

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

OTÁVIO AGUIAR DE SOUZA

**ABORDAGEM VERDE E MULTIVARIADA PARA EXTRAÇÃO E
ANÁLISE DE METABÓLITOS FENÓLICOS DE *EUGENIA UNIFLORA*
L. UTILIZANDO SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS PROFUNDOS
(NADES)**

ARARAQUARA – SP

2020

OTÁVIO AGUIAR DE SOUZA

**ABORDAGEM VERDE E MULTIVARIADA PARA EXTRAÇÃO E
ANÁLISE DE METABÓLITOS FENÓLICOS DE *EUGENIA UNIFLORA*
L. UTILIZANDO SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS PROFUNDOS
(NADES)**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Química pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Química de Araraquara.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo

ARARAQUARA - SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

S719a Souza, Otávio Aguiar de
Abordagem verde e multivariada para extração e análise de metabólitos fenólicos de *Eugenia uniflora* L. utilizando solventes eutéticos naturais profundos (NADES) / Otávio Aguiar de Souza. – Araraquara : [s.n.], 2020
120 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Daniel Rinaldo

1. Plantas medicinais. 2. Química verde. 3. Planejamento de experimentos. 4. Sustentabilidade. 5. Biodiversidade. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA
DISSERTAÇÃO:

"Abordagem verde e multivariada para extração e análise de metabólitos fenólicos de *Eugenia uniflora* L. utilizando solventes eutéticos naturais profundos (NADES)"

AUTOR: OTÁVIO AGUIAR DE SOUZA

ORIENTADOR: DANIEL RINALDO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. DANIEL RINALDO (Participação Virtual)
Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru



Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. FAUSTO CARNEVALE NETO (Participação Virtual)
Department of Anesthesiology & Pain Medicine / School of Medicine - University of Washington - Estados Unidos

Araraquara, 06 de outubro de 2020

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais

NOME: Otávio Aguiar de Souza

Data de Nascimento: 15/07/1996

E-mail: otavio.aguiar.souza@gmail.com

Formação Acadêmica:

2014- 2018: Licenciatura em Química (Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista – Campus Bauru)

2018-2020: Mestrado em Química (Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista)

Artigos publicados em periódicos indexados:

SOUZA, O.A.; CARNEIRO, R.L.; VIEIRA, T.H.M.; FUNARI, C.S.; RINALDO, D. Fingerprinting *Cynara scolymus* L. (Artichoke) by means of a green statistically developed HPLC-PAD method. Food Analytical Methods (JCR 2019: 2,667), v.11, pp.1977-1985, 2018.

ALARCON, R.; GAGLIERI, C.; SOUZA, O.A.; RINALDO, D.; BANNACH, G. Microwave-assisted syntheses of vegetable oil-based monomer: A cleaner, faster, and more energy efficient route. Journal of Polymers and the Environment (JCR 2019: 2,572) 28, pp.1265-1278, 2020.

Artigos aceitos para publicação:

BORGES, M.S., ZANATTA, A.C., SOUZA, O.A., PELISSARI, J.H., CAMARGO, J.G.S., CARNEIRO, R.L., FUNARI, C.S., BOLZANI, V.S., RINALDO, D. A green and sustainable method for monitoring the chemical composition of soybean: an alternative for quality control. Phytochemical Analysis (JCR 2019: 2,772).

Artigos submetidos para periódicos indexados

SOUZA, O.A., FURLANI, R.P., RAMALHÃO, V.G.S., BORGES, M.S., FUNARI, C.S., BOLZANI, V.S., RINALDO, D. Eco-friendly and inexpensive food grade bioethanol for *Eugenia uniflora* L. chromatographic fingerprinting: a trade-off between separation and sustainability. *Phytochemistry Letters* (JCR 2019: 1,459).

Capítulos de livros submetidos:

AGUIAR, O., RINALDO, D., PORTO, C.M., SAMBRANO, JR., MORGON, N.H., SOUZA, A.R. Computer simulation applied to structural analysis and experimental applications of natural deep eutectic solvents. In.: EMSS – Green Chemistry and Computational Chemistry as a valuable tool in the understanding and design of a new class of green solvents. Elsevier, 2020.

Participação em eventos científicos:

Resumos publicados em anais de congressos

1. ALARCON, R.T.; GAGLIERI, C.; SOUZA, O.A.; RINALDO, D.; BANNACH, G. Fast and green synthesis of maleinized vegetable oil by microwave irradiation. In: 42 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2019, Joinville. Anais SBQ, 2019.
2. SOUZA, O.A.; BORGES, M. FUNARI, C.S.; CARNEIRO, R.L.; RINALDO, D. Green extraction and chromatographic fingerprint optimization towards the HPLC-PAD analysis of *Cynara scolymus* L. by means of a multivariate approach. In: The 70th Southeastern Regional Meeting of the American Chemical Society, 2018, Augusta, Georgia-USA. Abstracts, 2018, p.175-175.
3. SOUZA, OTÁVIO AGUIAR; FUNARI, CRISTIANO SOLEO; CARNEIRO, RENATO LAJARIM; RINALDO, DANIEL. Alternativa verde para *fingerprinting* cromatográfico das folhas de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). In: XIII Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu: Em Busca de produtos naturais bioativos. Botucatu: FCA-Unesp, 2018, p.10-10.
4. SOUZA, O. A.; FUNARI, C.S ; CARNEIRO, R.L ; RINALDO, D. . Application of Doehlert Design for optimization of the chromatographic method for green fingerprinting of *Cynara scolymus* L. by HPLC-PAD. In: III Escola de Inverno de

Quimiometria (EIQ 2017), 2017, Araraquara. Programação Científica e Livro de Resumos, 2017.

5. SOUZA, O. A.; FUNARI, C.S ; CARNEIRO, R.L ; RINALDO, D. . Desenvolvimento de método analítico verde para obtenção de *fingerprinting* metabólico das folhas de *Cynara scolymus* por CLAE-DAD utilizando quimiometria. In: XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2017, Bauru. Trabalhos Apresentados na 1ª Fase do XXIX CIC, 2017.

6. VIEIRA, T. H. M. ; SOUZA, O. A. ; RINALDO, D. . Metodologia ambientalmente amigável para *clean-up* das folhas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) para análise por CLAE-DAD. In: 1ª fase do XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2017, Bauru. Trabalhos Apresentados na 1ª Fase do XXIX CIC, 2017.

7. SOUZA, O. A.; FUNARI, C.S ; CARNEIRO, R.L ; RINALDO, D. . Metodologia de superfície de resposta para obtenção do *fingerprinting* verde de alcachofra por CLAE-DAD. In: XI Semana da Química (Unesp Bauru) - Química e suas aplicações no mundo atual, 2017, Bauru. Livro de resumos, 2017.

8. VIEIRA, T. H. M. ; SOUZA, O. A. ; RINALDO, D. . Aplicação de princípios da química verde na extração em fase sólida (spe) dos analitos das folhas de *Maytenus ilicifolia*. In: XI Semana da Química (UNESP Bauru) - Química e suas aplicações no mundo atual, 2017, Bauru. Livro de resumos, 2017.

9. SOUZA, O. A.; FUNARI, C.S ; CARNEIRO, R.L ; RINALDO, D. ; VIEIRA, T. H. M. . Sustainable and heuristic approach for *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) metabolic fingerprinting by RP-HPLC-PAD: a tradeoff between separation and greenness. In: 6th Brazilian Conference on Natural Products, 2017, Vitória (ES). Abstracts, 2017.

10. SOUZA, O. A.; FUNARI, C.S ; CARNEIRO, R.L ; RINALDO, D. . Important chromatographic parameters for obtaining the artichoke green chromatographic fingerprinting by HPLC-PAD with a sustainable clean-up procedure. In: 46th IUPAC World Chemistry Congress, 2017, São Paulo. Anais - IUPAC 2017(Technical Papers), 2017.

11. SOUZA, O. A.; RINALDO, D. ; FUNARI, C.S ; CARNEIRO, R.L . Influência de fatores cromatográficos na separação de metabólitos secundários de *Cynara*

scolymus ('alcachofra') por CLAE 'verde'. In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2016, Bauru. Trabalhos Apresentados na 2ª Fase do XXVIII CIC, 2016.

12.SOUZA, O. A.; RINALDO, D. ; FUNARI, C.S ; CARNEIRO, R.L . Influência de fatores cromatográficos na separação de metabólitos secundários de *Cynara scolymus* ('alcachofra') por CLAE 'verde'. In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2016, Bauru. Trabalhos Apresentados na 1ª Fase do XXVIII CIC, 2016.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. SOUZA, O. A.; RINALDO, D. ; FUNARI, C.S ; CARNEIRO, R.L . Determinação de variáveis com efeitos importantes na separação de metabólitos secundários de *Cynara scolymus* (alcachofra) por CLAE-DAD, utilizando conceitos de química verde. In: 56° Congresso Brasileiro de Química, 2016, Belém. CD-ROM do 56° CBQ. Rio de Janeiro: ABQ, 2016.

Apresentação oral em eventos nacionais

1. SOUZA, O. A.; RINALDO, D. ; FUNARI, C.S ; CARNEIRO, R.L . Determinação de variáveis com efeitos importantes na separação de metabólitos secundários de *Cynara scolymus* (alcachofra) por CLAE-DAD, utilizando conceitos de química verde. In: 56° Congresso Brasileiro de Química, 2016, Belém. CD-ROM do 56° CBQ. Rio de Janeiro: ABQ, 2016.

Apresentação oral em eventos internacionais

1. SOUZA, O. A.; FUNARI, C.S ; CARNEIRO, R.L ; RINALDO, D. ; VIEIRA, T. H. M. . Sustainable and heuristic approach for *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) metabolic fingerprinting by RP-HPLC-PAD: a tradeoff between separation and greenness. In: 6th Brazilian Conference on Natural Products, 2017, Vitória (ES). Abstracts, 2017.

Organização de eventos

1.Membro da comissão organizadora da XI Semana da Química (Unesp Bauru) - Química e suas aplicações no mundo atual. 2017.

Prêmios e títulos

2020: Aprovado em 2º lugar no processo seletivo para o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Química no Instituto de Química, Unesp Araraquara .

2019: Melhor vídeo de divulgação científica do I Concurso de Vídeos do INCT - BioNat, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Biodiversidade e Produtos Naturais.

2018: Painel premiado no XIII Workshop de Plantas Medicinais: em busca de produtos naturais bioativos, Instituto de Biociências, UNESP Botucatu.

2018: Prêmio Lavoisier - Maior coeficiente de rendimento acadêmico do curso de Licenciatura em Química no período de 2014 a 2018 (Unesp - Bauru), Conselho Regional de Química (CRQ) - IV Região.

2018: Aprovado em 2º lugar no processo seletivo para o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Química no Instituto de Química, Unesp Araraquara.

2018: Menção Honrosa na 1ª Olimpíada Brasileira do Ensino Superior de Química (OBESQ) - 9ª classificação geral nacional, Associação Brasileira de Química (ABQ).

2018: Diploma de Honra ao Mérito para a modalidade Química Analítica (11ª classificação nacional), 1ª Olimpíada Brasileira do Ensino Superior de Química (OBESQ), Associação Brasileira de Química (ABQ).

2018: Diploma de Honra ao Mérito para a modalidade Química Geral (7ª classificação nacional), 1ª Olimpíada Brasileira do Ensino Superior de Química (OBESQ), Associação Brasileira de Química (ABQ).

2018: Diploma de Honra ao Mérito para a modalidade Físico-Química (11ª classificação nacional), 1ª Olimpíada Brasileira do Ensino Superior de Química (OBESQ), Associação Brasileira de Química (ABQ).

2018: Diploma de Honra ao Mérito para a modalidade Química Inorgânica (9ª classificação nacional), 1ª Olimpíada Brasileira do Ensino Superior de Química (OBESQ), Associação Brasileira de Química (ABQ).

2017: Menção honrosa para trabalho intitulado Metodologia de superfície de resposta para obtenção do *fingerprinting* verde de alcachofra por CLAE-DAD na XI Semana da Química, Faculdade de Ciências - Unesp (Bauru).

2017: Selected for oral presentation, 6th Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM.

2016: Trabalho selecionado para apresentação oral, 56º Congresso Brasileiro de Química.

Outros

03-12/2014: Bolsista de Apoio Acadêmico e Extensão (BAAE I) no projeto “A importância da Química no estudo das plantas medicinais”, sob orientação do Prof.Dr. Daniel Rinaldo.

12/2015-12/2017: Bolsista de Iniciação Científica (FAPESP) no projeto “Desenvolvimento de métodos analíticos visando atender aos princípios da química verde para identificação dos princípios ativos de alcachofra por CLAE-DAD”, sob orientação do Prof. Dr. Daniel Rinaldo.

1º semestre de 2016: Monitoria voluntária na disciplina de Físico Química I para o curso de “Bacharelado em Física de Materiais”, sob orientação do Prof.Adj. Antônio Carlos Dias Ângelo, com carga horária de 104h.

08/2016 – 07/2017: Representante discente suplente no Conselho de Curso.

04/2017: Palestra no Colégio Criativo, Bauru: Curso Superior em Química.

01/2017 – 12/2017: Representante de classe junto ao Centro Acadêmico da Química (CAQUI) Marie Curie.

09/2017-07/2018 : Representante discente suplente no Conselho de Departamento de Química.

2º Semestre de 2018: Estágio de docência na disciplina ‘Química Orgânica II’, sob supervisão do Prof. Dr. Daniel Rinaldo (Carga horária total: 60 horas).

07/2018 – 10/2020: Bolsista de mestrado acadêmico (CNPq)

***Dedico essa dissertação à minha mãe, Iraci, ao Jefferson, ao Ytalo
e a mim mesmo por não ter desistido mesmo diante de tantas
dificuldades***

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros e eternos agradecimentos à minha mãe, que do seu jeito sempre apoiou meus passos, meus sonhos e minhas lutas. Sem sua ajuda esse título não existiria. E mesmo se existisse, não faria sentido nenhum se eu não pudesse compartilhar essa vitória com você. Obrigado pelo apoio nesses 24 anos. Te amo.

Agradeço também aos meus amigos Thiago Henrick e Letícia Alves pelo apoio, suporte, pelos momentos compartilhados, risadas, conselhos, confidências, deboches... Vocês são muito importantes para mim. Amo vocês também.

Agradeço ao meu amigo Bruno Felipe (dono da empresa Twitter) pelas conversas durante a madrugada enquanto eu na maioria das vezes estava estressado com alguma coisa da pós. Você ainda vai ser muito famoso.

Agradeço aos guardinhas da UNESP cujos nomes desconheço mas que me acompanham durante anos quando eu preciso trabalhar fora do horário comercial no laboratório. Vocês são muito educados, simpáticos e engraçados. Me desculpem por não saber o nome de nenhum de vocês.

Agradeço ao meu orientador Daniel Rinaldo que tem me acompanhado durante esses 7 anos, desde a iniciação científica. Eu te agradeço por absolutamente tudo Obrigado pelos conselhos, pela paciência, pelas broncas (que muitas vezes foram necessárias, confesso), mas principalmente por ter me dado autoestima, confiança, e por ter feito o possível para tirar o melhor de mim. Às vezes pensamos de maneira completamente diferente e é exatamente essa diversidade de pensamento que foi crucial para meu crescimento ao longo desses anos e para que eu pegasse gosto pela carreira científica. Obrigado pelos açaís de surpresa durante a tarde, pelas conversas a caminho de Araraquara, e por sempre tentar olhar as coisas por um ângulo otimista. Eu falho miseravelmente nisso, mas um dia eu chego lá. Muito obrigado por tudo mesmo. Independente do caminho que eu tome, parte do meu coração sempre vai pertencer ao GREENSEP. Vi esse laboratório ser construído, vi (e participei) das primeiras publicações, primeiros congressos...desejo toda prosperidade do mundo ao grupo que me introduziu à academia.

Agradeço muito ao professor Cristiano Funari por todo o suporte e ajuda, mesmo que à distância, nas pesquisas desde a iniciação científica. Seus artigos são muito bem escritos, meticulosamente pensados...é tudo muito bem feito. Você é um modelo de cientista para mim.

Agradeço aos professores de quimiometria Edenir Rodrigues Pereira Filho, Márcia Breitz, Ronei Poppi (*in memoriam*) e Renato Lajarim Carneiro por terem me introduzido na quimiometria. Vocês fizeram com que eu me “encontrasse” e praticamente impediram que eu abandonasse minha iniciação científica logo ali no início, quando tudo estava dando errado.

Agradeço aos colegas de laboratório Maiara, Rafa, Isa Ferraz, Lucas Trentin pelas conversas, pelas risadas e pela troca de conhecimentos.

Agradeço ao professor Alexandre Legendre por sempre me deixar informado a respeito de oportunidades envolvendo eventos científicos, iniciação científica e olimpíadas acadêmicas, além dos inestimáveis conselhos a respeito da carreira acadêmica. Também o agradeço por ter sido um excelente coordenador de curso e por ter tomado decisões que me beneficiaram e permitiram que meu caminho até aqui fosse menos penoso. Muito obrigado!

Agradeço aos senhores João e Célia Legendre por muito gentilmente terem me hospedado em Araraquara enquanto eu cursava as disciplinas necessárias. Jamais me esquecerei da ajuda de vocês!

Agradeço ao CNPq pela bolsa de estudos concedida (Processo nº 134790/2018-9).

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

Meu mais sincero agradecimento a todos que apoiaram direta ou indiretamente este trabalho, que torcem por mim e que, talvez por esquecimento, não tenham sido incluídos aqui.

