina, apigenina-6-C-glucosilrhamnosídeo, 1-octasonol, octacosanal e outros compostos bioativos foram identificados nesses subprodutos que se encontram abundantemente disponíveis e que, usualmente, são queimados apenas para produzir energia. Esses dois métodos aparecem como procedimentos verdes, simplificados e altamente eficientes para extrair e identificar de forma abrangente subprodutos sucroenergéticos sólidos. Estes métodos podem ser aplicados para obter o perfil metabólico de outros subprodutos ou matrizes sólidas complexas.

Palavras-chave: resíduos agrícolas, metabolômica, Química Verde

## ABSTRACT

The United Nations preconizes research focused on converting agricultural by-products into useful resources for society because these by-products can contribute to climate change, water and soil contamination, and local air pollution. Green chemistry principles should drive the search for valuable compounds in by-products since every product development begins at the analytical scale. In this work, nine different extraction approaches were investigated side-by-side for sugarcane bagasse, including three reference methods. Two-Liquid-Phase Ultrasound-Assisted Extraction with Probe or Two-Liquid-Phase Dynamic Maceration with a proper vial geometry and with the greener, analysis-compatible, highly available ethanol and n-heptane as alternatives for the reference methanol and n-hexane were the two best approaches based on the extraction and environmental performances. They were applied to the three main solid by-products of the sucroenergetic industrial. The produced hydroethanolic and n-heptane extracts were analyzed by ultra-high-performance liquid chromatography and gas chromatography both coupled to mass spectrometry, respectively, without requiring time, energy, and solvent consuming sample preparation steps like solvent evaporations, metabolite concentration, re-suspensions, and derivatization. Up to 111 compounds were annotated in a single by-product, covering from the very polar sucrose to nonpolar n-hexatriacontanal in a single extraction procedure. Orientin, apigenin-6-C-glucosylrhamnoside, 1-octanol, octacosanal, and other bioactive compounds were identified in these abundantly available by-products, which are currently just burned to produce energy. These two methods appear as a green, simplified, and highly efficient procedures to comprehensively extract and identify solid sucroenergetic byproducts. These can be applied on metabolite profiling other by-products or complex solid matrices.

Keywords: agri-food byproducts, metabolomics, Green Chemistry

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Cromatogramas representativos UHPLC-UV (esquerda) a 350 nm e GC-MS (direita) de diferentes procedimentos de extração: extratos metanólico (a), hidrometanólico (c, em preto) e n-hexânico (b e d, em preto) obtidos de extrações de referência; extratos hidroetanólicos e n-heptânicos alternativos (c e d, em verde); extratos hidroetanólico (e e g), e n-heptânico (f e h) obtidos por *Two-Liquid-Phase Dynamic Maceration (2-Mac)* e *Two-Liquid-Phase Ultrasound-Assisted Extraction with Probe (2-UAEP)*, respectivamente, usando um recipiente de 3 cm d.i. em ambas extrações. As janelas dos eixos x e y são as mesmas em cada coluna..... 20
- Figura 2 - Eficiências de extrações de uma e duas fases líquidas (1- e 2- seguidas pelas siglas da técnica de extração, respectivamente), em um frasco de 3 cm de diâmetro interno. 1-Ref refere-se à soma dos picos ou área total dos picos obtidas para os métodos de extração de referência na literatura, sem qualquer concentração de extrato. Letras minúsculas distintas acima das barras indicam diferenças significativas entre as extrações no mesmo gráfico..... 24
- Figura 3 - Efeito do diâmetro interno (d.i.) do recipiente de extração na eficiência de 2-UAEP, a 20 kHz, 125 W (esquerda) e 2-Mac a 30 °C, 1400 rpm. Letras minúsculas distintas acima das barras indicam diferenças significativas entre as extrações em frascos com diferentes d.i. As análises estatísticas foram realizadas considerando todos os resultados para a mesma resposta monitorada. .... 31
- Figura 4 - Cromatogramas das frações polares e apolares obtidos por UHPLC-UV a 350 nm (à esquerda) e GC-MS (à direita), respectivamente, por dois diferentes métodos de extração: 2-UAEP, utilizando um recipiente de 2,5 cm d.i. e 2-Mac, usando um recipiente de 3,0 cm d.i., para três resíduos da indústria sucroalcooleira: bagaço, palha e torta de filtro..... 34
- Figura 5 - Número de compostos identificados por classe em três subprodutos de cana-de-açúcar (bagaço, palha e torta de filtro) por 2-UAEP (a) e 2-Mac (b). .... 35
- Figura 6 - Espectros *online* de massas de alta resolução e ultravioleta (A e B, respectivamente) do candidato com razão m/z 577,1556 obtido na fração EtOH:H<sub>2</sub>O 7:3 (v/v) de extrato de bagaço..... 37
- Figura 7 - Estrutura de metabólitos identificados nos resíduos sólidos de cana-de-açúcar com potenciais diversos de aplicação..... 62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Visão geral das eficiências ambiental e extratora de procedimentos de referência e alternativos.....	26
Tabela 2 - Lista de compostos tentativamente identificados e sua ocorrência em extratos hidroetanólicos de subprodutos da cana-de-açúcar obtidos por 2-UAEP, com recipiente de 2,5 cm d.i. e 2-Mac, com recipiente de 3,0 cm d.i. ....	38
Tabela 3 - Lista de compostos tentativamente identificados e sua ocorrência nos extratos n-heptânicos de subprodutos da cana-de-açúcar, obtidos por 2-UAEP, com recipiente de 2,5 cm d.i e 2-Mac, com recipiente de 3.0 cm d.i. ....	54