RESUMO

Eugenia uniflora L., conhecida como pitanga, é uma planta nativa do Brasil com uma série de propriedades terapêuticas em razão de seus metabólitos secundários constituintes. Para extração de compostos bioativos, estudos metabolômicos e análises cromatográficas envolvendo essa matriz complexa, historicamente têm sido empregadas metodologias e solventes de eficiência questionável, elevado custo associado e impacto negativo para o meio ambiente e a saúde do analista. Considerando que isso representa um cenário anacrônico para o estudo e exploração racional da diversidade micromolecular presente em plantas terapêuticas, o presente trabalho propõe metodologias ambientalmente amigáveis e eficientes para extração e análise do metaboloma das folhas de pitanga. Uma perspectiva holística foi empregada, de modo que planejamentos experimentais robustos, respostas apropriadas que visam simultaneamente a eficiência analítica e ambiental (*Green Chromatographic Fingerprinting* e *HPLC Environmental Assessment Tool*), solventes considerados verdes (bioetanol e solventes eutéticos naturais profundos) e uma metodologia extratora consagrada por sua eficiência (irradiação por microondas) foram empregados como um contraponto aos processos dispendiosos e impactantes geralmente envolvidos no estudo dessa espécie. Desenvolveu-se um método cromatográfico empregando bioetanol como modificador orgânico (5,26% a 52,63% de bioetanol em 30 minutos), seguido por uma metodologia extratora otimizada (47 minutos de irradiação microondas a 800W, 39°C e 0,05:1 de razão entre o material vegetal e o solvente eutético natural profundo cloreto de colina: ácido láctico na razão molar 1:3 contendo 20% de água em massa, empregado como meio extrator). Os métodos cromatográfico e de extração apresentaram maior eficiência e menor impacto ambiental em comparação com metodologias ou solventes de referência e podem mover instituições regulatórias, farmacopeias e o setor acadêmico e industrial a realmente empregarem metodologias de vanguarda no aspecto analítico e ambiental para exploração adequada da biodiversidade brasileira.

Palavras-chave: Plantas medicinais, Química verde, Planejamento de experimentos, Sustentabilidade, Biodiversidade

ABSTRACT

Eugenia uniflora L., known as pitanga, is a plant native from Brazil with several therapeutic properties related to its secondary metabolites. For the extraction of bioactive compounds, metabolomic studies and chromatographic analyzes involving this complex matrix, methodologies and solvents of questionable efficiency, high associated cost and negative impact on the environment and the health of analysts have been historically used. Considering that this represents an anachronistic scenario for the study and rational exploitation of the micromolecular diversity present in therapeutic plants, the present work proposes environmentally friendly, and efficient methodologies for extracting and analyzing the metabolome of the pitanga leaves. A holistic perspective was used, so robust experimental designs, appropriate responses that aim simultaneously at the analytical and environmental efficiency (Green Chromatographic Fingerprinting and HPLC Environmental Assessment Tool), green solvents (bioethanol and natural deep eutectic solvents) and an established extractive methodology well-known by its efficiency (microwave irradiation) were used as a counterpoint to the expensive and impacting processes usually involved in the study of this species. A chromatographic method was developed using bioethanol as an organic modifier (5.26%-52.63% bioethanol in 30 minutes), followed by an optimized extraction methodology (47 minutes of microwave irradiation at 800W, 39 ° and 0.05 : 1 of ratio between the plant material and the natural deep eutectic solvent choline chloride: lactic acid in molar ratio 1: 3 containing 20% water by mass, used as an extraction medium). Chromatographic and extraction methods have shown greater efficiency and less environmental impact compared to reference methodologies or solvents and can move regulatory institutions, pharmacopoeias and the academic and industrial sector to really employ cutting-edge methodologies in analytical and environmental terms for proper exploitation of brazilian biodiversity.

Keywords: Medicinal plants, Green Chemistry, Design of experiments, Sustainability, Biodiversity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Pitangueira (<i>Eugenia uniflora</i> L.)	21
Figura 2: Maceração dinâmica das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> em solução hidroalcoólica de EtOH/H ₂ O 7:3 (v/v)	35
Figura 3: Sistema CLAE empregado em todas as etapas do presente trabalho (Jasco, Japão)	36
Figura 4: Método de integração de picos cromatográficos no <i>software</i> Chromnav (Jasco, Japão)	37
Figura 5: Experimentos realizados no Planejamento Fatorial Fracionário 2 ^v -1 para as colunas XBridge (cromatogramas em verde) e XSelect (cromatogramas em vermelho). Pontos centrais não foram representados; realizados apenas para mensuração do erro	46
Figura 6: Gráfico probabilidade normal com contrastes (principais) significativos representados	47
Figura 7: Cromatogramas dos experimentos 1 a 8 do Planejamento Composto Central (CCD)	50
Figura 8: Cromatogramas dos experimentos 9 a 14 do Planejamento Composto Central (CCD). Pontos centrais otimizados; realizados apenas para o cálculo dos erros	51
Figura 9: Superfícies de resposta para o modelo multivariado (Eq. 7) estimado pelo Planejamento Composto Central (CCD). (a) Desejabilidade Global (D) versus % inicial de EtOH (X ₁), % final de EtOH (X ₂), variável fixada: Temperatura (X ₃ , °C, -1,68179 ou 35°C); (b) Desejabilidade Global (D) versus % inicial de EtOH (X ₁), Temperatura (X ₃ , °C), variável fixada: % final de EtOH (X ₂ , -1,68179 ou 52,63%); (c) Desejabilidade Global (D) versus % final de EtOH (X ₂), Temperatura (X ₃ , °C), variável fixada: % inicial de EtOH (X ₁ , -1,68179 ou 5,26%)	53
Figura 10: (a) Impressão digital cromatográfica do extrato hidroetanólico das folhas de <i>E. uniflora</i> em λ = 270 nm. Fase estacionária: XSelect, 150 × 4,6 mm. Fases móveis: H ₂ O + 1% AcOH (A, v/v) e bioetanol (EtOH grau alimentício 95° GL, B) no seguinte gradiente linear: 5,26 –52,63% B em 30 min. Vazão: 0,6 mL min ⁻¹ . Temperatura de análise: 35 °C; volume de injeção: 20 µL. Espectros UV dos picos cromatográficos majoritários e/ou de picos representativos das classes de metabólitos presentes ou principais marcadores (2, 4, 5 e 6) estão representados acima do cromatograma. 1-3, 5-7 são picos que se encaixam no critério para avaliar a robustez do método (Seção 1.3.6); 2 ácido gálico; 4 pico representativo para a classe metabólica dos taninos hidrolisáveis com unidades de ácido gálico; 5 ácido elágico; 6* quercitrina, pico representativo para a classe dos flavonóis e pico de referência para validação (Seção 1.3.6). (b) Cromatograma obtido a partir da reprodução do método de referência de Assunção et al. (2017). Fase estacionária: Synergi Hydro-RP, 250 × 4,6 mm. Fases móveis: H ₂ O (C) e MeCN (D) no seguinte gradiente: 2-5% D em 0-5 min, 5-20% D em 5-12 min, 20-25% D em 12-15 min, 25-40% D em 15-18 min, 40-80% D em 18-25 min, 80-5% D em 25-28 min e 5-2% D em	

28-30 min . Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Temperatura de análise: 25°C; Volume de injeção: 20 µL.....	57
Figura 11: Programação do método ótimo desenvolvido no sistema CLAE (Jasco, Japão).....	62
Figura 12: Estrutura de (a) ácido gálico; (b) quercitrina e (c) ácido elágico	63
Figura 13: Cromatogramas relativos aos experimentos do Planejamento Fatorial Completo 2 ³ para avaliação da robustez do método. Pontos centrais foram omitidos; realizados apenas para mensurar os erros	67
Figura 14: Pictogramas contendo os scores apresentados na métrica AGREE para (a) o método com bioetanol desenvolvido no presente trabalho e (b) o método de Assunção et al. (2017)	70
Figura 15: Equipamento empregado para síntese e extrações assistidas a microondas (Ethos Easy, Milestone Srl, Itália)	80
Figura 16: Solventes eutéticos naturais profundos (NADESs) preparados. (a) 'MA: Sor 1:1', (b) 'MA: Glu: Fru 1:1:1', (c) 'LA: Suc 1:2', (d) 'ChCl: Glu 1:1', (e) 'ChCl: LA 1:3'	87
Figura 17: Espectros na região do infravermelho (IV) dos solventes eutéticos naturais profundos sintetizados. (a) 'MA: Sor 1:1', em vermelho; (b) 'MA: Glu: Fru 1:1:1', em verde; (c) 'LA: Suc 1:2', em azul; (d) 'ChCl: Glu 1:1', em cinza; (e) 'ChCl: LA 1:3', em amarelo.....	88
Figura 18: Estrutura dos componentes de partida dos NADESs preparados no presente trabalho	90
Figura 19: Valores de (a) área total de picos (V _{xs}) e (b) número de picos obtidos ao se empregar os solventes eutéticos naturais profundos como meios extratores. Resultados indicados como valor médio ± desvio padrão (n=3).....	92
Figura 20: Cromatogramas obtidos para as extrações realizadas com (a) 'MA: Sor 1:1', em vermelho; (b) 'MA: Glu: Fru 1:1:1', em verde; (c) 'LA: Suc 1:2', em azul; (d) 'ChCl: Glu 1:1', em cinza; (e) 'ChCl: LA 1:3', em amarelo. Para condições cromatográficas, vide Seção 2.3.6.	95
Figura 21: Cromatogramas 1 a 8 do Planejamento Composto Central. Para condições cromatográficas, vide seção 2.3.6. Picos oriundos do tempo morto, da mistura eutética ou do bioetanol empregados como meio extrator e/ou componente de fase móvel (destacados com asterisco) foram desconsiderados.	98
Figura 22: Cromatogramas 9 a 14 do Planejamento Composto Central. Cromatogramas do ponto central foram omitidos; realizados apenas para cômputo dos erros. Para condições cromatográficas veja seção 2.3.6. Picos oriundos do tempo morto, da mistura eutética ou do bioetanol empregados como meio extrator e/ou componente de fase móvel (destacados com asterisco) foram desconsiderados.	99
Figura 23: Superfícies de resposta obtidas para o modelo polinomial (Eq. 11) estimado a partir do Planejamento Composto Central (CCD). (a) D versus tempo (min, X ₂), razão material vegetal/NADES (m/m, X ₁); temperatura fixada em -0,82420	

(39°C, X₃), (b) D versus temperatura (°C, X₃), razão material vegetal/ NADES (m/m, X₁); tempo fixado em 1,68179 (47 min, X₂), (c) D versus temperatura (°C, X₃), Tempo (min, X₂); razão material vegetal/NADES (m/m, X₁) fixada em 1,68179 (0,05:1, m/m).

..... 103

Figura 24: Cromatogramas obtidos a partir das extrações assistidas a microondas nas condições ótimas determinadas pelo Planejamento Composto Central nas misturas extratoras (a) ChCl + LA 1:3 (+20% H₂O m/m) e (b) EtOH/ H₂O 7:3 (v/v). Picos oriundos da mistura eutética ou do bioetanol empregados como meio extrator e/ou componente de fase móvel (destacados com asterisco) foram desconsiderados

..... 104

Figura 25: Rampa de aquecimento e método ótimo (fotografados pelo autor) para extração assistida a microondas no visor do equipamento empregado para extração

..... 104

Figura 26: Scores obtidos na métrica AGREE para as metodologias extratoras envolvendo (a) 'ChCl: LA 1:3' e (b) EtOH/ H₂O 7:3 (v/v)

108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores codificados (e reais) das variáveis estudadas seguidas pelas respectivas respostas no Planejamento Fatorial Fracionário 2_v^{5-1}	45
Tabela 2: Valores codificados (e reais) das variáveis restudadas seguidas pelas respectivas respostas no Planejamento Composto Central (CCD).....	49
Tabela 3: Análise de Variância (ANOVA) para o modelo estimado (Eq. 7) através do Planejamento Composto Central (CCD) correlacionando os termos significativos com a Desejabilidade Global (D)	52
Tabela 4: Comparação da performance cromatográfica e ambiental do método proposto no presente trabalho com o método de referência de Assunção et al. (2017) previamente publicado para obtenção de <i>fingerprinting</i> metabólico de <i>Eugenia uniflora</i> L. em CLAE	61
Tabela 5: Compostos propostos para <i>E. uniflora</i> por LC–DAD-MS e dados de UV e MS correspondentes	63
Tabela 6: Valores codificados (e reais) para as variáveis independentes estudadas no Planejamento Fatorial Completo 2^3 e respostas correspondentes aos tempos de retenção relativos (em relação ao pico de referência 6, Fig. 10a e Fig. 13).....	66
Tabela 7: Parâmetros de entrada no software da métrica AGREE para cálculo do <i>score</i> referente ao método cromatográfico desenvolvido e o método de Assunção et al. (2017).....	69
Tabela 8: Diferentes combinações para a preparação dos NADESs.....	80
Tabela 9: Solventes eutéticos naturais profundos sintetizados (contendo 20% de H ₂ O, m/m) e aspecto apresentado pelas misturas resultantes. Para condições de síntese vide Tab. 8.....	86
Tabela 10: Área total e número de picos apresentados ao se empregar os solventes eutéticos sintetizados como meio extrator em extração assistida a microondas	91
Tabela 11: Valores codificados (e reais) para as variáveis estudadas no Planejamento Composto Central (CCD) e respectivas respostas obtidas	97
Tabela 12: Análise de Variância (ANOVA) para o modelo estimado (Eq. 11) através do Planejamento Composto Central (CCD) correlacionando os termos significativos com a Desejabilidade Global (D).....	100
Tabela 13: Comparação entre a capacidade extratora, impacto ambiental e performance holística do solvente eutético natural 'ChCl + LA 1:3' e a mistura de referência composta por EtOH e H ₂ O na proporção 7:3 (v/v).....	105
Tabela 14: Parâmetros de entrada no <i>software</i> da métrica AGREE para cálculo do <i>score</i> referente às extrações empregando como solvente 'ChCl: LA 1:3' e 'EtOH/H ₂ O 7:3 (v/v)'	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOH	Ácido acético
ANOVA	Análise de Variância
C ₁₈	Fase estacionária de fase reversa do tipo Octadecilsilano
CCD	Planejamento Composto Central
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência
DAD	Detector por Arranjo de Diodos
DES	<i>Deep Eutectic Solvent</i>
DoE	<i>Design of Experiments</i>
DPR	Desvio Padrão Relativo
EtOH	Etanol
GAC	<i>Green Analytical Chemistry</i>
GCFR	<i>Green Chromatographic Fingerprinting Response</i>
GCF	<i>Green Chromatographic Fingerprinting</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IL	<i>Ionic liquid</i>
LTTM	<i>Low-Transition Temperature Mixture</i>
MAE	<i>Microwave-assisted extraction</i>
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
MS	Espectrometria de Massas
mV	Milivolt
m/z	Razão massa/carga
NADES	<i>Natural Deep Eutectic Solvent</i>
PTFE	Politetrafluoroetileno
TFA	Ácido trifluoroacético
tR	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
Z	Medida de afastamento da média populacional
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO	21
<i>Pitanga</i>	21
<i>Solventes verdes</i>	24
OBJETIVO GERAL	28
CAPÍTULO 1.....	29
1.1 INTRODUÇÃO E REVISÃO.....	30
1.2 OBJETIVOS	33
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
1.3.1 Produtos químicos e reagentes.....	34
1.3.2 Material vegetal.....	34
1.3.3 Extração de metabólitos secundários de <i>E. uniflora</i> por maceração dinâmica	34
1.3.4 Instrumentação e análises CLAE	35
1.3.5 Triagem e otimização: Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)	37
1.3.6 Validação do método otimizado	42
1.3.7 Avaliação do impacto ambiental: AGREE	42
1.3.8 Análises subsequentes por CLUE-DAD-MS.....	43
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
1.4.1 Planejamento Fatorial Fracionário 2_v^{5-1} : Escolha da melhor coluna cromatográfica e seleção das variáveis significativas	44
1.4.2 Otimização: Planejamento Composto Central (CCD)	48
1.4.3 Comparação da performance e do impacto ambiental do método desenvolvido em relação a um método de referência da literatura	56
1.4.4 Aplicação do método desenvolvido para detecção dos principais classes de metabólitos secundários presentes nas folhas de <i>E. uniflora</i>	62
1.4.5 Validação do método cromatográfico	64
1.4.5.1 Precisão instrumental.....	64
1.4.5.2 Repetibilidade	64
1.4.5.3 Precisão Intermediária	65
1.4.5.4 Robustez.....	65
1.4.6 AGREE – Analytical GREEness.....	68
1.5 CONCLUSÃO	72
CAPÍTULO 2.....	73
2.1 INTRODUÇÃO E REVISÃO.....	74
2.2 OBJETIVOS	78

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	79
2.3.1 Materiais	79
2.3.2 Preparação dos solventes eutéticos naturais profundos (NADESs)	79
2.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho	81
2.3.4. Extração assistida a microondas (MAE) do metaboloma de <i>E. uniflora</i>	81
2.3.4.1 Triagem com diferentes NADESs	81
2.3.4.2 Otimização com o Planejamento Composto Central e Função de Desejabilidade Global.....	81
2.3.5 Preparação das amostras para injeção no sistema CLAE.....	83
2.3.6 Análises em CLAE	84
2.3.7 Comparação entre extração assistida a microondas desenvolvida e otimizada com NADES e metodologia extratora com solvente de referência	84
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
2.4.1 Aspecto dos solventes eutéticos naturais profundos (NADESs) preparados	86
2.4.2 Caracterização dos solventes eutéticos naturais profundos (NADESs): espectroscopia na região do infravermelho.....	87
2.4.3 Triagem: Avaliação da performance dos solventes eutéticos naturais profundos como solventes extratores do metaboloma de <i>E. uniflora</i>	90
2.4.4 Otimização da extração através Planejamento Composto Central (CCD) e comparação com sistema solvente de referência	96
2.4.5 AGREE: Analytical GREEness Calculator.....	106
2.4.6 Princípios da Extração Verde aplicados.....	109
2.5 CONCLUSÃO	110
CONCLUSÃO GERAL	111
REFERÊNCIAS	111

INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO

Pitanga

Eugenia uniflora L. (Myrtaceae, Fig. 1), também conhecida como pitanga, é uma espécie vegetal nativa do Brasil. No entanto, sua versátil adaptabilidade a diferentes condições de solo e clima justificam sua presença em outros países da América do Sul, Central e do Norte, além da Europa e da Ásia. Seu fruto tem um sabor característico altamente apreciado com aplicações na indústria de alimentos para produção de suco e polpa congelada, por exemplo (CELLI, PEREIRA-NETTO, BETA., 2011; MALAMAN et al., 2011; MARTINEZ-CORREA et al., 2011; SILVA, 2006; BEZERRA et al., 2004; RUTZ et al., 2013; LIRA JUNIOR et al., 2007).



Figura 1: Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)

Fonte: Arquivo pessoal

Essa espécie pode ser utilizada como alternativa terapêutica na medicina popular considerando seu potencial farmacológico intrínseco (SCHAPOVAL et al., 1994). Especialmente, suas folhas apresentam atividades antioxidante (MARTINEZ-CORREA et al., 2011), anti-inflamatória (SCHAPOVAL et al., 1994), anti-hipertensiva (CONSOLINI, BALDINI, AMAT, 1999) e anti-hiperglicêmica (ARAI et al., 1999), entre outras. O amplo intervalo de atividades biológicas apresentado por essa espécie justifica sua identificação para potencial produção de fitoterápicos pelo Ministério da Saúde do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2009). Tais atividades terapêuticas são relacionadas ao metaboloma presente em tais folhas (como taninos e flavonoides; LEE et al., 1997; RATTMANN et al., 2012) que pode ser derivado de interações entre fatores bióticos (como genes, proteínas, entre outros) e o ambiente (PILON et al., 2016; FIEHN, 2002; WOLFENDER et al., 2013; NICHOLSON e LINDON, 2008; YULIANA et al., 2011).

Além disso, sua pronta disponibilidade evita gastos e impactos ambientais cumulativos no que tange à sua aquisição, além de garantir um maior controle sobre suas condições de armazenamento e conservação (GAŁUSZKA et al., 2012).

Não obstante, sob uma perspectiva histórica, há trabalhos na literatura (como o trabalho de Bagetti et al., 2011) que envolvem a extração propriamente dita de compostos bioativos da pitanga com o emprego de solventes orgânicos voláteis, majoritariamente poluentes, inflamáveis e tóxicos para o experimentador e para o meio ambiente (MBOUS et al., 2017; VENTURA et al., 2017). Embora certos trabalhos (como o de Schapoval et al., 1994) empreguem meios extratores (seja na forma pura ou como componentes majoritários em soluções) solventes considerados ambientalmente amigáveis, suas vantagens do ponto de vista ecológico podem ser ofuscadas visto que os mesmos majoritariamente podem utilizar técnicas convencionais pouco versáteis (como maceração e percolação por exemplo), às quais exigem um elevado gasto de recursos – em termos de energia, tempo e volume de solventes - geram resíduos sólidos (como a extração em fase sólida) e possuem eficiência questionável (WANG, WELLER, 2006).

A análise dos metabólitos secundários extraídos também é digna de nota: Nesse âmbito, em razão de sua versatilidade e eficácia, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a detectores UV ou MS se destaca como técnica analítica. Em levantamento bibliográfico realizado na base de dados ISI Web of

Science entre 21 e 24 de fevereiro de 2019, constatou-se que 100% dos trabalhos envolvendo *E. uniflora* que empregam cromatografia líquida (LC) na determinação dos compostos bioativos empregam acetonitrila e metanol como fases móveis nos estudos. Embora tais solventes possuem propriedades físico-químicas desejáveis do ponto de vista cromatográfico, além de gerar resíduos de tratamento dispendioso, eles são tóxicos à vida aquática e aos humanos mesmo em grau analítico, principalmente aos analistas expostos a tais solventes em análises rotineiras envolvendo estudos metabolômicos e controle de qualidade. O cenário se torna ainda mais preocupante porque tais solventes podem ser utilizados de modo indiscriminado ou excessivo em tais trabalhos. Desse modo, o uso de solventes e técnicas extratoras em estudos envolvendo a pitanga, uma matriz vegetal de interesse terapêutico, é inconsistente para o progresso da Química de Produtos Naturais sob uma perspectiva holística, visto que seu campo de estudo - envolvendo essencialmente organismos como plantas e fungos, ecossistemas de modo geral e as relações bióticas e abióticas intrínsecas - pode ser potencialmente danificado pelos mesmos solventes tóxicos empregados em sua investigação. Adicionalmente, produtos químicos e metodologias ambientalmente danosas são incompatíveis com a Química Analítica Verde (Green Analytical Chemistry ou GAC, GAŁUSZKA, MIGASZEWSKI, NAMIEŚNIK, 2013; WELCH et al., 2010; GABER et al., 2011; KALJURAND e KOEL, 2011; HUTCHINSON et al., 2012, FRITZ, RUTH, KRAGL, 2009, FUNARI et al., 2014b).

Solventes verdes

Além do uso de técnicas modernas eficientes e sustentáveis, o tópico de maior interesse da Química Analítica Verde nos dias atuais envolve desenvolver e aplicar solventes alternativos ambientalmente amigáveis, com base no fato de que os maiores gastos em sínteses e processos (considerando a execução dos processos em si, os dispêndios envolvidos em aquisição, bem como quantidade de resíduos gerados e sua disposição e tratamento adequados) estejam diretamente relacionados aos solventes tradicionais (ANASTAS & WARNER, 1998; ANASTAS & EGHBALI, 2010; GAŁUSZKA, MIGASZEWSKI, NAMIEŚNIK, 2013; TOBISZEWSKI, MECHLIŃSKA, NAMIEŚNIK, 2010).

Em 2011, Choi et al. propuseram na literatura científica a existência de solventes completamente convenientes para os interesses da Química Analítica Verde, e oriundos da própria natureza: os solventes eutéticos naturais profundos, ou *Natural Deep Eutectic Solvents* (NADESs). O termo NADES, segundo os mesmos autores, refere-se a uma espécie de fase líquida ou mistura eutética formada por metabólitos primários (açúcares, álcoois, derivados de colina, ácidos orgânicos, entre outros), com estrutura supramolecular gerada a partir de ligações de hidrogênio entre os componentes de partida e presentes nas células de plantas. Tal fase líquida é descrita como um fluido separado da água e lipídios, e importante para o metabolismo celular nas espécies vegetais visto que desempenharia papéis como controle de composição de metabólitos secundários de polaridade reduzida nas células, biossíntese, germinação, resistência ao estresse salino e frio e seca intensos.

Na literatura científica, as principais aplicações dos NADESs envolvem a extração de fenóis e flavonoides, evidenciando a potencialidade destes solventes na produção de extratos de plantas (ESPINO et al., 2016; ZHAO et al., 2015). Além disso, os NADES são considerados por Radočšević et al. (2016) como '*designer solvents*' devido às suas múltiplas possibilidades estruturais e o potencial para planejar suas propriedades físico-químicas para propósitos distintos. Nesse contexto, não é surpreendente que Paiva et al. (2014) considerem os NADES como 'solventes do século 21'.

Considerando que tais solventes inteligentes representam um tópico de pesquisa crescente e relativamente novo (além do fato de a sua definição ainda

representar uma novidade), informações confusas ou diferentes sobre eles podem ser encontradas na literatura e esse fenômeno é reconhecido por alguns autores (ESPINO et al., 2016; DURAND, LECOMTE, VILLENEUVE, 2016). Diferentes nomenclaturas como líquidos iônicos (*ionic liquids*, ou ILs), solventes eutéticos profundos (tradução livre de *deep eutectic solvents*, ou DES) e misturas de baixa temperatura de transição (tradução livre de *Low-Transition Temperature Mixtures*, ou LTTMs) podem ser utilizadas de modo indiscriminado (e às vezes, até mesmo equivocado) para se referirem aos NADESs, provavelmente porque tais classes de solventes podem compartilhar um mecanismo comum de formação (p.ex. podem ser formados pela combinação de componentes primários) e podem apresentar propriedades físico-químicas similares (como baixa temperatura de transição, volatilidade negligenciável, baixa pressão de vapor, etc; DURAND, LECOMTE, VILLENEUVE, 2016).

Em partes tal fenômeno faz sentido visto que a terminologia 'NADES' é mais nova do que as terminologias 'IL' e 'DES': ILs and DESs foram introduzidos na literatura em 1914 (CHOI et al., 2011; PLECHKOVA e SEDDON, 2008) e 2002/2003 (ABBOTT et al., 2003), respectivamente. Também, existe uma relação entre fatores cientométricos como fator de impacto, número de citações de um dado manuscrito ou a carreira dos autores de um eventual trabalho pioneiro que envolva algum solvente particular no que tange à consolidação ou preferência de alguns desses termos em detrimento de outros entre a comunidade científica.

Assim, até 2011 apenas as terminologias 'IL' e 'DES' eram disponíveis para denominar e classificar os NADES (que podem se encaixar em uma ou várias dessas nomenclaturas alternativas), além do fato de que a delimitação de uma fronteira de classificação entre alguns desses solventes não ser uma tarefa trivial e nem mesmo razoável em alguns casos (p.ex. diferenciar os 'DESs' de 'NADESs') considerando que as propriedades comuns entre eles; conduzindo alguns autores a classificar 'ILs', 'DESs' e 'NADESs' como subfamílias de LTTMs. Porém, tal confusão se torna um pouco problemática em alguns contextos considerando que algumas propriedades ou características de tais classes de solventes podem ser distintas, como reatividade, além do caráter sustentável dos (NA)DESs em comparação com os líquidos iônicos, por exemplo (PAIVA et al., 2014; DURAND, LECOMTE, VILLENEUVE, 2016). Portanto, em vários trabalhos presentes na literatura antes e após 2011 (alguns dos quais inclusive vigoram dentre os mais citados no que tange a levantamentos

bibliográficos envolvendo um nome de uma das classes de solventes supracitadas em específico) os NADESs têm sido classificados com nomes alternativos (DURAND, LECOMTE, VILLENEUVE, 2016; FRANCISCO, van den BRUINHORST, KROON, 2013; ZHANG et al., 2012; SMITH, ABBOTT, RYDER, 2014).

De acordo com Dai et al. (2013a), Espino et al. (2016) e Gomez et al. (2018) há quatro métodos para preparação dos NADESs: (1) *heating and stirring* (HS); (2) evaporação; (3) *freeze-drying* e (4) irradiação por microondas. As propriedades físico-químicas dos NADESs preparados são funções da viscosidade, condutividade, densidade e polaridade da mistura eutética. A flexibilidade de composição dos (NA)DESs tornou tais solventes uma ferramenta promissora em muitas áreas, dentre as quais pode-se citar a eletroquímica (ABBOTT et al., 2011), a nanotecnologia (WAGLE, ZHAO, BAKER, 2014) e a farmacologia (JELIŃSKI e CYSEWSKI, 2018). Também, uma das aplicações fundamentais de tais misturas são seu emprego como meios extratores sustentáveis (DAI et al., 2013b, WEI et al., 2015a).

Ainda que bases de dados como a ISI Web of Science já reúnam uma série de artigos que empreguem NADES como meios extratores e enfatizem seu caráter mais verde em relação a solventes tradicionais, notam-se incoerências sistemáticas na aplicação de tais misturas como solventes verdes, as quais se contrapõem aos conceitos e princípios da Química Analítica Verde e, por consequência, às potenciais vantagens analíticas e ambientais dos NADES, como (i) emprego de técnicas que exijam um gasto elevado de tempo e energia, como o de Liu et al. (2018); (ii) diluição dos extratos de NADES com solventes orgânicos antes da injeção, a exemplo do trabalho de Nam et al. (2015), publicado na *Green Chemistry*; (iii) combinação de NADES com solventes com *potencial* risco para o meio ambiente e o analista, como em Ribeiro, Coelho e Marrucho (2013); (iv) recuperação de analitos de interesse de extratos de NADES e eluição com metanol, como em Abdul Hadi et al. (2015); e (V) análises subsequentes dos extratos de NADES em HPLC empregando acetonitrila e metanol, tóxicos e poluentes, como fases móveis. Tal problema, com exceção do trabalho de Funari et al. (2019), envolve quase a totalidade dos estudos envolvendo NADES que empregam CLAE como técnica de análise.

A substituição de solventes tóxicos, poluentes e de preço elevado como acetonitrila e metanol - usualmente empregados em estudos metabolômicos ou análises controle de qualidade via CLAE - é prioritária, obviamente, do ponto de vista

ecológico e econômico. Do mesmo modo que os NADES se apresentam como substitutos promissores de solventes extratores tóxicos, poluentes e caros, o uso de fases móveis ecologicamente amigáveis é uma prática coerente com a Química Analítica Verde, com conceitos valorizados nos tempos atuais como *bioeconomia* – ou o uso de materiais renováveis como blocos construtores elementares de materiais, produtos químicos e fonte de energia – e, por consequência, com os interesses de agências como a Organização das Nações Unidas, a exemplo da *Agenda para Desenvolvimento Sustentável de 2030*, uma espécie de plano de ação que incentiva fortemente a adoção de práticas inofensivas ao meio ambiente para o alcance macroestrutural e sólido de um equilíbrio social, ambiental e econômico em escala global (THE UNITED NATIONS, 2015; MCCORMICK & KAUTTO, 2013).

Nesse contexto, solventes como o bioetanol apresentam um elevado potencial como alternativa verde em razão de suas propriedades como biodegradabilidade, origem renovável, preço potencialmente inferior em relação aos solventes tradicionais e maior disponibilidade, além de oferecerem a possibilidade de análise sem a geração de resíduos tóxicos e serem aplicáveis por pequenos laboratórios, ou localidades ecologicamente sensíveis e países em desenvolvimento onde a conveniente disposição de resíduos é muito cara ou não é bem estabelecida (FUNARI et al., 2014b, FUNARI et al., 2016). Alguns trabalhos na literatura, como os de Funari et al. (2016) e Welch et al. (2015) admitem que o bioetanol possui eficiência cromatográfica comparável ou superior a de solventes tradicionais empregados em CLAE. Ainda que tal solvente e suas misturas apresentem maior viscosidade em relação à acetonitrila ou metanol, essa desvantagem pode ser anulada pelo emprego de estratégias multivariadas e por uma abordagem holística em sua aplicação.

O uso dos NADES, uma nova geração de solventes como meios extratores, associado a técnicas modernas, comprovadamente eficazes e que garantam baixo consumo de energia e volume de solventes, como as extrações assistidas por micro-ondas (*microwave assisted extraction*, ou MAE, segundo WANG, DING e REN, 2016) e planejamentos fatoriais, além do uso de solventes alternativos como bioetanol nas análises em CLAE, indubitavelmente caracterizam um avanço para a Química dos Produtos Naturais – a qual muitas vezes emprega técnicas laboriosas, financeiramente dispendiosas e solventes tóxicos e igualmente caros - e são realmente coerentes com os conceitos e princípios da Química Analítica Verde.

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral, sob uma perspectiva global, o desenvolvimento de metodologias inovadoras, ambientalmente amigáveis e robustas para controle de qualidade das folhas de *Eugenia uniflora* L. desde a extração até a análise dos seus constituintes, empregando solventes eutéticos naturais profundos como meios extratores, extração de compostos bioativos assistida por micro-ondas, análises cromatográficas utilizando bioetanol como fase móvel e Planejamentos Experimentais aliados a métricas apropriadas que garantam eficiência analítica, economia de tempo e recursos e baixo impacto ambiental.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO E REVISÃO

A ampla diversidade metabólica presente em plantas medicinais e a possibilidade de interação sinérgica entre vários compostos bioativos no que tange ao seu papel nas propriedades terapêuticas globais de tais matrizes complexas tornam o desenvolvimento robusto de medicamentos à base de plantas uma tarefa complicada (TISTAERT, DEJAEGHER, VANDER HEYDEN, 2011; LIANG, XIE, CHAU, 2010, LI et al., 2010). Assim, nesse contexto, uma abordagem multicomponente deve ser aplicada para padronização e controle de qualidade de plantas com potencial farmacológico (e, por consequência, seus derivados) visando garantir segurança e eficiência. Como exemplo de abordagem multiparamétrica pode-se citar *fingerprints* cromatográficos representativos, sugeridos pela *US Food and Drug Administration* (FDA) e pela Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*, WHO; WOLFENDER et al., 2015; SOUZA et al., 2018; US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1991).

O desenvolvimento de métodos cromatográficos empregando Metodologia de Superfície de Resposta é útil para obtenção de *fingerprints* metabólicos de plantas. Em oposição à abordagem tradicional *one variable at a time* (OVAT), a Metodologia de Superfície de Resposta é uma abordagem multivariada que estuda os fatores de interesse de modo simultâneo, sistemático e imparcial empregando Planejamento de Experimentos (*Design of Experiments*, ou DoE), possibilitando identificar interações possíveis entre as mesmas, ajustar os dados experimentais a equações de regressão que descrevam a matriz ou sistema estudados, realizar previsões estatísticas e identificar condições analíticas ótimas através de superfícies de resposta. Adicionalmente, através da Metodologia de Superfície de Resposta é possível obter o máximo de informação com um número mínimo de experimentos, economizando tempo e recursos (LEARDI, 2009; MYERS, MONTGOMERY, COOK, 2016; PILON et al., 2016; MONTGOMERY, 2017; BREITKREITZ, JARDIM, BRUNS., 2009; SOUZA et al., 2018).