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE TABELAS .....	8
1. INTRODUÇÃO .....	10
2. OBJETIVO .....	13
3. EXPERIMENTAL .....	14
3.1. Solventes.....	14
3.2. Subprodutos da cana-de-açúcar .....	14
3.3. Extrações de referência.....	14
3.4. Extrações com duas fases líquidas .....	15
3.5. Extrações com uma fase líquida .....	16
3.6. Comparação entre extrações .....	16
3.7. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).....	16
3.8. Cromatografia líquida de ultra-alta-eficiência acoplada a arranjo de fotodiodos (PDA/UV/Vis) (UHPLC-PAD/UV) .....	17
3.9. Cromatografia Líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrofotômetro UV/Vis e espectrômetros de massas por tempo de voo (UHPLC-PAD/UV-ESI-TOFMS) .....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	18
4.1. Configuração dos métodos cromatográficos .....	18
4.2. Métodos de referência.....	20
4.3. Extrações alternativas usando duas fases líquidas.....	21
4.4. Comparação adicional de extrações de uma e duas fases líquidas .....	26
4.5. Avaliação do impacto ambiental dos processos de extração.....	28
4.6. A influência da geometria do recipiente de extração.....	30
4.7. Identificação de produtos naturais nos três principais resíduos sólidos de cana-de-açúcar .....	33
4.8. Identificação de compostos por UHPLC-PAD/UV-ESI-TOF-MS .....	36
4.9. Identificação de compostos por GC-MS.....	52
4.10. Aplicações potenciais para compostos selecionados de subprodutos.....	61
5. CONCLUSÃO .....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

## 1. INTRODUÇÃO

A Organização das Nações Unidas (ONU) preconiza pesquisas focadas na conversão de subprodutos agro alimentícios em recursos úteis para a sociedade, uma vez que o crescimento populacional previsto para as próximas décadas impulsionará a produção de alimentos e energia e, conseqüentemente, a geração de subprodutos.<sup>1</sup> A cana-de-açúcar merece atenção especial nesta discussão, uma vez que é a segunda maior safra do mundo em massa produzida, usada como matéria-prima para a produção de açúcar, etanol e eletricidade, levando a uma variedade de produtos, que varia conforme o interesse do mercado.<sup>2</sup> Em 2018 , a produção global de cana-de-açúcar foi de 1,91 bilhão de toneladas.<sup>3</sup> Os principais subprodutos sólidos gerados na cadeia sucroenergética são bagaço (250-280 kg/ton cana, 50% de umidade), palha (200-280 kg/ton cana, 50% umidade) e torta de filtro (30-50 kg/ton cana, 55-70% de umidade).<sup>4,5</sup>

O bagaço é gerado dentro da usina e é majoritariamente queimado para geração de energia, mas também tem sido usado para a produção de etanol de segunda geração.<sup>6</sup> A palha é principalmente deixada no campo, mas dependendo da distância entre a plantação e a usina, ela é transportada e também é usada para produzir energia através da queima. Se deixada no campo em quantidade adequada, a palha da cana-de-açúcar fornece biodiversidade ao solo, armazenamento de água, reciclagem de nutrientes, entre outros benefícios.<sup>7</sup> No entanto, o excesso de palha pode diminuir o rendimento da produção, aumentar as emissões de gases de efeitos estufa, desequilibrar a biologia do solo, causando infestação de pragas e ervas daninhas, entre outros problemas.<sup>7</sup> Finalmente, parte da torta de filtro, uma mistura lipofílica produzida durante a produção de sacarose, é usada para fertilizar o solo da cana-de-açúcar. Seu uso irrestrito, entretanto, causa várias ameaças ambientais devido aos altos níveis de metais pesados.<sup>5,8</sup> Em resumo, embora a indústria da cana tenha avançado significativamente no gerenciamento de seus subprodutos,<sup>9</sup> seus usos atuais ainda podem ser considerados de baixo valor agregado e não altamente sustentáveis. Portanto, existe interesse em desenvolver aplicações de alto valor agregado para esses subprodutos. Alguns estudos se concentraram na busca de compostos de alto valor agregado a partir de partes de plantas de cana-de-açúcar, por exemplo, vitexina, aldeídos e álcoois de cadeia longa (“n-policosanol”), triterpenoides e esteróis.<sup>10-15</sup>

Do ponto de vista ambiental, a busca por metabólitos bioativos em resíduos ou subprodutos agroalimentares, empregando procedimentos analíticos ineficientes e poluentes, seria paradoxal. Além disso, todo desenvolvimento de produto começa na escala analítica. Assim, os 12 princípios da Química Analítica Verde (GAC) tornam-se um guia muito útil desde o estágio inicial da pesquisa.<sup>16</sup> Não é coincidência que o primeiro desses princípios declare que técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas sempre que possível, porque a etapa de preparo de amostra gera mais poluição, gasto de energia e gasto de materiais do que qualquer outra etapa do processo analítico, além de consumir tempo.<sup>16-18</sup> Na Fitoquímica, as etapas usuais envolvidas no preparo da amostra antes da análise do perfil do metabólito por cromatografia líquida acoplada à ultravioleta (UV) e/ou espectrometria de massas (LC-PAD/UV-MS) são: moagem, extração com um ou mais solventes, filtração ou centrifugação, evaporação de solvente, extração em fase sólida ou extração líquido-líquido para eliminar compostos interferentes, nova evaporação de solvente, ressuspensão para obter a concentração desejada e em um solvente compatível à análise posterior, filtração em filtro de seringa para finalmente injetar a amostra no sistema.<sup>17,19-22</sup> Se a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é a técnica utilizada, geralmente a matriz vegetal é triturada e extraída por hidrodestilação, para obter óleos essenciais, ou usando um solvente orgânico semi- a apolar. O extrato fluido é então filtrado ou centrifugado, o solvente é evaporado e o extrato seco é ressuspendido até a concentração desejada em um solvente compatível para ser injetado no sistema GC-MS; no entanto, amostras secas são frequentemente submetidas a etapas adicionais antes da análise por GC-MS, como derivatização, especialmente quando são utilizados solventes hidrofílicos.<sup>15,17,23-25</sup> Desta forma, observa-se que esses processos exigem um grande número de etapas, aumentando o tempo, consumo de energia e solvente, além de aumentar o erro experimental.<sup>19</sup> Além disso, frequentemente são empregados solventes perigosos, problemáticos e/ou que apresentam riscos à saúde, como clorofórmio, éter terc-butílico (MTBE), metanol (MeOH), acetonitrila e hexano.<sup>20,26</sup>