A seleção de uma função-resposta apropriada também é importante para obter um *fingerprint* cromatográfico eficiente sobretudo se o desenvolvimento do método em si envolver propósitos sustentáveis. Assim, deve-se considerar simultaneamente

parâmetros de separação e ambientais nesse âmbito. Nesse contexto, é proveitoso saber que a métrica *Green Chromatographic Fingerprinting Response* (FUNARI et al., 2014a) foi proposta na literatura objetivando obter uma compensação entre separação e sustentabilidade. Tal métrica essencialmente visa maximizar o número de informação química por quantidade de solvente e energia gastos (FUNARI et al., 2014a). A seleção de um solvente alternativo ambientalmente amigável apropriado que apresente compatibilidade com a plataforma analítica empregada também é um ponto sensível que deve ser considerado. Dentre os solventes orgânicos altamente disponíveis, etanol (EtOH) é considerado o mais verde (NUTRIZIO et al., 2020) e portanto pode auxiliar pesquisadores a atingirem tais objetivos. Para um *fingerprint* cromatográfico verde, tal solvente é preferível diante dos frequentemente empregados porém potencialmente tóxicos acetonitrila (MeCN) e metanol (MeOH; PRAT, HAYLER, WELLS, 2014; PRAT et al., 2016; WELCH et al., 2010; PUBLIC HEALTH ENGLAND, 2015). Além disso, ele pode ser produzido a partir de recursos renováveis como cereais e cana de açúcar e é biodegradável, o que são características altamente desejáveis para um solvente considerado verde (CHEMAT, VIAN, CRAVOTTO, 2012; OLIVES, GONZÁLEZ-RUIZ, MARTÍN, 2017; ZABED et al., 2017; NUTRIZIO et al., 2020). Etanol e até mesmo bioetanol foram aplicados de modo bem-sucedido para desenvolvimento de impressões digitais cromatográficas de plantas e outras matrizes complexas naturais, como demonstrado previamente na literatura (FUNARI et al., 2014a; FUNARI et al., 2014b; FUNARI et al., 2016; SOUZA et al., 2018). As potenciais desvantagens no emprego de etanol em sistemas CLAE (como por exemplo a viscosidade relativamente alta de misturas de EtOH/H₂O) foram superadas em tais trabalhos, conduzindo a separações cromatográficas satisfatórias e mais sustentáveis.

As abordagens supracitadas possibilitam a aplicação de princípios da Química Analítica Verde (*Green Analytical Chemistry*, ou GAC; GAŁUSZKA MIGASZEWSKI, NAMIEŚNIK, 2013). Resumidamente, os 12 princípios da GAC estabelecem o seguinte:

- 1) Técnicas analíticas diretas devem ser empregadas para evitar tratamento de amostra;
- 2) As dimensões e quantidade das amostras devem ser minimizadas;
- 3) Medições *in situ* são prioritárias;

- 4) Deve ocorrer a integração entre processos e operações analíticas;
- 5) Métodos automatizados e miniaturizados têm preferência;
- 6) Deve-se evitar derivação;
- 7) Geração de resíduos deve ser muito reduzida e um manejo adequado dos mesmos deve ocorrer;
- 8) Métodos multianalito ou multiparamétricos são prioritários;
- 9) O gasto de energia deve ser o mínimo possível;
- 10) O uso de reagentes oriundos de fontes renováveis tem prioridade;
- 11) Reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos;
- 12) A segurança do analista deve ser maior.

Assim, o objetivo geral desse capítulo é apresentar um método em CLAE-DAD globalmente otimizado, eficiente e sustentável para *fingerprinting* metabólico das folhas de *E. uniflora*. Para atingir esse objetivo, todo o processo foi guiado o tanto quanto possível pelos princípios e conceitos da GAC (GAŁUSZKA, MIGASZEWSKI, NAMIEŚNIK, 2013). Assim, abordagens multivariadas e multianalito foram selecionadas, parâmetros de separação e sustentabilidade foram igualmente monitorados através de duas funções-resposta apropriadas e complementares entre si, bioetanol grau alimentício foi escolhido como modificador orgânico e um sistema CLAE convencional foi empregado para tornar o método desenvolvido compatível até mesmo com aparatos que não necessariamente correspondam ao estado-da-arte em termo de instrumentação.

1.2 OBJETIVOS

- Desenvolver e otimizar um método de eluição ambientalmente amigável para *fingerprinting* metabólico das folhas de *Eugenia uniflora* L. empregando planejamento de experimentos e considerando simultaneamente aspectos ambientais e de separação;
- Validar qualitativamente o método desenvolvido segundo recomendações internacionais;
- Estabelecer comparações entre o método desenvolvido e um método de referência da literatura em termos de performance cromatográfica e impacto ambiental aplicando métricas apropriadas.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Produtos químicos e reagentes

Ácido acético (grau analítico, Synth, Brasil), etanol (EtOH alimentício Agro Industrial Tarumã Ltda., Brasil), etanol (EtOH, grau HPLC, LiChrosolv, Merck KGaA, Alemanha), H₂O ultrapurificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA) e acetonitrila (MeCN, LiChrosolv, Merck KGaA, Alemanha) foram empregados nesta etapa específica do trabalho.

1.3.2 Material vegetal

Folhas de *E. uniflora* L. foram coletadas na Universidade Estadual Paulista (Unesp), na cidade de Bauru-SP, Brasil, em 23 de novembro de 2018, período da manhã (Cadastro/registo no SisGen nº A8E8E03; data do cadastro: 29/01/2020, 16:36:34; cadastro concluído). A identidade botânica do material vegetal foi autenticada no Departamento de Biologia da mesma universidade, e identificada pela Profa. Dra. Veridiana de Lara Weiser Bramante. O *voucher* foi depositado no Herbário UNBA da Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista (Unesp) na cidade de Bauru-SP sob o código de registo “Herbário UNBA 6067”. Após coletadas, as folhas foram secas a 40°C durante 10 dias em estufa de ar circulante (SPLabor, Brasil) e pulverizadas em triturador mecânico (LB Balanças, Brasil). O material resultante foi colocado em frasco âmbar e protegido da umidade e do calor.

1.3.3 Extração de metabólitos secundários de *E. uniflora* por maceração dinâmica

Aproximadamente 100 mg das folhas secas e pulverizadas de *E. uniflora* foram submetidas à maceração dinâmica a 200 rpm, por 2h (Heidolph, Alemanha) com 10 mL de solução de EtOH 95°GL grau alimentício/H₂O [(7,37:2,63 (v/v), correspondente a EtOH: H₂O 7:3 (v/v)]. A proporção de material vegetal:solução extratora foi de 1:10 m/v . O material vegetal com a solução extratora foram submetidos a banho ultrassônico a 40 kHz (Ultronique, Eco-Sonics, Brasil) durante 30 min , com substituição da água do banho cada 10 minutos para evitar possível aquecimento. O sobrenadante foi centrifugado a 7200 rpm durante 2

min (BioPet Technologies, global Trade, Brasil). Finalmente, o extrato hidroetanólico de razão material vegetal/solução extratora 10 mg mL^{-1} foi filtrado através de um microfiltro de PTFE de $0,45 \mu\text{m}$ (SimplePure - Allcrom, Brasil). Com exceção da avaliação da precisão intermediária, $20 \mu\text{L}$ foram injetados no sistema CLAE em todas as etapas deste trabalho. A figura 2 é representativa do processo de extração.



Figura 2: Maceração dinâmica das folhas de *Eugenia uniflora* em solução hidroalcoólica de EtOH/H₂O 7:3 (v/v)

Fonte: Fotografado pelo autor

1.3.4 Instrumentação e análises CLAE

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema CLAE (Jasco, Japão, Fig. 3) com detector por arranjo de diodos (modelo MD-2010 plus), injetor automático (modelo AS-2055 plus), bomba quaternária (modelo PU-2089 plus) e forno de coluna (modelo CO-2060 plus), bem como pré-aquecedor de $2 \mu\text{L}$ (Thermo Fischer Scientific, EUA) posicionado no forno de coluna e

acoplado à pré-coluna (4x3 mm, 5 µm; Phenomenex, EUA). Para a separação dos metabólitos, duas colunas de fases ligadas diferentes mas de mesma dimensão foram testadas: XSelect (fase ligada fenil-hexil), e XBridge (C₁₈ polimérica) ambas com 150 x 4,6 mm, d.i. 5 µm (Waters, EUA). A aquisição e processamento de dados cromatográficos e espectrais foram realizados com o emprego do software ChromNAV (Jasco, Japão). Os experimentos foram monitorados a $\lambda=270$ nm. Sinais com área mínima de 100 mV·s (Fig. 4) foram considerados picos, uma vez que este valor é ligeiramente maior do que as áreas de algumas impurezas residuais da produção e armazenamento de bioetanol (etanol grau alimentício) identificadas no branco e porque este valor permitiu que espectros de UV fossem registrados para os compostos de interesse.



Figura 3: Sistema CLAE empregado em todas as etapas do presente trabalho (Jasco, Japão)

Fonte: Fotografado pelo autor

O método estatisticamente otimizado empregou como fases móveis um sistema binário composto por H₂O + 1% AcOH (v/v, A) e EtOH 95°GL (B). O equilíbrio da coluna foi atingido com 5,26% de B em 25 min em vazão de 1 mL min⁻¹ (eluição isocrática com 10 volumes, considerando as recomendações do fabricante da coluna), seguido por gradiente linear de 5,26 - 52,63 % de B em 30 minutos, com vazão de 0,6 mL min⁻¹ e 35°C de temperatura do forno da coluna. Antes de cada experimento, a coluna foi equilibrada com a porcentagem inicial de B do gradiente linear seguinte. Após cada corrida cromatográfica realizada neste trabalho, as colunas analíticas foram lavadas com um mínimo de 6 mL de B para que as corridas subsequentes não fossem afetadas por compostos menos polares eventualmente retidos na fase estacionária. Para posterior comparação em termos de separação e impacto ambiental, reproduziu-se com precisão em nosso laboratório o trabalho de

Assunção et al. (2017), um método reportado anteriormente na literatura para *fingerprinting* metabólico das folhas de *E. uniflora* e usado como trabalho de referência. Esse experimento em específico foi realizado a 25°C (temperatura ambiente, uma vez que a temperatura do forno da coluna no trabalho original não foi relatada) e usando uma coluna analítica C₁₈ apropriada (Synergi Hydro-RP, 250 x 4,6 mm; 4 µm, Phenomenex, EUA).

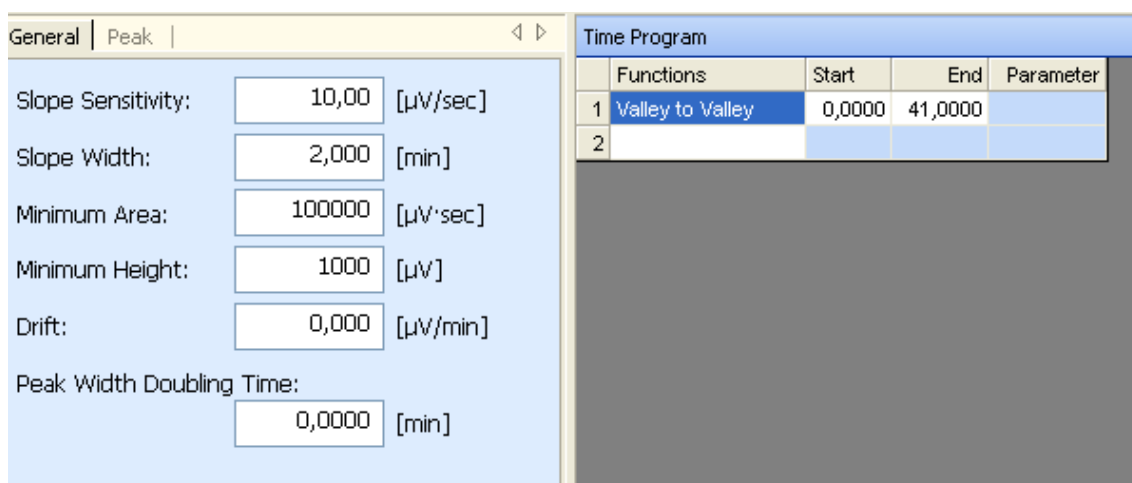


Figura 4: Método de integração de picos cromatográficos no software Chromnav (Jasco, Japão)

1.3.5 Triagem e otimização: Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)

Inicialmente, experimentos preliminares foram realizados para verificar a viabilidade do emprego de EtOH grau alimentício como componente do sistema solvente na fase móvel (em comparação com solventes de maior pureza, como EtOH HPLC) e para estabelecer os níveis de planejamentos experimentais subsequentes com base nos tempos de retenção do primeiro e último picos eluídos. Em seguida, a primeira etapa da investigação foi avaliar a relevância estatística de cinco variáveis cromatográficas por meio de um Planejamento Fatorial Fracionário $2v^{5-1}$, as quais são X_1 (Porcentagem inicial de EtOH 95° GL), X_2 (porcentagem final da EtOH 95° GL), X_3 (Temperatura, °C), X_4 (porcentagem de AcOH em A, v/v) e X_5 (vazão da fase móvel, mL min⁻¹) Após isso, os fatores importantes foram estudados com mais precisão (com níveis mais experimentais) por meio de um Planejamento Composto Central de Três Fatores (CCD), com o objetivo de estimar modelos de regressão que descrevessem

matematicamente as respostas investigadas em função das variáveis cromatográficas relevantes e, juntamente com uma superfície de resposta, possibilitassem encontrar uma condição empírica ideal (BARROS NETO, SCARMÍNIO, BRUNS, 2010; MYERS, MONTGOMERY, COOK, 2016; MONTGOMERY, 2017; PEREIRA-FILHO, 2015).

O Planejamento Composto Central, por meio do método dos mínimos quadrados, permitiu inicialmente ajustar os dados a uma equação polinomial de segunda ordem, representada pela Eq. 1:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n b_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

onde Y é a resposta prevista, b_0 é o intercepto, b_i é um coeficiente linear, b_{ii} é um coeficiente quadrático, b_{ij} é um coeficiente de interação e X_i e X_j estão relacionadas às variáveis independentes avaliadas e seus valores codificados (BARROS NETO, SCARMÍNIO, BRUNS, 2010; MYERS, MONTGOMERY, COOK, 2016; MONTGOMERY, 2017; PEREIRA-FILHO, 2015).

Após essa etapa, os termos não significativos foram eliminados e o modelo polinomial foi recalculado. Os experimentos foram conduzidos aleatoriamente visando evitar a inserção de erros sistemáticos nos resultados que tangem à otimização.

Duas respostas que se encaixam nos objetivos ambientalmente amigáveis do trabalho foram estudadas. A primeira é a *Green Chromatographic Fingerprinting Response* (GCFR; FUNARI et al., 2014a) empregada com modificações, sendo denominada neste trabalho apenas como *Green Chromatographic Fingerprinting* (GCF, Eq. 2):

$$GCF = n^2(FP/MP)(n/t_r l) \quad (2)$$

Onde o termo n é a quantidade total de picos do cromatograma, e t_r/l , neste trabalho, é o tempo de retenção do último pico cromatográfico eluído - ao invés do tempo total da análise (t), conforme empregado na versão original da resposta (FUNARI et al., 2014a). FP e MP são o número de picos nas metades

do cromatograma com menos e mais picos, respectivamente (descontando o tempo morto t_0 e considerando o comprimento do cromatograma de t_0 a t_f), e sua proporção indica o quão uniforme é a distribuição dos picos ao longo do cromatograma. Quanto maior o *score* GCF, maior a otimização cromatográfica global (de modo análogo à resposta original GCFR), em termos de qualidade de separação (FUNARI et al., 2014a). Apenas os picos de interesse (polaridade alta e média) detectados até 30 min foram considerados para o cálculo dos *scores* de GCF.

O impacto ambiental dos experimentos individuais foi avaliado pela métrica *HPLC-Environmental Assessment Tool* (GABER et al., 2011, HPLC-EAT, Eq. 3), o melhor indicador disponível na literatura para medir com precisão o impacto dos métodos em CLAE considerando que o mesmo possibilita uma comparação robusta entre vários métodos cromatográficos. Tal métrica foi empregada para (1) quantificar o impacto ambiental global promovido pelas corridas cromatográficas realizadas no Planejamento Fatorial Fracionário e Planejamento Composto Central visando ranqueá-los em termos de sustentabilidade e (2) quantificar o impacto do método desenvolvido, em comparação com um método de referência também com fins de impressão digital cromatográfica.

$$HPLC - EAT = S_1m_1 + H_1m_1 + E_1m_1 + S_2m_2 + H_2m_2 + E_2m_2 + \dots + S_nm_n + H_nm_n + H_nm_n \quad (3)$$

Os termos *S*, *H* e *E* são parâmetros de segurança, saúde e meio ambiente, respectivamente, baseados em informações sobre os produtos químicos empregados nos experimentos oriundos de bancos de dados específicos. Tais termos são multiplicados pela massa *m* de cada um dos *n* solventes utilizados numa dada análise cromatográfica. Quanto menor for a pontuação HPLC-EAT, menor será o impacto ambiental do método cromatográfico. Neste trabalho, o *score* calculado considerou o condicionamento das colunas antes de cada gradiente, realizado empregando-se no modo isocrático a porcentagem inicial de solvente orgânico empregado no gradiente seguinte. Informações detalhadas sobre essas métricas são fornecidas por seus autores (GABER et al., 2011).