Se uma abordagem não direcionada for selecionada (*untargeted*), nenhum método de extração simples permite que um solvente cubra a extração de metabólitos polares a apolares. Usualmente, extrações com diferentes solventes são conduzidas separadamente, reduzindo assim o rendimento da amostra<sup>17,20</sup> e consumindo mais energia e solvente. Protocolos de extração multifásicos foram propostos para estudos

não direcionados, geralmente levando a uma extração mais ampla em comparação com uma extração de uma única fase líquida. Também foi observada uma simplificação quando comparados com protocolos que utilizam duas extrações separadas de uma fase líquida.<sup>17,20,25,27</sup> No entanto, (i) estes protocolos baseiam-se principalmente na utilização de solventes orgânicos perigosos e/ou nocivos mencionados acima; (ii) uma etapa de concentração e ressuspensão para cada fase ainda são necessárias se ambas forem analisadas por LC-MS, ou ainda outras etapas adicionais, como derivatização, se a análise for realizada por GC-MS; (iii) enquanto a primeira solução líquida permanece em contato com a matriz sólida por vários minutos (geralmente 15 minutos), o segundo líquido é adicionado ao frasco de extração apenas no final do processo, quando o sistema já é levado à mistura por vortex para realizar uma extração líquido-líquido.<sup>20,24,25,27</sup> Assim, é improvável que uma extração sólido-líquido eficaz possa ocorrer para o segundo solvente adicionado. A fim de remediar isto, Luque de Castro et al. propuseram uma abordagem inovadora que visa a extração de metabólitos polares a apolares de matrizes vegetais, utilizando duas fases líquidas (misturas de metanol-água e n-hexano) em contato com a amostra sólida desde o início até o final do processo de extração, gerando, assim, dois extratos ao invés de duas frações líquidas.<sup>28-30</sup> As extrações foram baseadas em ultrassom e agitação magnética simultaneamente (*Ultrasound-Assisted Emulsification-Extraction*, UAEE) ou em micro-ondas (*Microwave-Assisted Extraction*, MAE), que estão entre as técnicas de extração consideradas mais verdes do que as tradicionais devido à sua alta eficiência de extração e baixo consumo de energia e solvente.<sup>31</sup> Enquanto o extrato hidrometanólico resultante era apenas filtrado em seringa e injetado nos sistemas HPLC-PAD/UV e HPLC-MS/MS para detectar e quantificar compostos fenólicos, o extrato n-hexânico passou por oito etapas, incluindo a derivatização, antes de ser injetado no sistema GC-MS para detectar e quantificar ácidos graxos.<sup>28,29</sup> Procedimento similar foi aplicado por Cao et al.,<sup>32</sup> que extraíram simultaneamente metabólitos relativamente hidrofílicos e hidrofóbicos das folhas de *Ginkgo biloba* usando dois solventes eutéticos naturais profundos (do inglês, *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES) imiscíveis. Os acetatos de poliprenila presentes na fase hidrofóbica do NADES foram quantificados por HPLC-UV, enquanto procianidina, flavonoides e trilactonas terpênicas presentes na fase hidrofóbica do NADES foram quantificados por métodos espectrofotométricos. As potenciais desvantagens do método não foram abordadas, como a conhecida dificuldade em separar os compostos extraídos do

NADES devido aos seus pontos de ebulição mais altos; possível incompatibilidade dos solventes de extração com técnicas analíticas mais robustas (como UHPLC-HRMS e GC-MS); e desempenho ambiental e de extração do sistema empregado em comparação com aqueles tradicionais, mas que empregam solventes verdes. Este último deve ser particularmente enfatizado devido aos riscos do cloreto de metil-trioctil amônio e ácido octílico (classificados como “perigosos”), que foram usados para preparar os NADES hidrofóbicos.

Até onde se tem conhecimento, não há estudos adicionais focados no desenvolvimento dessa estratégia de utilização de dois extratos em vez de duas frações líquidas, apesar de sua potencial aplicabilidade na química de produtos naturais, química de alimentos, química ambiental, entre outros. (i) Essa abordagem não foi contestada do ponto de vista da Química Verde, em que é crucial o emprego de métricas multiparâmetros apropriadas.<sup>33</sup> (ii) Ainda é pouco explorado na metabolômica não direcionada (*untargeted*), quando o objetivo é conhecer a composição completa do metaboloma presente em um organismo.<sup>34</sup> (iii) A potencial influência da geometria do recipiente de extração na eficiência de tais extrações não foi explorada, embora a superfície de contato inicial entre as fases líquidas possa facilitar ou dificultar as extrações. Para volumes constantes das fases líquidas, a geometria do recipiente influencia a altura das colunas da fase líquida, com possíveis implicações no grau de inserção da sonda de ultrassom e na energia liberada no sistema para a formação de emulsões. Novos estudos podem abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de extrações com duas fases líquidas, que podem incluir o aumento da abrangência metabólica dessas extrações, enquanto há a diminuição do número de etapas analíticas (como evaporações de solventes e derivatização de amostras, que consomem tempo, e ressuspensões em um solvente compatível com análise), permitindo a substituição de solventes e aparatos, extrações simultâneas de múltiplas amostras, entre outras.

## 2. OBJETIVO

## 5. CONCLUSÃO

Duas configurações experimentais otimizadas denominadas *Two-Liquid-Phase Ultrasound-Assisted Extraction with Probe (2-UAEP)* e *Two-Liquid-Phase Dynamic Maceration (2-Mac)* foram desenvolvidas com êxito com a finalidade de criar perfis de metabólitos de subprodutos sucroenergéticos coletados diretamente em usinas sucroalcooleiras. Uma vez que as condições experimentais foram estabelecidas, elas se mostraram mais verdes, mais simples e mais rápidas que os métodos de referência, apresentando desempenho de extração igual ou superior às extrações de referência em uma única fase. Foram eliminadas as etapas tradicionais de preparo da amostra, que consomem tempo, energia e solvente (evaporações de solvente, concentração de metabólitos, ressuspensões em solventes compatíveis com análises cromatográficas e derivatização). MeOH e n-hexano, conhecidamente perigosos e com impacto na saúde, foram substituídos por n-heptano e EtOH, solventes mais verdes, mas ainda de baixo custo e mais fáceis de manusear, além de compatíveis com as análises de UHPLC-PAD/UV-HRMS e GC-MS.