Inicialmente, para a escolha da melhor coluna analítica em termos de separação e seletividade, realizou-se um Planejamento Fatorial Fracionário. Nesta etapa, apenas a resposta GCF foi considerada para comparações entre o desempenho cromatográfico das colunas testadas, uma vez que os *scores* HPLC-EAT eram idênticos para ambas as colunas XBridge e XSelect (visto que os mesmos experimentos foram realizadas para ambas, em condições exatamente iguais). Depois de escolher a melhor coluna, considerando que o *score* HPLC-EAT em si não permite medir a separação cromatográfica e, de modo similar, GCF isoladamente não permite quantificar parâmetros de segurança, de saúde e de impacto ambiental, para análise simultânea e otimização de ambas as respostas foram empregadas funções de desejabilidade (DERRINGER e SUICH, 1980) para determinar inicialmente as variáveis importantes na etapa de triagem e para otimizar o *fingerprinting* metabólico com um Planejamento Composto Central.

A partir de tal abordagem, valores de desejabilidade individuais (d_i) para cada uma das duas respostas estudadas apresentam valores entre 0 e 1, o que sugere condições de trabalho totalmente indesejáveis e desejáveis, respectivamente. Os valores de desejabilidade individuais para GCF (para o qual é importante obter pontuações altas) foram estimados com a Eq. 4 (DERRINGER e SUICH, 1980; PEREIRA-FILHO, 2015; NUNES et al., 2019):

$$d_{(GCF)} = \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^S \text{ se } L \leq y \leq T \quad (4)$$

Onde $d_{(GCF)}$ é a desejabilidade individual para a resposta GCF, y é o valor da resposta, T é o valor alvo para GCF (ou, em nosso caso, o maior valor obtido em cada *design* experimental individual) e L é o menor valor aceitável (ou, no nosso caso, o menor valor obtido em cada *design* experimental; DERRINGER e SUICH, 1980; PEREIRA-FILHO, 2015; NUNES et al., 2019).

Os valores de desejabilidade individuais para a resposta de HPLC-EAT (para os quais é importante obter as pontuações mais baixas possíveis) foram calculados com a Eq. 5 (DERRINGER e SUICH, 1980; PEREIRA-FILHO, 2015; NUNES et al., 2019):

$$d_{(HPLC-EAT)} = \left(\frac{U-y}{U-T} \right)^s \text{ se } T \leq y \leq U \quad (5)$$

Onde $d_{(HPLC-EAT)}$ é a desejabilidade individual para a resposta HPLC-EAT, y é o valor da resposta, U é o valor mais alto aceitável para HPLC-EAT (ou, em nosso caso, o valor mais alto obtido em cada *design* experimental individual) e T é o valor alvo (ou, no nosso caso, o menor valor obtido em cada planejamento experimental; DERRINGER e SUICH, 1980; PEREIRA-FILHO, 2015; NUNES et al., 2019).

O coeficiente s nas Eqs. 4 e 5 permite controlar e ajustar subjetivamente a taxa de variação da função e foi estabelecido como 1 para ambas as respostas destinadas a ajustar e otimizar o método de impressão digital, considerando igualmente importantes a separação e a sustentabilidade.

Os valores de desejabilidade individual para ambas as respostas foram combinados em um valor de desejabilidade global (D) por meio da média geométrica de ambos os valores de desejabilidade individuais GCF e HPLC-EAT para cada experimento, de acordo com a Eq. 6 (DERRINGER e SUICH, 1980; PEREIRA-FILHO, 2015; NUNES et al., 2019):

$$D = \sqrt{d_{(GCF)} d_{(HPLC-EAT)}} \quad (6)$$

D assume o valor zero se qualquer valor de desejabilidade individual assumir um valor inaceitável (DERRINGER e SUICH, 1980; PEREIRA-FILHO, 2015; NUNES et al., 2019).

A determinação das variáveis significativas e do modelo empírico que descreve o domínio experimental estimado com o planejamento CCD em função de D em cada *design* experimental foi realizada no nível de confiança de 95% .

Cálculos de análise de variância (ANOVA), probabilidade normal e gráficos de superfície de resposta foram realizados através dos softwares GNU Octave 4.2.1, Statistica 7 (Stat-Ease, Inc, EUA) e Excel 2013 (Microsoft, EUA).

1.3.6 Validação do método otimizado

O método cromatográfico desenvolvido para as folhas de pitanga foi validado qualitativamente de acordo com as recomendações do *International Conference for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005). Esta etapa foi realizada ao se estimar os parâmetros de precisão instrumental, repetibilidade e precisão intermediária por meio do desvio padrão relativo (DPR) para os mesmos em relação aos tempos de retenção relativos de picos superiores a 4% da área total do pico em todas as corridas cromatográficas (SOUZA et al., 2018; FUNARI et al., 2014a) em relação a um pico de referência com a maior intensidade no cromatograma (destacado com um asterisco, Fig. 10a).

Além disso, a robustez do método cromatográfico também foi avaliada por meio de um Planejamento Fatorial Completo 2^3 com 4 pontos centrais. As variáveis testadas foram A (vazão, no intervalo de 0,59-0,61 mL min⁻¹), B (Temperatura, no intervalo de 33-37°C) e C (% AcOH em H₂O, no intervalo de 0,8-1,2%, v/v). Os nomes das variáveis foram alterados em relação a outros planejamentos empregados para otimização cromatográfica uma vez que as mesmas foram estudadas em intervalos diferentes neste caso. As respostas avaliadas também foram os tempos de retenção relativos dos picos cromatográficos superiores a 4% da área total do pico em em todos os experimentos realizados (no caso, picos 1, 2, 3, 5 e 7) em relação ao pico de referência 6, destacado com asterisco na Fig. 10a . No caso de nenhuma variável ser significativa (ou seja, as pequenas alterações não mostram influência nas respostas escolhidas), o método cromatográfico é considerado robusto (FERREIRA et al., 2017; CHRIST et al., 2014). Todas as corridas cromatográficas nesta etapa também foram realizadas em ordem aleatória. Os cálculos foram realizados a 95% de confiança.

1.3.7 Avaliação do impacto ambiental: AGREE

Como alternativa à métrica HPLC-EAT, utilizou-se a métrica *AGREE (Analytical GREEnEss Metric*, PENA-PEREIRA, WOJNOWSKI, TOBISZEWSKI, 2020) para se quantificar o impacto ambiental do método desenvolvido e para estabelecer

comparações com o método de referência de Assunção et al. (2017). A métrica foi selecionada porque representa o estado-da-arte na literatura e possibilita uma avaliação flexível, rápida, de fácil interpretação porém holística do impacto ambiental de processos. O critério de avaliação se baseia em critérios quantitativos baseados nos 12 princípios da Química Analítica Verde (para os quais podem ser atribuídos pesos pelo analista), os quais são transformados em uma escala que varia de 0 a 1. O resultado final é apresentado na forma de pictograma por um *software* livre disponibilizado no material suplementar da referência original. O pictograma indica um *score* final, a performance do processo em cada um dos critérios avaliados e eventuais pesos atribuídos pelo usuário (PENA-PEREIRA, WOJNOWSKI, TOBISZEWSKI, 2020).

1.3.8 Análises subsequentes por CLUE-DAD-MS

As análises foram realizadas em um Cromatógrafo Líquido de Ultra-Alta Eficiência (Shimadzu Nexera UC, Kyoto, Japão), composto por um controlador (CBM 20-A), um degaseificador (DGU-20A), uma bomba ternária (Nexera X2 LC -30AD), um autoinjeter (Nexera X2 SIL-30AC), um compartimento termoestável para coluna (CTO-20AC), um detector por arranjo de fotodiodos (SPD-M20A); quadrupolo '*single*' com interface ESI (LC2020). O método em CLAE da subseção 1.3.4 foi transposto para CLUE-DAD-MS com o auxílio do *software* livre HPLC calculator v. 3.0 (GUILLARME, et al., 2008). As separações foram realizadas com uma coluna do tipo fenil-hexil de dimensões 150 x 2,10 mm, 1,7 μm (Acquity UPLC CSH, Waters, EUA). A vazão do sistema foi de 0,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a temperatura do forno foi mantida em 35 $^{\circ}\text{C}$ (um aquecedor de pré-coluna de 0,10 mm de d.i. e 1 mL foi usado (Thermo Fisher, EUA) e o volume de injeção foi de 1 μL . A coluna foi equilibrada com 5 mL. As separações foram monitoradas a $\lambda = 270 \text{ nm}$. Os espectros de massas foram obtidos durante a análise.

Os espectros de massas foram obtidos nos modos de ionização positivo e negativo. As condições do espectrômetro de massa foram: fluxo de gás de nebulização, 1,5 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; fluxo de gás de secagem, 15 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; *heat block temperature*, 400 $^{\circ}\text{C}$ e *dissolution line temperature*, 250 $^{\circ}\text{C}$. A voltagem do detector foi de 0,1 kV. O equipamento foi operado no intervalo de 100 a 1000 *m/z* (*full-scan*).

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1 Planejamento Fatorial Fracionário 2_v^{5-1} : Escolha da melhor coluna cromatográfica e seleção das variáveis significativas

Inicialmente, empregou-se um Planejamento Fatorial Fracionário com condições cromatográficas idênticas para cada uma das duas fases estacionárias sob comparação, i.e., XBridge (fase ligada polimérica) e XSelect (fase ligada fenil-hexil), ambas com as mesmas dimensões. Esse tipo de planejamento experimental foi selecionado considerando que o mesmo possibilita a triagem de variáveis com um número reduzido de experimentos em comparação com o Planejamento Fatorial Completo (MONTGOMERY, 2017), o que permite a economia de energia, tempo e reagentes e, portanto, exerce coerência com os princípios 7, 8 e 9 da Química Analítica Verde (GAŁUSZKA, MIGASZEWSKI, NAMIEŚNIK, 2013). Cromatogramas representativos dos experimentos realizados no Planejamento Fatorial Fracionário são apresentados na Fig. 5.

De acordo com a Fig. 5, a coluna XSelect apresentou uma melhor performance de separação em quase todos os experimentos realizados (com exceção dos experimentos 3 e 14, vide Tab. 1 e Fig. 5) de acordo com os *scores* apresentados para a resposta GCF. Isso ocorreu porque provavelmente as unidades fenil-hexil presentes na coluna XSelect exerceram interações do tipo π - π com os anéis aromáticos dos metabólitos secundários (majoritariamente identificados como taninos hidrolisáveis e flavonoides, além dos marcadores ácido elágico e gálico, vide Seção 1.4.4), o que viabilizou retenções e/ou separações mais efetivas em relação à coluna XBridge, uma coluna de fase ligada polimérica. Dessa forma, a coluna XSelect foi selecionada para desenvolvimento e otimização do método cromatográfico para impressão digital metabólica das folhas de pitanga.

Tabela 1: Valores codificados (e reais) das variáveis estudadas seguidas pelas respectivas respostas no Planejamento Fatorial Fracionário 2_v⁵⁻¹

Exp.	Fatores cromatográficos (variáveis independentes)					Fases estacionárias					
	X ₁ ^a	X ₂ ^a	X ₃ ^a	X ₄ ^a	X ₅ ^{a,b}	XSelect (fenil-hexil)			XBridge (polimérica)		
						GCF ^c	HPLC-EAT ^d		D ^e	GCF ^c	
							Eq.	Gr.			Total
1	-1 (5,26%)	-1 (52,63%)	-1 (35°C)	-1 (0%)	+1 (1,0)	113,06	2,51	16,59	19,10	0,60	46,29
2	+1 (21,05%)	-1 (52,63%)	-1 (35°C)	-1 (0%)	-1 (0,6)	82,48	10,05	12,67	22,72	0,46	17,56
3	-1 (5,26%)	+1 (100%)	-1 (35°C)	-1 (0%)	-1 (0,6)	97,72	2,51	18,09	20,61	0,53	165,29
4	+1 (21,05%)	+1 (100%)	-1 (35°C)	-1 (0%)	+1 (1,0)	154,69	10,05	34,68	44,73	0,00	15,52
5	-1 (5,26%)	-1 (52,63%)	+1 (80°C)	-1 (0%)	-1 (0,6)	101,35	2,51	9,95	12,46	0,63	9,59
6	+1 (21,05%)	-1 (52,63%)	+1 (80°C)	-1 (0%)	+1 (1,0)	30,68	10,05	21,11	31,16	0,19	16,67
7	-1 (5,26%)	+1 (100%)	+1 (80°C)	-1 (0%)	+1 (1,0)	109,33	2,51	30,16	32,67	0,40	7,19
8	+1 (21,05%)	+1 (100%)	+1 (80°C)	-1 (0%)	-1 (0,6)	23,82	10,05	20,81	30,86	0,16	11,24
9	-1 (5,26%)	-1 (52,63%)	-1 (35°C)	+1 (1%)	-1 (0,6)	239,84	2,51	9,95	12,46	1,00	85,68
10	+1(21.05%)	-1 (52.63%)	-1 (35°C)	+1 (1%)	+1 (1,0)	58,96	10,05	21,11	31,16	0,30	8,96
11	-1 (5.26%)	+1 (100%)	-1 (35°C)	+1 (1%)	+1 (1,0)	158,35	2,51	30,16	32,67	0,49	94,70
12	+1(21.05%)	+1 (100%)	-1 (35°C)	+1 (1%)	-1 (0,6)	92,11	10,05	20,81	30,86	0,39	4,95
13	-1 (5,26%)	-1 (52,63%)	+1 (80°C)	+1 (1%)	+1 (1,0)	42,10	2,51	16,59	19,10	0,33	0,00
14	+1 (21,05%)	-1 (52,63%)	+1 (80°C)	+1 (1%)	-1 (0,6)	10,93	10,05	12,67	22,72	0,00	12,13
15	-1 (5,26%)	+1 (100%)	+1 (80°C)	+1 (1%)	-1 (0,6)	38,64	2,51	18,09	20,61	0,30	13,73
16	+1 (21,05%)	+1 (100%)	+1 (80°C)	+1 (1%)	+1 (1,0)	29,94	10,05	34,68	44,73	0,00	2,24
PC ^f	0 (13,16%)	0 (76,32%)	0 (57,5°C)	0 (0,5%)	0 (0,8)	84,12 ± 36,16	6,28	20,51	26,79	0,41 ±0,10	4,44 ±0,65

^a X₁ (% inicial de B); X₂ (% final de B); X₃ (Temperatura, °C); X₄ (% AcOH em A, v/v); X₅ (Vazão, mL min⁻¹).^b 5=1234.

^c *Green Chromatographic Fingerprinting* (GCF), uma versão otimizada da função *Green Chromatographic Fingerprinting Response* (GCFR, Funari et al., 2014a), empregada com modificações. ^d Scores foram calculadas considerando o equilíbrio das colunas empregando eluição isocrática com 10 volumes (no caso, 25 min de corrida na qual X₁ do gradiente seguinte corresponde à porcentagem de B, e vazão de 1 mL min⁻¹), como recomendado pelos fabricantes (score do equilíbrio, eq.), e gradientes lineares com tempo de 30 minutos (score do gradiente, gr.). Score total correspondente à soma dos scores do gradiente e do equilíbrio. Massa do EtOH calculada considerando a massa específica (ρ) a 25° C (0,785 g cm⁻³; LIDE,2006) e com valores ajustados (valores reais de multiplicados pelo fator de correção de 0,95 visto que B possui pureza 95° GL)

^e Desejabilidade global envolvendo os valores de desejabilidade individuais (baseados nos maiores e menores valores do *design* experimental) para GCF e so score (total) de HPLC-EAT para a coluna Xselect. ^f Pontos centrais. Resultados apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

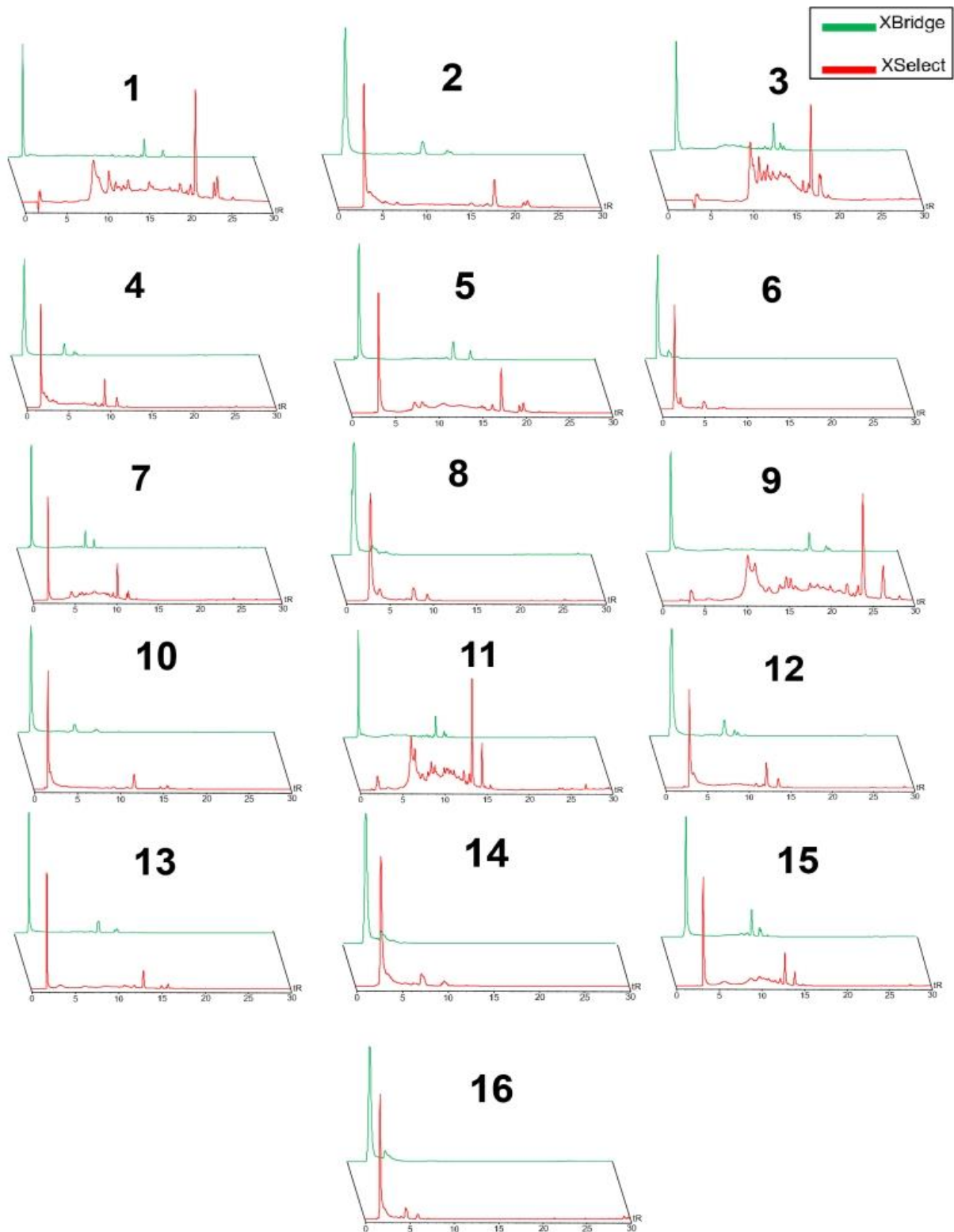


Figura 5: Experimentos realizados no Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-1} para as colunas XBridge (cromatogramas em verde) e XSelect (cromatogramas em vermelho). Pontos centrais não foram representados; realizados apenas para mensuração do erro