As eficiências ambientais das abordagens propostas foram confirmadas por métricas complementares. Isso era esperado, uma vez que seus desenvolvimentos foram orientados para abranger o maior número possível dos 12 Princípios de Química Analítica Verde (GAC). Como resultado final, elas cumpriram os princípios 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 e 12, já que a maioria das etapas de preparação de amostras integrou duas extrações de uma fase líquida em uma única extração igualmente eficiente; uma configuração automatizada e miniaturizada foi utilizada; foram evitadas a geração de grande quantidade de resíduos analíticos e a derivatização antes da análise por GC-MS; métodos multi-analitos foram empregados; o consumo de energia foi minimizado; reagentes tóxicos foram substituídos; e a segurança do operador foi aumentada. Embora 2-UAEP tenha levado à identificação de 12 a 28% mais compostos, 2-Mac mostrou algumas vantagens ambientais, como (i) menor consumo de energia por amostra tratada, (ii) a possibilidade de fechar o frasco de extração, limitando a liberação de solventes para a atmosfera, (iii) pode ser facilmente reduzida (princípio 2 do GAC); e (iv) gera menor poluição sonora que os dispositivos de ultrassom e é menos energética, aumentando assim a segurança do operador (além de evitar a potencial formação de artefatos, um parâmetro crítico para produtos naturais instáveis).

As eficiências práticas de 2-UAEP e 2-Mac, conforme usadas neste trabalho, foram demonstradas pela extração e posterior identificação de uma ampla faixa dinâmica de compostos a partir de dados espectrais ricos em informações gerados por plataformas analíticas consagradas. Isso permitiu a identificação experimental de 77 a 111 metabólitos, desde a sacarose altamente polar ao éster de cadeia longa de cera (C53), altamente apolar, em uma única extração (outros 27 compostos tiveram suas fórmulas moleculares validadas, mas não foram identificados). Foram encontrados compostos bioativos nos extratos hidroetanólicos, como as flavonas C-glicosiladas orientina (identificada no bagaço) e isoorientina (identificadas no bagaço e na palha), enquanto a vitexina e a isovitexina podem ser produzidas por seus derivados, apigenina-8-C-glucosil-arabinosídeo e apigenina-6-C-glucosil-arabinosídeo, ambos encontrados nas três matrizes. Por outro lado, os compostos bioativos ácido hexadecanóico, 1-octacosanol, octacosanal, triacontanal, e dotriacontanal foram encontrados em extratos de n-heptano desses subprodutos, principalmente em torta de filtro.

Essas abordagens poderiam com sucesso ser aplicadas para obter um perfil metabólico de outros subprodutos agrícolas, em um programa de triagem maior, bem como outras matrizes naturais complexas. Buscando-se um equilíbrio entre extração e desempenho ambiental, produtividade laboratorial e custo de equipamentos, selecionou-se 2-Mac para investigar outros produtos e subprodutos agrícolas de outras cadeias produtivas. Isso porque a extração 2-Mac com recipiente de 3,0 cm d.i. foi reduzido para recipiente de 1,3 mm d.i. com tampa (mantendo a proporção da superfície de contato inicial entre as duas fases líquidas/altura da coluna líquida - já que esse fator se mostrou importante neste trabalho), levando à possibilidade de extrair ainda mais amostras simultaneamente. Por outro lado, 2-UAEP pode ser preferido em trabalhos direcionados, nos quais o objetivo é realizar uma extração quantitativa de compostos estáveis selecionados, já que esta abordagem leva a áreas de pico maiores que o 2-Mac.

Finalmente, este trabalho reforçou que dezenas de compostos bioativos estão sendo queimados atualmente na cadeia produtiva da cana-de-açúcar. Esses compostos podem ser extraídos desses subprodutos antes de serem direcionados para um destino de baixo valor agregado, em um conceito claro de biorrefinaria. As extrações à base de hidroetanol, um solvente verde produzido por processos de fermentação a partir de cana-de-açúcar em tal usina, poderiam ser eficientemente usadas para extrair compostos bioativos selecionados. Em uma colaboração entre químicos e engenheiros de processo, as extrações 2-UAEP e 2-Mac podem ser otimizadas para os metabólitos-alvo e, em seguida, escalonadas para escala piloto ou industrial. Essas abordagens, assim como em escala analítica, serviriam não apenas como extrações sólido-líquido, mas também como uma primeira etapa de purificação, particionando compostos em dois líquidos imiscíveis. Atualmente existem grandes extratores para os dois tipos de extração, que permitiriam o escalonamento da obtenção destes compostos bioativos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 UNEP, *Converting Waste Agricultural Biomass into a Resource Compendium of Technologies*, 2009.
- 2 FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- 3 CONAB, *Cana-de-açúcar: Acompanhamento da safra brasileira 2019/2020*, 2019, vol. 6.
- 4 V. Ferreira-Leitao, L. M. F. Gottschalk, M. A. Ferrara, A. L. Nepomuceno, H. B. C. Molinari and E. P. S. Bon, *Waste and Biomass Valorization*, 2010, **1**, 65–76.
- 5 P. A. O. George, J. J. C. Eras, A. S. Gutierrez, L. Hens and C. Vandecasteele, *Waste and Biomass Valorization*, 2010, **1**, 407–413.
- 6 R. T. Hilares, M. A. Ahmed, M. M. De Souza, P. R. F. Marcelino, S. S. Da Silva and J. C. Dos Santos, in *Sustainable Biotechnology- Enzymatic Resources of Renewable Energy*, Springer, Cham, 2018, pp. 155–176.
- 7 J. L. N. Carvalho, R. C. Nogueirol, L. M. S. Menandro, R. de O. Bordonal, C. D. Borges, H. Cantarella and H. C. J. Franco, *GCB Bioenergy*, 2017, **9**, 1181–1195.
- 8 J. Ramalho and N. Sobrinho, *Brazilian J. For. Environment*, 2001, **8**, 120–129.
- 9 A. Elia Neto, in *Congresso de Tecnologia Química (TeQ)*, Rio de Janeiro, Brazil, 2016.
- 10 R. Zheng, S. Su, H. Zhou, H. Yan, J. Ye, Z. Zhao, L. You and X. Fu, *Ind. Crops Prod.*, 2017, **101**, 104–114.
- 11 I. D. Coutinho, J. M. Baker, J. L. Ward, M. H. Beale, S. Creste and A. J. Cavaleiro, *J. Agric. Food Chem.*, 2016, **64**, 4198–4206.
- 12 G. M. Leme, I. D. Coutinho, S. Creste, O. Hojo, R. L. Carneiro, V. D. S. Bolzani and A. J. Cavaleiro, *Anal. Methods*, 2014, **6**, 7781–7788.
- 13 R. Colombo, J. H. Yariwake, E. F. Queiroz, K. Ndjoko and K. Hostettmann, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2013, **36**, 239–248.
- 14 J. C. del Río, G. Marques, A. G. Lino, C. F. Lima, J. L. Colodette and A. Gutiérrez, *Ind. Crops Prod.*, 2015, **77**, 992–1000.
- 15 T. M. Attard, C. R. McElroy, C. A. Rezende, I. Polikarpov, J. H. Clark and A. J. Hunt, *Ind. Crops Prod.*, 2015, **76**, 95–103.
- 16 A. Gałuszka, Z. Migaszewski and J. Namieśnik, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2013, **50**, 78–84.
- 17 M. A. Salem, L. P. De Souza, A. Serag, A. R. Fernie, M. A. Farag, S. M. Ezzat