As variáveis mais estatisticamente significativas no que se refere à desejabilidade global envolvendo os scores para GCF e HPLC-EAT foram X_1 , X_2 e X_3 a 95% de confiança e conforme indicado em um gráfico de probabilidade normal (Fig. 6). Embora uma interação entre X_3 e X_4 tenha sido significativa de acordo com resultados da Análise de Variância (ANOVA), o contraste principal relativo à X_4 não apresentou relevância; portanto, tal interação não foi indicada na Figura 6. X_5 também não foi significativa; apesar de próxima de ser relevante, tal contraste pode assumir o valor zero considerando seu intervalo de confiança. Portanto, os fatores X_4 e X_5 , não significativos, foram fixados nos níveis -1, i.e., 0% de ácido acético (AcOH) em A (v/v) and $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ de vazão, respectivamente (fixadas nos menores valores experimentais uma vez que ambas as variáveis supracitadas apresentaram contrastes negativos). Essa escolha reduz o gasto de reagentes e aplica o princípio 7 da Química Analítica Verde (GAŁUSZKA, MIGASZEWSKI, NAMIEŚNIK, 2013).

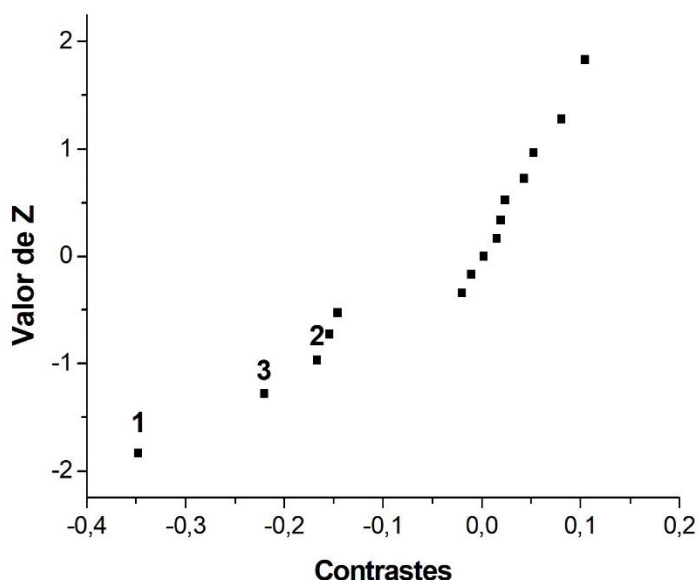


Figura 6: Gráfico probabilidade normal com contrastes (principais) significativos representados

Um modelo polinomial preliminar foi estimado com os termos significativos elucidados a partir do Planejamento Fatorial Fracionário, e cálculos na ANOVA indicaram que o modelo possui um R^2 (coeficiente de determinação) de 0,81. No entanto, esse tipo de planejamento apresenta um número reduzido de níveis experimentais e não torna possível a estimativa da eventual curvatura (quadrática) na

superfície de resposta obtida para tal modelo. Assim, o planejamento utilizado foi uma etapa inicial da investigação, empregada apenas para escolha da melhor coluna e identificação das variáveis significativas.

1.4.2 Otimização: Planejamento Composto Central (CCD)

Após a identificação das variáveis mais significativas, um Planejamento Composto Central (Tab. 2) foi empregada para otimização global das condições cromatográficas. A partir dos experimentos do CCD, foi possível estimar modelos matemáticos que correlacionaram as variáveis independentes com a função de desejabilidade global (D) envolvendo os scores para GCF e HPLC-EAT (total). Inicialmente, um modelo preliminar considerando todos os termos possíveis de serem calculados foi estimado, a 95% de confiança. Após tal etapa, considerando que apenas os coeficientes b_0 (intercepto), b_1 , b_2 e b_3 (coeficientes lineares) foram significativos, o modelo foi recalculado com a eliminação dos termos não relevantes, e o modelo resultante, a 95% de confiança (e envolvendo os valores para D sem aproximação das casas decimais) está representado pela Eq. 7. Cromatogramas representativos das condições cromatográficas exploradas no Planejamento Composto Central estão indicadas nas figuras 7 e 8.

$$D = 0.397_{(\pm 0.073)} - 0.223_{(\pm 0.086)}X_1 - 0.182_{(\pm 0.086)}X_2 - 0.101_{(\pm 0.086)}X_3 \quad (7)$$

De acordo com a Análise de Variância (ANOVA, Tab. 3) O modelo recalculado apresenta um R^2 (coeficiente de determinação) de 0,79. Além disso, Testes F indicaram que a regressão é significativa, considerando que o valor de F experimental (MQ_R/MQ_r) de 18,95 é quase 6 vezes maior que o valor de F tabelado ($F_{3,15,95\%}$), correspondente a 3,29. O modelo não apresentou falta de ajuste uma vez que o valor de F calculado (MQ_{FAj}/MQ_{Ep}) de 4,99 é menor que o valor de F tabelado ($F_{11,4,95\%}$) de 5,94. Isso sugere que o modelo pode ser empregado para realizar previsões da condição ótima.

Tabela 2: Valores codificados (e reais) das variáveis estudadas seguidas pelas respectivas respostas no Planejamento Composto Central (CCD)

Exp.	Fatores cromatográficos (variáveis independentes)				Respostas			
	X ₁ ^a	X ₂ ^a	X ₃ ^{a,b}	GCF ^c	HPLC-EAT ^d			D ^e
					Equilíbrio	Gradiente	Total	
1	-1 (8,46%)	-1 (62,23%)	-1 (42,09°C)	101,39	4,04	12,15	16,19	0,97
2	+1 (17,85%)	-1 (62,23%)	-1 (42,09°C)	51,76	8,52	13,76	22,29	0,44
3	-1 (8,46%)	+1 (90,40%)	-1 (42,09°C)	57,89	4,04	16,99	21,03	0,53
4	+1 (17,85%)	+1 (90,40%)	-1 (42,09°C)	84,14	8,52	18,61	27,13	0,00
5	-1 (8,46%)	-1 (62,23%)	+1 (62,91°C)	106,30	4,04	12,15	16,19	1,00
6	+1 (17,85%)	-1 (62,23%)	+1 (62,91°C)	9,76	8,52	13,76	22,29	0,07
7	-1 (8,46%)	+1 (90,40%)	+1 (62,91°C)	25,50	4,04	16,99	21,03	0,31
8	+1 (17,85%)	+1 (90,40%)	+1 (62,91°C)	21,63	8,52	18,61	27,13	0,00
9	-α ^f (5,26%)	0 (76,32%)	0 (52,5°C)	27,97	2,51	14,02	16,54	0,44
10	+α ^f (21,05%)	0 (76,32%)	0 (52,5°C)	8,80	10,05	16,74	26,79	0,00
11	0(13,16%)	-α ^f (52,63%)	0 (52,5°C)	56,93	6,28	11,31	17,59	0,66
12	0(13,16%)	+α ^f (100%)	0 (52,5°C)	27,25	6,28	19,45	25,73	0,16
13	0(13,16%)	0 (76,32%)	-α ^f (35°C)	72,56	6,28	15,38	21,66	0,57
14	0(13,16%)	0 (76,32%)	+α ^f (70°C)	10,28	6,28	15,38	21,66	0,09
PC ^f	0 (13,16%)	0 (76,32%)	0 (52,5°C)	51,34 ± 14,00	6,28	15,38	21,66	0,46±0,08

^a X₁ (% inicial de B); X₂ (% final de B); X₃ (Temperatura, °C). ^b Nível máximo estudado para X₃ reduzido para 70° C (vide experimento 14) em relação ao Planejamento Fatorial Fracionário (Tab.1) ^c *Green Chromatographic Fingerprinting* (GCF), uma versão otimizada da função *Green Chromatographic Fingerprinting Response* (GCFR, Funari et al., 2014a), empregada com modificações. ^d Scores foram calculadas considerando o equilíbrio das colunas empregando eluição isocrática com 10 volumes (no caso, 25 min de corrida na qual X₁ do gradiente seguinte corresponde à porcentagem de B, e vazão de 1 mL min⁻¹), como recomendado pelos fabricantes (score do equilíbrio, eq.), e gradientes lineares com tempo de 30 minutos (score do gradiente, gr.). Score total correspondente à soma dos scores do gradiente e do equilíbrio. Massa do EtOH calculada considerando a massa específica (ρ) a 25° C (0,785 g cm⁻³; LIDE, 2006) e com valores ajustados (valores reais de multiplicados pelo fator de correção de 0,95 visto que B possui pureza 95° GL)

^e Desejabilidade global envolvendo os valores de desejabilidade individuais (baseados nos maiores e menores valores do *design* experimental) para GCF e so score (total) de HPLC-EAT para a coluna Xselect. ^f Pontos centrais. Resultados apresentados como média ± desvio padrão (n=5).

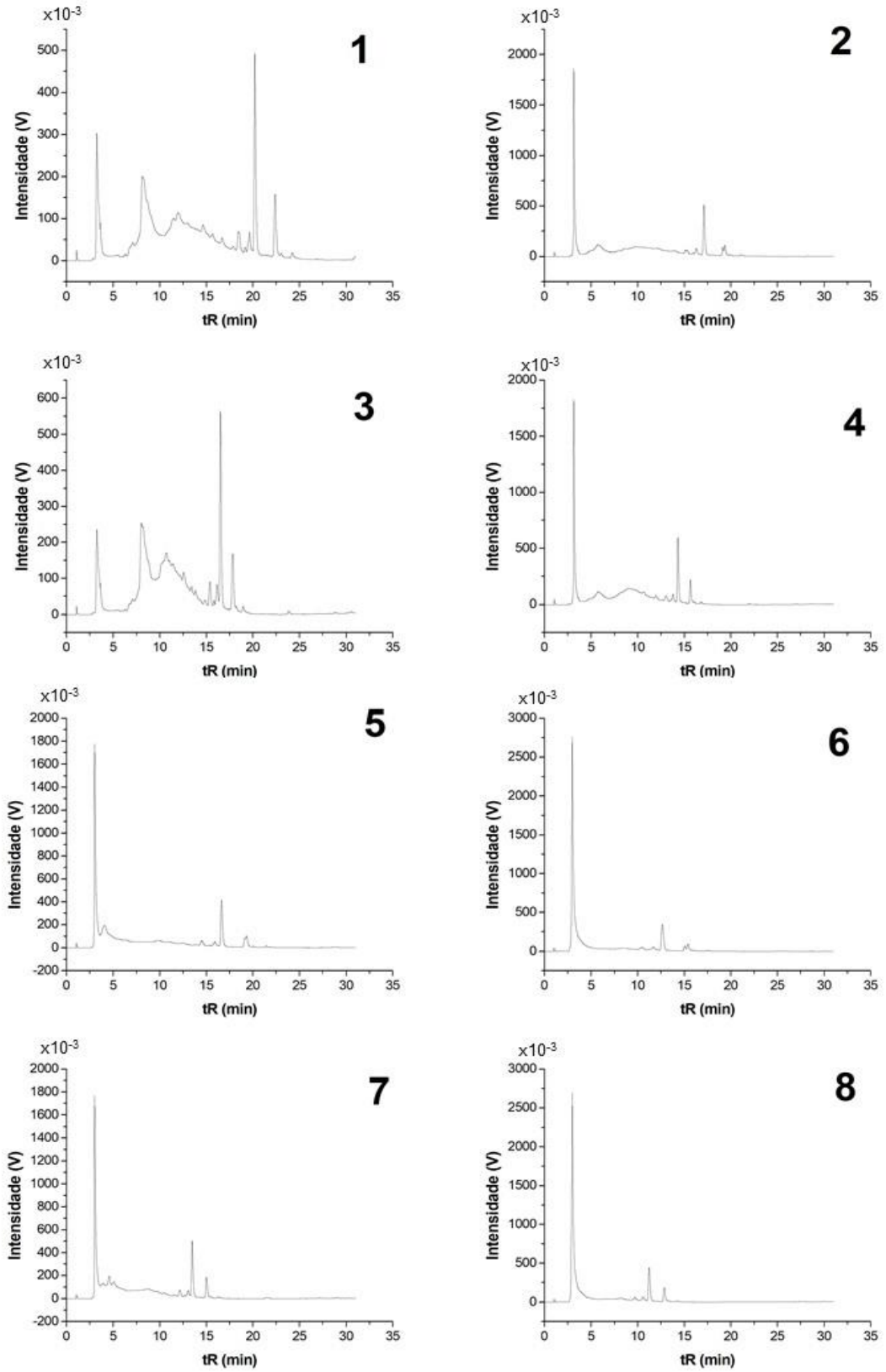


Figura 7: Cromatogramas dos experimentos 1 a 8 do Planejamento Composto Central (CCD)

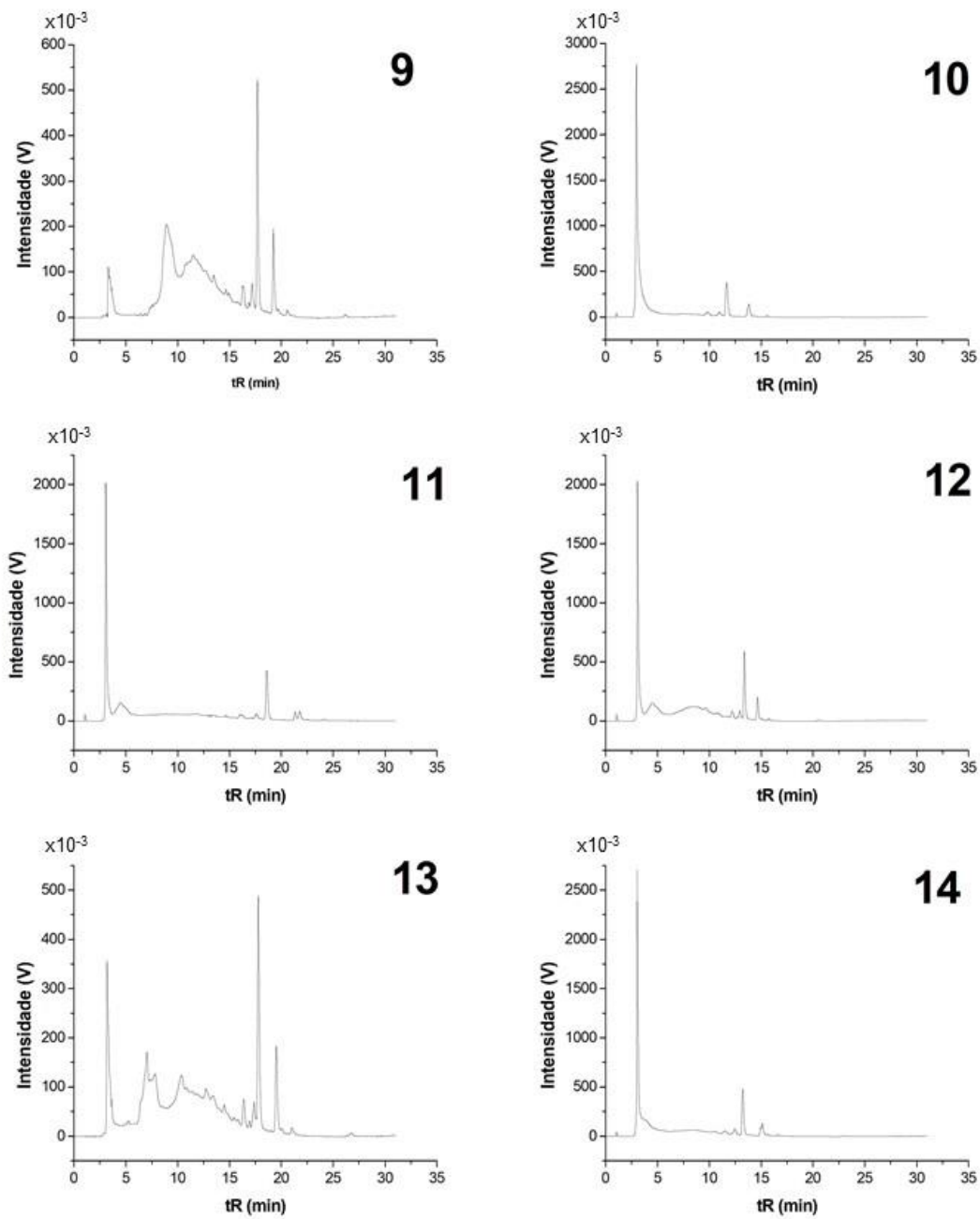


Figura 8: Cromatogramas dos experimentos 9 a 14 do Planejamento Composto Central (CCD). Pontos centrais otimizados; realizados apenas para o cálculo dos erros

Tabela 3: Análise de Variância (ANOVA) para o modelo estimado (Eq. 7) através do Planejamento Composto Central (CCD) correlacionando os termos significativos com a Desejabilidade Global (D)

Tabela ANOVA				Testes F (95% de confiança)	
Fonte de variação		GL	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}
SQR	1,27	3	0,42	18,95	3,29
SQr	0,33	15	0,02		
SQT	1,60	18			
R ²	0,79				
EP	0,02	4	0,01	4,99	5,94
FAj	0,31	11	0,03		

SQR, Soma Quadrática de Regressão; SQr, Soma Quadrática dos Resíduos; SQT, Soma Quadrática Total; R², Coeficiente de Determinação; EP, Erro Puro; FAj, Falta de Ajuste; GL, Graus de Liberdade; MQ, Média Quadrática (com resultado aproximados com duas casas decimais)

Superfícies de resposta foram plotadas a partir do modelo estimado e estão indicadas na Fig.9a-c. Os gráficos e a Equação 7 previram uma condição cromatográfica otimizada com X_1 , X_2 e X_3 nos menores níveis experimentais (ou, considerando os experimentos originais do CCD, o valor codificado de -1,68179 para essas variáveis, o que corresponde aos valores reais de 5,26% B para X_1 , 52,63% para X_2 e 35°C para X_3). Essa condição teoricamente forneceria o valor de 1,25 para o ótimo global da desejabilidade (D), obtido pela substituição do respectivo valor codificado para cada variável ou termo relevante no modelo recalculado (Eq. 7).

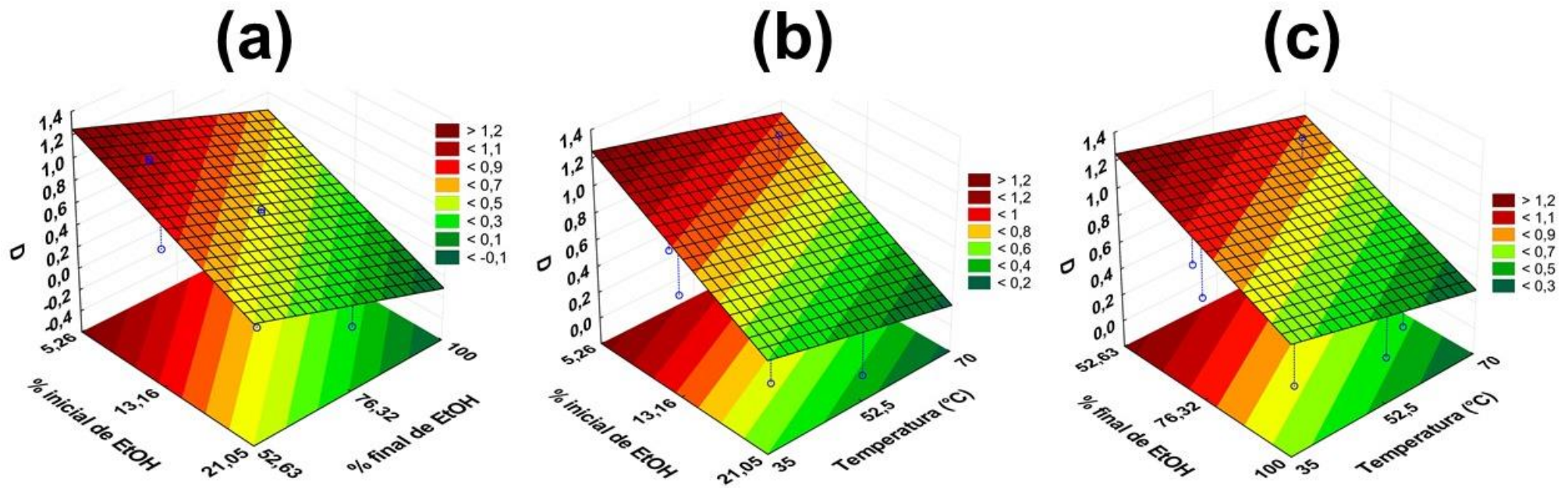


Figura 9: Superfícies de resposta para o modelo multivariado (Eq. 7) estimado pelo Planejamento Composto Central (CCD). **(a)** Desejabilidade Global (D) versus % inicial de EtOH (X_1), % final de EtOH (X_2), variável fixada: Temperatura (X_3 , °C, -1,68179 ou 35°C); **(b)** Desejabilidade Global (D) versus % inicial de EtOH (X_1), Temperatura (X_3 , °C), variável fixada: % final de EtOH (X_2 , -1,68179 ou 52,63%); **(c)** Desejabilidade Global (D) versus % final de EtOH (X_2), Temperatura (X_3 , °C), variável fixada: % inicial de EtOH (X_1 , -1,68179 ou 5,26%)

Essa condição cromatográfica (5,26-52,63% B em 30 min, a 35°C, 0% AcOH em A (v/v) e 0,6 mL min⁻¹) inicialmente foi testada. Porém, notou-se que a ausência de ácido acético na fase móvel reduziu a resolução dos picos. Então, uma vez que a variável X_4 não foi significativa (no que se refere ao contraste principal, de primeira ordem), foi empregado um método empírico, de modo que a condição ótima supracitada foi testada porém com 1% AcOH na fase móvel (no caso, A, v/v). Ainda que esta decisão seja adequada do ponto de vista analítico mas não seja a ideal do ponto de vista da Química Analítica Verde, as resoluções dos picos melhoraram sob um aspecto geral e foram consideradas satisfatórias para obtenção dos espectros UV, um importante parâmetro para o trabalho. Após testar-se tal condição, foi obtido o valor de 2.08 ± 0.14 para D (média \pm desvio padrão, n=5). Esse valor é bem maior do que o ótimo previsto, provavelmente devido ao ácido na fase móvel, que deslocou o equilíbrio de ionização de compostos de caráter ácido, melhorando a resolução, separação e, por conseqüência os valores de GCF para as análises cromatográficas. Também, é importante destacar que os experimentos no CCD foram realizados sem ácido na fase móvel, o que influencia na elevada diferença entre o valor predito e o experimental para o método empírico. O valor médio experimental também ultrapassou todos os valores para D no que tange aos experimentos originais do Planejamento Composto Central, o que prova a eficiência da otimização. A pressão do sistema HPLC não excedeu 14,5 MPa quando tal condição foi testada. Um cromatograma representativo de tal condição está indicado na Fig. 10a.

Considerando aspectos ambientais, o Planejamento Composto Central foi escolhido em relação a outros planejamentos uma vez que ele requer um menor número de experimentos em relação ao planejamento 3³ e pode fornecer resultados comparáveis ao mesmo (MONTGOMERY, 2017), o que é coerente com os propósitos sustentáveis do trabalho e com os princípios 7,8 e 9 da Química Analítica Verde (GAŁUSZKA, MIGASZEWSKI, NAMIEŚNIK, 2013). Também, as respostas GCF e HPLC-EAT (simultaneamente otimizadas através da desejabilidade global) abrangem simultaneamente aspectos multiparamétricos, analíticos e sustentáveis e, portanto, concordam com os mesmos princípios. No que tange aos reagentes utilizados, a escolha do bioetanol derivado da biomassa e do ácido acético na fase móvel ao invés dos frequentemente empregados porém tóxicos acetonitrila (MeCN), metanol (MeOH) ou ácido trifluoroacético (TFA) está em concordância com os princípios 10,11 e 12 da Química Analítica Verde (GAŁUSZKA, MIGASZEWSKI, NAMIEŚNIK, 2013).

O fato de o modelo empírico estimado e as superfícies de resposta terem revelado que o *fingerprinting* cromatográfico mais satisfatório seria obtido quando as porcentagens inicial e final de EtOH (X_1 e X_2 , respectivamente) bem como a temperatura (X_3) fossem estabelecidas nos menores níveis experimentais estudados também apresentou um impacto positivo, possibilitando a aplicação dos princípios 7 e 9 da GAC. Valores menores para X_1 , X_2 e X_3 conduziram a dois efeitos desejáveis – um aumento nos scores GCF e uma redução nos valores de HPLC-EAT devido ao menor consumo de solvente orgânico, o que leva a um aumento significativo do valor da desejabilidade global (D). Resultados de experimentos no CCD (p.ex. experimentos 1, 5, 6, 13 e 14; Tab. 2) corroboram essas conclusões.

Do ponto de vista químico, a relevância das variáveis X_1 , X_2 e X_3 (bem como as condições ótimas de trabalho para as mesmas) pode ser justificada. A variável X_1 está diretamente relacionada à força de eluição da fase móvel. Assim, um aumento dos valores experimentais para essa variável ocasionou coeluição de bandas cromatográficas, prejudicando a separação e portanto, a distribuição de picos ao longo do cromatograma, causando decréscimo da resposta GCF. De modo simultâneo, o aumento do consumo de solvente orgânico aumenta o impacto ambiental global da corrida cromatográfica e, portanto, aumenta o score correspondente à função HPLC-EAT. Assim, valores de X_1 devem ser os menores possíveis, o que condiz com os resultados obtidos. Paralelamente, nota-se uma tendência similar para a variável X_2 : quando estudada em níveis experimentais maiores, ocorre uma redução na taxa de variação da força eluotrópica (em relação a X_1), o que prejudica a separação cromatográfica, bem como a distribuição dos picos cromatográficas (explicando o decréscimo individual da resposta GCF) e aumenta o consumo de solvente orgânico, aumentando o score para a resposta HPLC-EAT e portanto, reduzindo a desejabilidade global.

No que tange à variável X_3 , o aumento da temperatura do forno da coluna acarretou na eluição prematura das bandas em razão do decréscimo da constante dielétrica da água, o que potencializou a sua interação com analitos de menor polaridade e intensificou a força de eluição. Tais fatores explicam porque os menores níveis experimentais são ideais para a obtenção da impressão digital cromatográfica otimizada para *E. uniflora*.

É importante salientar que variações na desejabilidade global envolvendo experimentos de mesmo impacto ambiental estão exclusivamente relacionado à resposta GCF, uma vez que alterações nos níveis experimentais para a temperatura não modificam a quantidade de solvente orgânico empregada na corrida cromatográfica e, portanto, não alteram o score para a resposta HPLC-EAT (GABER et al., 2011).

1.4.3 Comparação da performance e do impacto ambiental do método desenvolvido em relação a um método de referência da literatura

O método desenvolvido neste trabalho foi meticulosamente comparado com um método de referência previamente reportado na literatura por Assunção et al. (2017; condições cromatográficas na legenda da Fig. 10b) para impressão digital cromatográfica das folhas de *E. uniflora*. Esse trabalho foi escolhido como método de referência entre outros na literatura porque ele apresenta bons e desejáveis valores de resolução, forma de pico e separação dos compostos presentes nas folhas de pitanga. Também, o método de referência usa acetonitrila (MeCN) como solvente orgânico, o qual pode ser considerado um solvente de referência em cromatografia líquida. O método de Assunção et al. (2017) foi meticulosamente reproduzido em nosso laboratório, e um cromatograma representativo para tal condição está indicado na figura Fig. 10b.

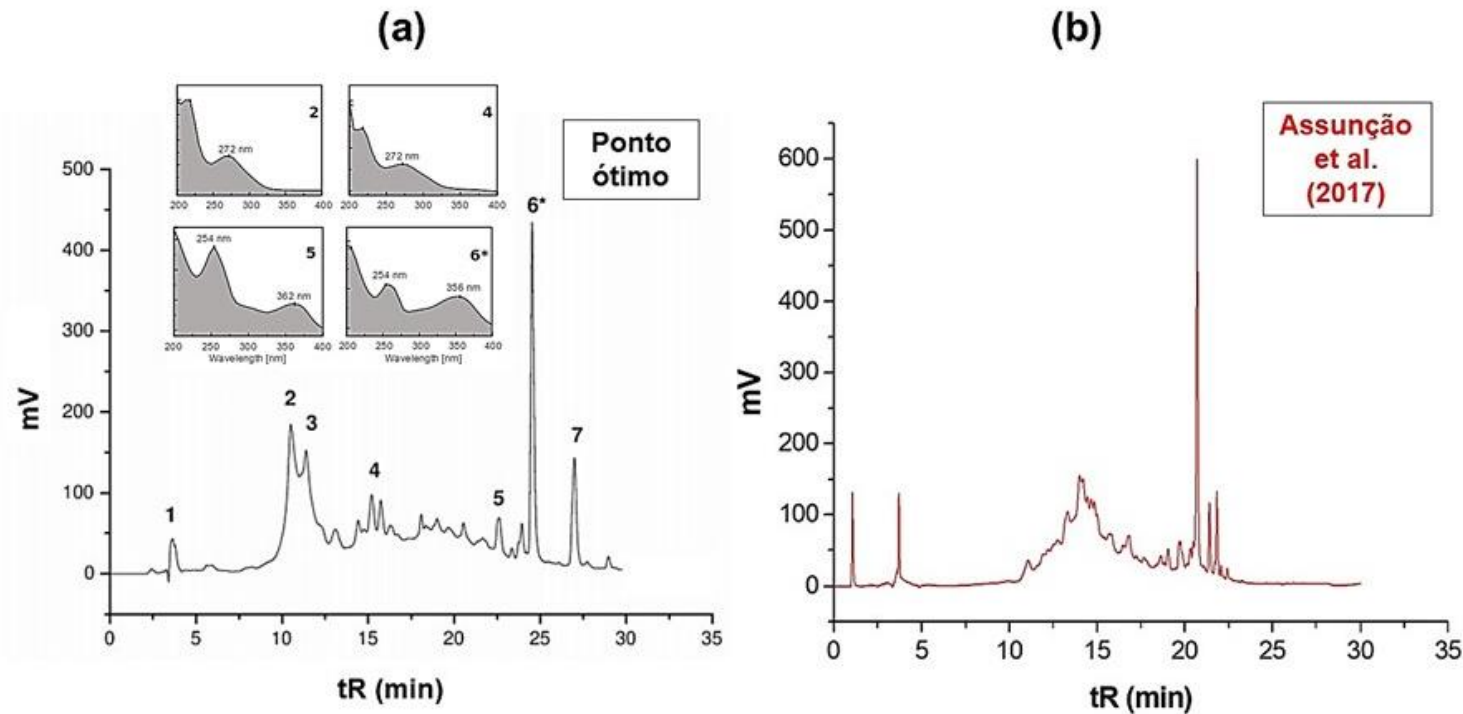


Figura 10: (a) Impressão digital cromatográfica do extrato hidroetanólico das folhas de *E. uniflora* em $\lambda = 270$ nm. Fase estacionária: XSelect, 150 x 4,6 mm. Fases móveis: H₂O + 1% AcOH (A. v/v) e bioetanol (EtOH grau alimentício 95° GL, B) no seguinte gradiente linear: 5,26 –52,63% B em 30 min. Vazão: 0,6 mL min⁻¹. Temperatura de análise: 35 °C; volume de injeção: 20 μ L. Espectros UV dos picos cromatográficos majoritários e/ou de picos representativos das classes de metabólitos presentes ou principais marcadores (2, 4, 5 e 6) estão representados acima do cromatograma. 1-3, 5-7 são picos que se encaixam no critério para avaliar a robustez do método (Seção 1.3.6); 2 ácido gálico; 4 pico representativo para a classe metabólica dos taninos hidrolisáveis com unidades de ácido gálico; 5 ácido elágico; 6* quercitrina, pico representativo para a classe dos flavonóis e pico de referência para validação (Seção 1.3.6). **(b)** Cromatograma obtido a partir da reprodução do método de referência de Assunção et al. (2017). Fase estacionária: Synergi Hydro-RP, 250 x 4,6 mm. Fases móveis: H₂O (C) e MeCN (D) no seguinte gradiente: 2-5% D em 0-5 min, 5-20% D em 5-12 min, 20-25% D em 12-15 min, 25-40% D em 15-18 min, 40-80% D em 18-25 min, 80-5% D em 25-28 min e 5-2% D em 28-30 min. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Temperatura de análise: 25°C; Volume de injeção: 20 μ L.

O método ambientalmente amigável desenvolvido nesse trabalho (Fig. 10a) e o método de referência (Fig. 10b) apresentaram scores de GCF de $279,37 \pm 32,06$ e $50,03 \pm 5,80$ ($n=5$, média \pm desvio padrão), respectivamente. Considerando especificamente tal valor, um Teste T de Student a 95% de confiança revela que o método com EtOH é estatisticamente superior ao método de referência. Isso pode ser explicado principalmente pelo maior número de picos (n) e a maior distribuição dos picos ao longo do do cromatograma (i.e, a razão entre o número de picos em uma metade do cromatograma com menos picos e o número de picos da outra metade com mais picos, ou FP/MP, termo da resposta GCF) no que se refere ao método desenvolvido em relação ao método de referência, uma vez que os valores médios de número de picos e a razão FP/MP para o método verde é maior que os mesmos em relação ao método de referência. Esses resultados evidenciaram a superioridade do método desenvolvido em relação ao de referência estritamente de um ponto de vista cromatográfico.