- and S. Alseekh, *Metabolites*, 2020, **10**, 37.
- 18 M. de los Á. Fernández, J. Boiteux, M. Espino, F. J. V. Gomez and M. F. Silva, *Anal. Chim. Acta*, 2018, **1038**, 1–10.
- 19 V. G. Ferreira, G. M. Leme, A. J. Cavalheiro and C. S. Funari, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 8421–8427.
- 20 T. Cajka and O. Fiehn, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 524–545.
- 21 R. C. H. De Vos, S. Moco, A. Lommen, J. J. B. Keurentjes, R. J. Bino and R. D. Hall, *Nat. Protoc.*, 2007, **2**, 778–791.
- 22 C. S. Funari, P. J. Eugster, S. Martel, P. A. Carrupt, J. L. Wolfender and D. H. S. Silva, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1259**, 167–178.
- 23 J. Azmir, I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A. Jahurul, K. Ghafoor, N. A. N. Norulaini and A. K. M. Omar, *J. Food Eng.*, 2013, **117**, 426–436.
- 24 A. Pilon, D. Selegato, R. Fernandes, P. Bueno, D. Pinho, F. Carnevale Neto, R. Freire, I. Castro-Gamboa, V. Bolzani and N. Lopes, *Quim. Nova*, 2020, **43**, 1–26.
- 25 J. Liseč, N. Schauer, J. Kopka, L. Willmitzer and A. R. Fernie, *Nat. Protocols*, 2006, **1**, 387–396.
- 26 D. Prat, A. Wells, J. Hayler, H. Sneddon, C. R. McElroy, S. Abou-Shehada and P. J. Dunn, *Green Chem.*, 2016, **18**, 288–296.
- 27 M. A. Salem, J. Jüppner, K. Bajdzienko and P. Giavalisco, *Plant Methods*, 2016, **12**, 45.
- 28 J. A. Pérez-Serradilla, F. Priego-Capote and M. D. Luque De Castro, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 6767–6774.
- 29 J. A. Pérez-Serradilla, R. Japón-Luján and M. D. Luque de Castro, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **602**, 82–88.
- 30 M. Molina-Calle, F. Priego-Capote and M. D. Luque De Castro, *Talanta*, 2015, **141**, 150–157.
- 31 F. Chemat, M. Abert Vian, A.-S. Fabiano-Tixier, M. Nutrizio, A. Režek Jambrak, P. E. S. Munekata, J. M. Lorenzo, F. J. Barba, A. Binello and G. Cravotto, *Green Chem.*, 2020, **22**, 2325–2353.
- 32 J. Cao, L. Chen, M. Li, F. Cao, L. Zhao and E. Su, *Green Chem.*, 2018, **20**, 1879–1886.
- 33 P. Jessop, *Green Chem.*, 2020, **22**, 13–15.

- 34 J. Wolfender, J. Nuzillard, J. J. J. Van Der Hooft, J. Renault and S. Bertrand, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 704–742.
- 35 R. Colombo, J. H. Yariwake, E. F. Queiroz, K. Ndjoko and K. Hostettmann, *J. Chromatogr. A*, 2005, **1082**, 51–59.
- 36 A. Gałuszka, Z. M. Migaszewski, P. Konieczka and J. Namieśnik, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2012, **37**, 61–72.
- 37 Y. Gaber, U. Törnvall, M. a. Kumar, M. Ali Amin and R. Hatti-Kaul, *Green Chem.*, 2011, **13**, 2021.
- 38 C. Capello, U. Fischer and K. Hungerbühler, *Green Chem.*, 2007, **9**, 927–934.
- 39 D. Guillarme, D. T. T. Nguyen, S. Rudaz and J. L. Veuthey, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2008, **68**, 430–440.
- 40 F. Chemat, M. Abert-vian, A. S. Fabiano-tixier and J. Strube, *Trends Anal. Chem.*, 2019, **118**, 248–263.
- 41 P. Justyna, K. Owczarek, M. Tobiszewski and J. Namie, *Trends Anal. Chem.*, 2017, **91**, 12–25.
- 42 M. M. Delgado-Povedano, C. Sánchez-Carnerero Callado, F. Priego-Capote and C. Ferreira-Vera, *Talanta*, 2019, **208**, 120384.
- 43 D. Ballesteros-Vivas, G. Álvarez-Rivera, A. del Pilar Sánchez-Camargo, E. Ibáñez, F. Parada-Alfonso and A. Cifuentes, *J. Chromatogr. A*, 2019, **1584**, 155–164.
- 44 M. Tobiszewski, J. Namieśnik and F. Pena-Pereira, *Green Chem.*, 2017, **19**, 1034–1042.
- 45 F. Chemat, N. Rombaut, A. G. Sicaire, A. Meullemiestre, A. S. Fabiano-Tixier and M. Abert-Vian, *Ultrason. Sonochem.*, 2017, **34**, 540–560.
- 46 M. Tobiszewski, *Anal. Methods*, 2016, **8**, 2993–2999.
- 47 S. Armenta, S. Garrigues and M. de la Guardia, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2015, **71**, 2–8.
- 48 F. Cuyckens and M. Claeys, *J. Mass Spectrom.*, 2004, **39**, 1–15.
- 49 W. Juttuporn, P. Thiengkaew, A. Rodklongtan, M. Rodprapakorn and P. Chitprasert, *Sugar Tech*, 2018, **20**, 599–608.
- 50 M. A. Deseo, A. Elkins, S. Rochfort and B. Kitchen, *Food Chem.*, 2020, **314**, 126180.
- 51 L. Wang, M. H. Pan, C. Y. Lo, H. Zhao, S. Li, C. T. Ho and G. Yang, *Food Funct.*, 2018, **9**, 951–958.

- 52 Y. Zhao, M. Chen, Z. Zhao and S. Yu, *Food Chem.*, 2015, **185**, 112–118.
- 53 Z. G. Zhao, L. C. Zhu, S. Yu, X. Fu and X. A. Zeng, *Zuckerindustrie*, 2008, **133**, 503–507.
- 54 L. M. Avelar Rodrigues, M. das Graças Cardoso, L. R. Batista, W. D. Santiago, J. M. Valério Resende, J. de A. Santiago, M. de Souza Gomes, M. A. Andrade, M. L. Teixeira and F. R. Franca Passamani, *Am. J. Plant Sci.*, 2014, **5**, 2935–2942.
- 55 J. M. Duarte-Almeida, A. Salatino, M. I. Genovese and F. M. Lajolo, *Food Chem.*, 2011, **125**, 660–664.
- 56 G. M. Leme, F. Cacciola, P. Donato, A. J. Cavalheiro, P. Dugo and L. Mondello, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 4315–4324.
- 57 É. Resende Oliveira, M. Caliari, M. Soares Soares Júnior, A. Ribeiro Oliveira, R. Cristina Marques Duarte and E. Valério de Barros Vilas Boas, *J. Food Sci. Technol.*, 2018, **55**, 72–81.
- 58 S. R. Abbas, S. M. Sabir, S. D. Ahmad, A. A. Boligon and M. L. Athayde, *Food Chem.*, 2014, **147**, 10–16.
- 59 J. A. S. Sartori, C. F. Figueiredo Angolini, M. N. Eberlin and C. L. Aguiar, *Ozone Sci. Eng.*, 2019, **41**, 369–375.
- 60 U. Ayhan, M. T. J., M. Mahmut, D. Georgette, C. Jean, P. N. H. and S. Peter, *Rev. Latinoam. Quim.*, 1985, **16**, 63–64.
- 61 S. E. Ali, R. A. El Gedaily, A. Mocan, M. A. Farag and H. R. El-Seedi, *Molecules*, 2019, **24**, 934.
- 62 Y. Zhao, L. Zhu, S. Yu and Z. Zhao, *Sugar Ind.*, 2013, **138**, 525–531.
- 63 Y. Asikin, M. Takahashi, T. Mishima, M. Mizu, K. Takara and K. Wada, *Food Chem.*, 2013, **141**, 466–472.
- 64 F. C. Vila, R. Colombo, T. O. De Lira and J. H. Yariwake, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2008, **19**, 903–908.
- 65 R. Colombo, J. H. Yariwake and M. McCullagh, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2008, **19**, 483–490.
- 66 R. Colombo, J. H. Yariwake, E. F. Queiroz, K. Ndjoko and K. Hostettmann, *Phytochem. Anal.*, 2006, **17**, 337–343.
- 67 T. K. McGhie, *J. Chromatogr. A*, 1993, **634**, 107–112.
- 68 T. J. Mabry, Y. L. Liu, J. Pearce, G. Dellamonica, J. Chopin, K. R. Markham, N. H. Paton and P. Smith, *J. Nat. Prod.*, 1984, **47**, 127–130.

- 69 C. A. Williams, J. B. Harborne and P. Smith, *Phytochemistry*, 1974, **13**, 1141–1149.
- 70 J. M. Duarte-Almeida, G. Negri, A. Salatino, J. E. de Carvalho and F. M. Lajolo, *Phytochemistry*, 2007, **68**, 1165–1171.
- 71 X. Li, S. Yao, B. Tu, X. Li, C. Jia and H. Song, *J. Sep. Sci.*, 2010, **33**, 1216–1223.
- 72 X. Li, Z. Ma and S. Yao, *Food Bioprod. Process.*, 2015, **94**, 547–554.
- 73 R. Zheng, S. Su, J. Li, Z. Zhao, J. Wei, X. Fu and R. H. Liu, *Ind. Crops Prod.*, 2017, **107**, 360–369.
- 74 P. Yu, X. B. Xu and S. J. Yu, *Food Chem.*, 2016, **221**, 1145–1150.
- 75 L. Zhu, Z. Zhao, S. Yu and S. Zhu, *Int. Sugar J.*, 2010, **112**, 24–29.
- 76 E. Kiyota, P. Mazzafera and A. C. H. F. Sawaya, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 7015–7020.
- 77 A. Fantaye, A. Fanta and A. M. Melesse, in *Landscape Dynamics, Soils and Hydrological Processes in Varied Climates. Springer Geography*. A. Melesse, W. Abtew, Springer, Cham, 2016, pp. 549–563.
- 78 O. Sahu, *Ann. Agrar. Sci.*, 2018, **16**, 389–395.
- 79 G. Nuissier, P. Bourgeois, M. Grignon-Dubois, P. Pardon and M. H. Lescure, *Phytochemistry*, 2002, **61**, 721–726.
- 80 S. Madonna Shalma, J. Ranjitha and S. Vijayalakshmi, *Int. J. ChemTech Res.*, 2016, **9**, 635–639.
- 81 F. A. T. Serafim, F. R. F. Seixas, A. A. Da Silva, C. A. Galinaro, E. S. P. Nascimento, S. F. Buchviser, L. Odello and D. W. Franco, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2013, **24**, 973–982.
- 82 F. A. T. Serafim, C. A. Galinaro, A. A. Da Silva, S. F. Buchviser, E. S. P. Do Nascimento, F. V. Novaes and D. W. Franco, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2012, **23**, 1506–1514.
- 83 M. B. Inarkar and S. S. Lele, *ISRN Agron.*, 2012, **2012**, 340158.
- 84 B. N. Suresh and B. S. V. Reddy, *Asian-Australasian J. Anim. Sci.*, 2011, **24**, 1595–1600.
- 85 F. A. T. Serafim, S. F. Buchviser, C. A. Galinaro, D. W. Franco and F. V. Novaes, *Quim. Nova*, 2011, **34**, 28–32.
- 86 G. Nuissier, P. Bourgeois, L. Fahrasmane and M. Grignon-Dubois, *Chem. Nat. Compd.*, 2008, **44**, 552–555.
- 87 N. Ledón, A. Casacó, V. Rodríguez, J. Cruz, R. González, Z. Tolón, M. Cano

- and E. Rojas, *Planta Med.*, 2003, **69**, 367–369.
- 88 R. Martínez, I. Castro and M. Oliveros, *Rev. la Soc. Química México*, 2002, **46**, 64–66.
- 89 F. Tosato, R. M. Correia, B. G. Oliveira, A. M. Fontes, H. S. França, W. K. T. Coltro, P. R. Filgueiras and W. Romão, *Anal. Methods*, 2018, **10**, 1952–1960.
- 90 J. M. L. Mee, C. C. Brooks and R. W. Stanley, *J. Sci. Food Agric.*, 1979, **30**, 429–432.
- 91 L. Casas, Y. Hernández, C. Mantell, N. Casdelo and E. Martinez De La Ossa, *J. Chem.*, 2015, **2015**, 946462.
- 92 G. Qi, F. Peng, L. Xiong, X. Lin, C. Huang, H. Li, X. Chen and X. Chen, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2017, **47**, 276–281.
- 93 J. C. Amorim, R. F. Schwan and W. F. Duarte, *Food Res. Int.*, 2016, **85**, 76–83.
- 94 J. A. S. Barros, M. C. Krause, E. Lazzari, T. R. Bjerck, A. L. do Amaral, E. B. Caramão and L. C. Krause, *Microchem. J.*, 2018, **137**, 30–36.
- 95 P. P. De Souza, A. M. M. Resende, D. V. Augusti, F. Badotti, F. D. C. O. Gomes, R. R. Catharino, M. N. Eberlin and R. Augusti, *Food Chem.*, 2014, **143**, 77–81.
- 96 N. T. C. Magri, J. A. de S. Sartori, J. L. P. Jara, M. N. Eberlin and C. L. de Aguiar, *J. Food Process. Preserv.*, 2019, **43**, e14137.
- 97 F. L. Du, Q. S. Du, J. Dai, P. D. Tang, Y. M. Li, S. Y. Long, N. Z. Xie, Q. Y. Wang and R. B. Huang, *PLoS One*, 2018, **13**, e0197188.
- 98 C. Y. M. Dos Santos, D. de A. Azevedo and F. R. De Aquino Neto, *Atmos. Environ.*, 2002, **36**, 3009–3019.
- 99 D. De Almeida Azevedo, C. Y. M. Dos Santos and F. R. De Aquino Neto, *Atmos. Environ.*, 2002, **36**, 2383–2395.
- 100 J. Zale, J. H. Jung, J. Y. Kim, B. Pathak, R. Karan, H. Liu, X. Chen, H. Wu, J. Candreva, Z. Zhai, J. Shanklin and F. Altpeter, *Plant Biotechnol. J.*, 2016, **14**, 661–669.
- 101 S. Feng, Z. Luo, F. Zeng, S. Liu and Z. U. Khan, *Food Chem.*, 2015, **182**, 171–177.
- 102 O. Sevimoglu and W. F. Rogge, *Aerosol Air Qual. Res.*, 2015, **15**, 1720–1736.
- 103 D. M. da S. Oliveira, J. Schellekens and C. E. P. Cerri, *Sci. Total Environ.*, 2016, **548–549**, 450–462.
- 104 J. R. Girotti, S. J. Mijailovsky and M. P. Juárez, *Physiol. Entomol.*, 2012, **37**, 266–277.

- 105 D. E. Purcell, G. J. Leonard, M. G. O'Shea and S. Kokot, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2005, **76**, 135–147.
- 106 S. Feng, Z. Luo, Z. Zhong, L. Jiang and K. Tang, *J. Sep. Sci.*, 2014, **37**, 1308–1314.
- 107 S. Feng, Z. Luo, Y. Zhang, Z. Zhong and B. Lu, *Food Chem.*, 2014, **151**, 452–458.
- 108 P. Georges, M. Sylvestre, H. Ruegger and P. Bourgeois, *Steroids*, 2006, **71**, 647–652.
- 109 S. Ou, J. Zhao, Y. Wang, Y. Tian and J. Wang, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2012, **45**, 295–298.
- 110 C. Pérez, A. Falero, B. R. Hung, S. Tirado and Y. Balcinde, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **32**, 83–86.
- 111 S. Feng, S. Liu, Z. Luo and K. Tang, *Food Chem.*, 2015, **181**, 9–14.
- 112 M. YAMAOKA and A. KATO, *J. Japan Oil Chem. Soc.*, 1983, **32**, 88–91.
- 113 E. A. Nonato, F. Carazza, F. C. Silva, C. R. Carvalho and Z. L. De Cardeal, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 3533–3539.
- 114 D. Glassop, U. Roessner, A. Bacic and G. D. Bonnett, *Plant Cell Physiol.*, 2007, **48**, 573–584.
- 115 M. Weerawatanakorn, Y. Asikin, M. Takahashi, H. Tamaki, K. Wada, C. T. Ho and R. Chuekittisak, *J. Food Sci. Technol.*, 2016, **53**, 4084–4092.
- 116 Y. Asikin, M. Takahashi, N. Hirose, D. X. Hou, K. Takara and K. Wada, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2012, **114**, 583–591.
- 117 Y. Asikin, T. Chinen, K. Takara, K. Wada and Y. Asikin, *Food Sci. Technol. Res.*, 2008, **14**, 583–588.
- 118 S. P. J. Dullens, R. P. Mensink, M. C. E. Bragt, A. K. Kies and J. Plat, *J. Lipid Res.*, 2008, **49**, 790–796.
- 119 G. L. Chen, H. R. Guo, X. F. Wang and Y. R. Li, *Sugar Tech*, 2007, **9**, 244–248.
- 120 T. Nagata, Y. Katsuta, A. Sugimoto and T. Sato, *BREED.SCI.*, 1994, **9**, 244–248.
- 121 A. de Lucas, A. García, A. Alvarez and I. Gracia, *J. Supercrit. Fluids*, 2007, **41**, 267–271.
- 122 D. Haim, A. Valenzuela, M. C. Brañes, M. Fuenzalida and L. A. Videla, *Grasas y Aceites*, 2012, **63**, 345–354.
- 123 R. Arul Gnanaraj, *Int. J. ChemTech Res.*, 2012, **4**, 705–712.

- 124 K. R. Benjamin, I. R. Silva, J. P. Cherubim, D. McPhee and C. J. Paddon, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2016, **27**, 1339–1345.
- 125 K. Y. Lam, A. Pick, K. Ling, R. Y. Koh, Y. P. Wong and Y. H. Say, *Adv. Pharmacol. Sci.*, 2016, **2016**, 1–6.
- 126 M. He, J. W. Min, W. L. Kong, X. H. He, J. X. Li and B. W. Peng, *Fitoterapia*, 2016, **115**, 74–85.
- 127 S. I. G. Rosa, F. Rios-Santos, S. O. Balogun and D. T. D. O. Martins, *Phytomedicine*, 2016, **23**, 9–17.
- 128 J. S. Choi, M. Nurul Islam, M. Yousof Ali, E. J. Kim, Y. M. Kim and H. A. Jung, *Food Chem. Toxicol.*, 2014, **64**, 27–33.
- 129 D. Sheeja Malar, R. Beema Shafreen, S. Karutha Pandian and K. Pandima Devi, *Pharm. Biol.*, 2017, **55**, 381–393.
- 130 K. Ganesan and B. Xu, in *Annals of the New York Academy of Sciences*, Blackwell Publishing Inc., 2017, vol. 1401, pp. 102–113.
- 131 O. K. Vasant, B. G. Vijay, S. R. Virbhadrappa, N. T. Dilip, M. V. Ramahari and B. S. Laxamanrao, *Iran. J. Pharm. Res.*, 2012, **11**, 621–634.
- 132 G. Carta, E. Murru, S. Banni and C. Manca, *Front. Physiol.*, 2017, **8**, 902.
- 133 V. Aparna, K. V. Dileep, P. K. Mandal, P. Karthe, C. Sadasivan and M. Haridas, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2012, **80**, 434–439.
- 134 R. Kline, J. O'regan, AU Pat., 2015367307B22015. Infant, 2015; Nutrition With Hydrolysed Protein and Palmitic Acid.
- 135 E. Venugopal, N. Rajeswaran, K. S. Sahanand, A. Bhattacharyya and S. Rajendran, *Biomed. Mater.*, 2018, **14**, 015004.
- 136 A. Khanra, M. Srivastava, M. P. Rai and R. Prakash, *ACS Omega*, 2018, **3**, 12369–12382.
- 137 M. Zhou, J. Zhao and X. Hu, *J. Surfactants Deterg.*, 2012, **15**, 309–315.
- 138 Y. W. Liu, P. Y. Zuo, X. N. Zha, X. L. Chen, R. Zhang, X. X. He and C. Y. Liu, *Lipids*, 2015, **50**, 241–251.
- 139 J. C. Taylor, L. Rapport and G. B. Lockwood, *Nutrition*, 2003, **19**, 192–195.
- 140 B. Chu, Y. Qu, Y. Huang, L. Zhang, X. Chen, C. Long, Y. He, C. Ou and Z. Qian, *Int. J. Pharm.*, 2016, **500**, 345–359.
- 141 E. Y. Lee, J. A. Yoo, S. M. Lim and K. H. Cho, *Rejuvenation Res.*, 2016, **19**, 149–158.
- 142 I. Okayasu, S. Hatakeyama, M. Yamada, T. Ohkusa, Y. Inagaki and R. Nakaya,

- Gastroenterology*, 1990, **98**, 694–702.
- 143 M. K. Kaushik, K. Aritake, A. Takeuchi, M. Yanagisawa and Y. Urade, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 8892.
- 144 I. Chinen, US Pat., 20060127450, 2006; Composition Containing Higher Fatty Acid Derivative And Foods And Drinks.
- 145 A. Verma, C. P. Malik, V. K. Gupta and B. K. Bajaj, *Brazilian J. Plant Physiol.*, 2011, **23**, 271–277.
- 146 M. Naeem, A. A. Ansari, T. Aftab, A. Shabbir, M. M. Alam, M. M. A. Khan and M. Uddin, *Plant Biosyst.*, 2012, **146**, 106–113.
- 147 C. Leguizamón, C. L. Weller, V. L. Schlegel and T. P. Carr, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2009, **86**, 707–716.
- 148 C. P. F. Marinangeli, P. J. H. Jones, A. N. Kassis and M. N. A. Eskin, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2010, **50**, 259–267.
- 149 R. Menédez, L. Arruzazabala, R. Más, A. Del Río, A. M. Amor, R. M. González, D. Carbajal, V. Fraga, V. Molina and J. Illnait, *Br. J. Nutr.*, 1997, **77**, 923–932.
- 150 K. Awad, P. Penson and M. Banach, *Pharmacol. Res.*, 2016, **114**, 42–46.