No que se refere ao impacto ambiental quantificado pela métrica HPLC-EAT, o método estatisticamente desenvolvido no presente trabalho foi menos impactante que o método de referência. O método cromatográfico proposto apresentou um valor de HPLC-EAT quase 3x menor que o método de referência (para essa métrica, quanto menor o *score*, mais verde é o método; GABER et al., 2011). A comparação leva em consideração apenas os gradientes até 30 minutos uma vez que o equilíbrio da coluna não foi claro no trabalho de referência publicado, mas mesmo as suposições mais otimistas não tornariam o método de referência mais verde que o método desenvolvido com bioetanol. O *score* do método desenvolvido com bioetanol pode ser ainda menor considerando que os scores originais para SHE são originalmente baseados no EtOH grau HPLC, o que pode ser produzido pela hidratação do eteno (origem não renovável) ao invés da fermentação da biomassa, uma produção mais verde empregada para se obter bioetanol (OLIVES, GONZÁLEZ-RUIZ, MARTÍN 2017; ZABED et al., 2017; FUNARI et al., 2016).

A melhor performance ambiental do método desenvolvido nesse trabalho pode ser justificada pelos scores favoráveis de segurança (S), saúde (H) e impacto ambiental (E) em relação ao EtOH em comparação com MeCN. Enquanto EtOH é considerado por alguns autores como o solvente alternativo mais verde para

cromatografia considerando sua biodegradabilidade, origem renovável (no caso do etanol grau alimentício) e toxicidade relativamente baixa (NUTRIZIO et al., 2020; PRAT et al., 2016; PRAT, HAYLER, WELLS, 2014; TOBISZEWSKI, NAMIEŚNIK, PENA-PEREIRA, 2017; CHEMAT, VIAN, CRAVOTTO, 2012; OLIVES, GONZÁLEZ-RUIZ, MARTÍN 2017), MeCN, ainda que possua uma viscosidade menor que o EtOH, apresenta toxicidade aos mamíferos e à vida aquática (FRITZ, RUTH, KRAGL, 2009; KALJURAND e KOEL, 2011); e por isso deve ser evitada mesmo em quantidades analíticas. O volume empregado em ambos os métodos também ajuda explicar a diferença de scores. O método proposto neste trabalho consome apenas 4,95 mL de EtOH por gradiente, enquanto o método de referência consome 8,25 mL de MeCN por gradiente. Isso sugere que o método desenvolvido aqui gasta 40% menos solvente que o método de referência, e também usa uma alternativa verde como modificador orgânico.

A superioridade do método desenvolvido também pode ser mostrado com a aplicação de uma métrica híbrida que consiste na razão entre GCF e HPLC-EAT, visando comparar de maneira holística o método estatisticamente desenvolvido com EtOH e o método de referência levando em consideração parâmetros de separação e sustentabilidade simultaneamente. Quanto maior a razão GCF/HPLC-EAT maior é a superioridade holística do método cromatográfico, raciocínio análogo ao apresentado pela métrica original (FUNARI et al., 2014a). Nesse contexto, as razões GCF/HPLC-EAT para o método verde desenvolvido e o método de referência foram $28,07 \pm 3.55$ e $1,70 \pm 0.20$, respectivamente., e testes T de Student (95% de confiança e para as razões em específico) revelam uma superioridade do método desenvolvido com EtOH. Então, com base nos aspectos supracitados, é muito claro que o método à base de bioetanol possui uma maior performance geral em relação ao de referência mesmo empregando um modificador orgânico mais viscoso, e pôde ser aplicado sem mudanças na instrumentação. Eventuais diferenças envolvendo o cromatograma original reportado por Assunção et al. (2017) e o obtido na reprodução em nosso laboratório podem ser atribuídas às regiões distintas onde as plantas foram cultivadas, condições climáticas, sazonalidade e condições de colheita e conservação do material vegetal.

Do ponto de vista econômico é importante destacar que o bioetanol grau alimentício empregado no presente trabalho (EtOH 95° GL) foi comprado por 3 US\$ o litro, enquanto que a MeCN grau HPLC usada no método de referência custou 17 US\$

o litro. Considerando as quantidades de solvente orgânico empregadas em ambos os gradientes, o método desenvolvido com bioetanol foi 9,4x mais barato. Adicionalmente, enquanto que o efluente gerado pelo método com etanol é composto apenas por reagentes menos tóxicos ou biodegradáveis (a matriz vegetal, AcOH e EtOH), o efluente gerado no método de referência deve ser tratado uma vez que ele contém MeCN, o que resulta em custos adicionais. Esse custo reduzido associado é relevante para pequenos laboratórios. Dados referentes à comparação entre o método desenvolvido com bioetanol e o método de Assunção et al. (2017) estão resumidos na tabela 4.

Tabela 4: Comparação da performance cromatográfica e ambiental do método proposto no presente trabalho com o método de referência de Assunção et al. (2017) previamente publicado para obtenção de *fingerprinting* metabólico de *Eugenia uniflora* L. em CLAE

Método/referência	n^a	Termos da Eq. 2			GCF ^b	HPLC-EAT ^c	GCF/HPLC-EAT ^d
		n^2	FP/MP	$n/t/l$			
Proposto neste trabalho	21,60 ± 0,55	466,80 ± 23,55	0,80 ± 0,05	0,75 ± 0,02	279,37 ± 32,06	9,95	28,07 ± 3,55
Assunção et al. (2017)	17,60 ± 1,14	310,80 ± 39,83	0,21 ± 0,02	0,78 ± 0,05	50,03 ± 5,80	29,50	1,70 ± 0,20

^a Número de picos detectados nos respectivos cromatogramas (Figs 10a,b). Resultados apresentados como média ± desvio padrão (n=5).

^b *Green Chromatographic Fingerprinting* (GCF). Quanto maior o *score*, maior é a performance cromatográfica do método. Resultados apresentados como média ± desvio padrão (n=5).

^c Quanto menor o *score*, mais sustentável é o método. Apenas gradients até 30 minutos foram levados em consideração. Cálculos foram realizados considerando valor de massa específica (ρ) de 0,785 e 0,786 g cm⁻³ para etanol (modificador orgânico empregado neste trabalho) e acetonitrila [empregada no trabalho de referência, Assunção et al. (2017)], respectivamente.

^d Resultados apresentados como média ± desvio padrão (n=5).

A programação do método de eluição ótimo no sistema CLAE está representado na figura 11.

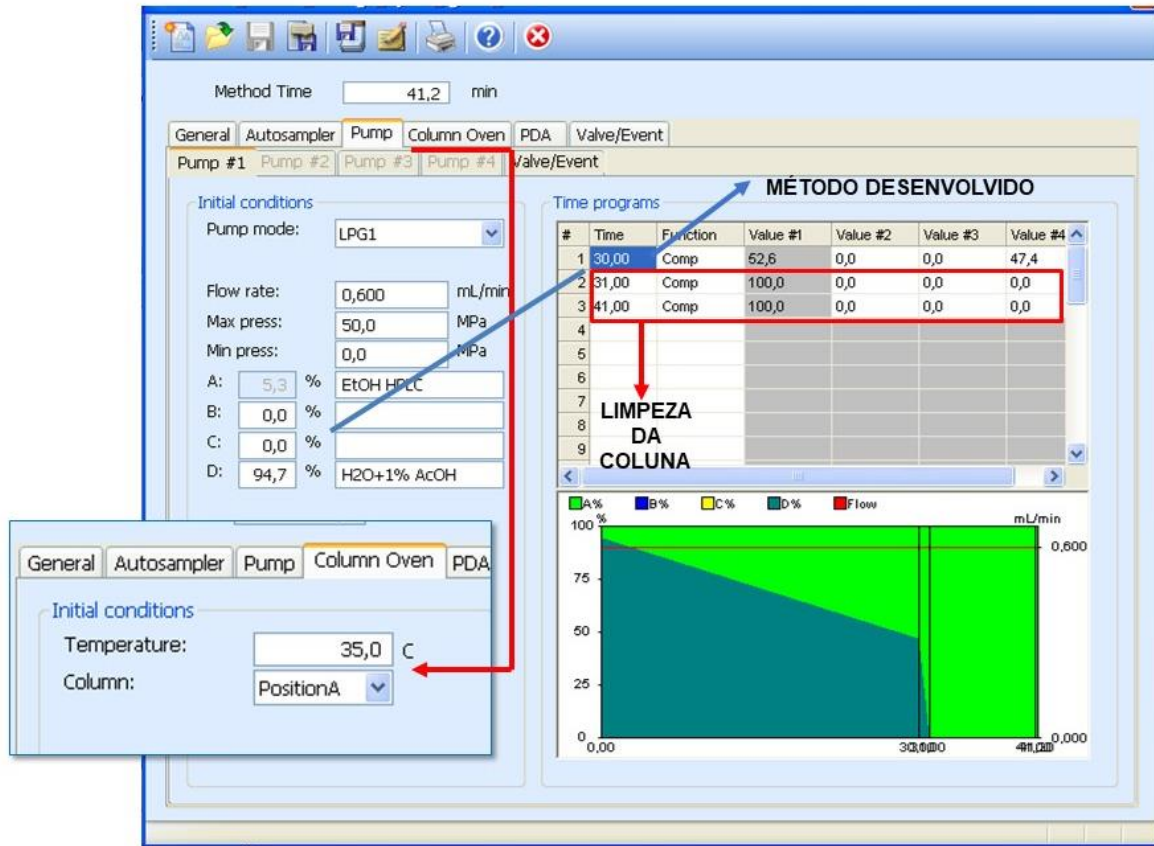


Figura 11: Programação do método ótimo desenvolvido no sistema CLAE (Jasco, Japão)

1.4.4 Aplicação do método desenvolvido para detecção dos principais classes de metabólitos secundários presentes nas folhas de *E. uniflora*

A seletividade apropriada do método desenvolvido permitiu a detecção de classes de metabólitos presentes no extrato hidroalcoólico das folhas de pitanga. Conforme indicado na Fig. 10a, os espectros UV dos compostos eluindo entre 12 - 22 min são típicos de taninos hidrolisáveis com unidades de ácido gálico (bandas de aprox. 215 e 270 nm; um espectro UV representativo é indicado para o pico 4 na Fig. 10a). Por outro lado, os espectros UV observados para picos entre 23-30 minutos são compatíveis com flavonóis (banda II entre 240-280 nm, banda I entre 300 e 380 nm;

um espectro UV representativo é apresentado para o pico 6, Fig 10a). Também, identificou-se os marcadores ácido gálico (pico 2, Fig. 10a, tR aprox. 10,5 min), ácido elágico (pico 5, Fig. 12a, tR aprox. 23 min) e quercitrina (pico 6*, Fig. 10a, tR aprox. 24,5 min; MABRY, MARKHAM, THOMAS, 1970). As estruturas dos ácidos gálico, da quercitrina e do ácido elágico estão representados na figura 12.

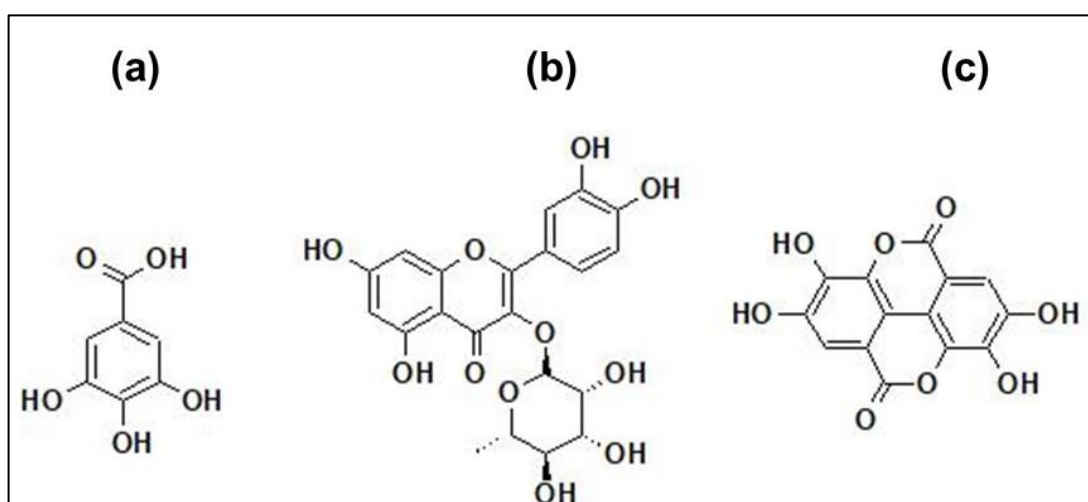


Figura 12: Estrutura de (a) ácido gálico; (b) quercitrina e (c) ácido elágico

Fonte: Elaborado pelo autor

A identidade dos marcadores foi confirmada por coinjeção de padrões autênticos isolados em laboratório e por resultados oriundos de espectrometria de massas (Tabela 5).

Tabela 5: Compostos propostos para *E. uniflora* por LC–DAD-MS e dados de UV e MS correspondentes

Pico	UV (nm) ^a	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	Composto
2	272	-	169	Ácido gálico
5	254, 362	-	301	Ácido elágico
6	254, 356	465	-	Quercitrina

^a Coincidentes (ou não) com λ_{max} ; obtidos manualmente em software do sistema cromatográfico

As classes mencionadas de metabólitos ou compostos já foram reportadas na literatura para as folhas de *E. uniflora* (LEE et al., 1997; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987; RATTMANN et al., 2012; ASSUNÇÃO et al., 2017). A identificação dessas classes ou substâncias a partir do método desenvolvido foi importante uma vez que as atividades terapêuticas para esta planta provavelmente se relacionam com compostos como os supracitados flavonóides e taninos (SCHMEDA-HIRSCHMANN

et al., 1987; RATTMANN et al., 2012) e provavelmente podem se relacionar aos ácidos gálico e elágico (SCHUMACHER et al., 2015).

Considerando a separação geral e resolução dos picos, é importante enfatizar que o método desenvolvido tem objetivos qualitativos. Isso sugere que pode ser tolerado um grau de eventuais picos de distribuição normal não-Gaussiana ou eventual sobreposição caso seja possível acessar e analisar a complexidade química da matriz, além de processar os dados de separação e espectrais no que se refere aos sinais detectados que são considerados picos, e caso quantificação não seja necessária (ALAERTS et al., 2010; JI et al., 2005; LIANG, XIE, CHAU, 2010; FUNARI et al., 2014a; SOUZA et al., 2018) como no caso deste trabalho. Portanto, o método pode ser prontamente aplicado para controle de qualidade das folhas de *E. uniflora* bem como de seus derivados por uma metodologia mais sustentável.

1.4.5 Validação do método cromatográfico

1.4.5.1 Precisão instrumental

Nove experimentos consecutivos com a mesma amostra (razão material vegetal/ solução extratora 10 mg mL⁻¹) e o mesmo *vial* foram executados para estimar a precisão instrumental (ICH, 2005). O valor máximo de desvio padrão relativo (% DPR) em relação ao tempo de retenção relativo foi de 0,24%; valor considerado satisfatório.

1.4.5.2 Repetibilidade

Para estimativa da repetibilidade, nove experimentos consecutivos foram novamente executados no sistema CLAE, contudo as amostras foram preparadas em três diferentes razões de material vegetal/ solução extratora (5; 7,5 e 10 mg mL⁻¹, em três diferentes *vials*), e três replicatas para cada concentração. O valor de desvio padrão relativo (% DPR) máximo para o tempo de retenção relativo foi de 0,28%; valor considerado satisfatório. Mesmo com a variação na concentração da amostra, o perfil cromatográfico não apresentou mudanças qualitativas e apresentou uma boa seletividade.

1.4.5.3 Precisão Intermediária

A precisão intermediária foi estimada através da realização de combinações aleatórias das variáveis razão material vegetal/solução extratora (5; 7,5 e 10 mg mL⁻¹), volume de injeção (10, 15 e 20 µL) e dia de injeção (três dias diferentes para cada amostra). O valor de desvio padrão relativo (% DPR) máximo para o tempo de retenção relativo foi de 2,36%; considerado satisfatório. O perfil cromatográfico também permaneceu qualitativamente igual mesmo com volumes de injeção distintos.

1.4.5.4 Robustez

A robustez do *fingerprinting* cromatográfico foi avaliada com a realização de pequenas mas deliberadas mudanças nas condições experimentais do método (ICH, 2005). Um Planejamento Fatorial Completo com 4 réplicas no ponto central foi escolhido para tal etapa visto que ele é considerado apropriado para tais propósitos e considerando que o número de variáveis avaliados foi pequeno (no caso, 3); desse modo foi possível avaliar a robustez com um número reduzido de experimentos (FERREIRA et al. 2017; CHRIST et al. 2014), o que também é coerente com os supracitados princípios 7, 8 e 9 da Química Analítica Verde. Planejamentos Experimentais têm se mostrado uma estratégia bem-sucedida para avaliação da robustez em certos trabalhos com propósitos cromatográficos (SRINUBABU et al., 2007; CHRIST et al., 2014). O planejamento fatorial executado e os respectivos cromatogramas estão indicados na tabela 6 e na figura 13, respectivamente.

Tabela 6: Valores codificados (e reais) para as variáveis independentes estudadas no Planejamento Fatorial Completo 2³ e respostas correspondentes aos tempos de retenção relativos (em relação ao pico de referência 6, Fig. 10a e Fig. 13)

Exp.	Variáveis independentes			Respostas				
	A ^a	B ^a	C ^a	RRt pico1 ^b	RRt pico 2 ^b	RRt pico 3 ^b	RRt pico 5 ^b	RRt pico7 ^b
1	-1 (0,59)	-1 (33 °C)	-1 (0,8%)	0,1470	0,4430	0,4803	0,9255	1,0950
2	+1 (0,61)	-1 (33 °C)	-1 (0,8%)	0,1446	0,4375	0,4753	0,9240	1,0978
3	-1 (0,59)	+1 (37 °C)	-1 (0,8%)	0,1457	0,4356	0,4715	0,9222	1,0995
4	+1 (0,61)	+1 (37 °C)	-1 (0,8%)	0,1438	0,4270	0,4627	0,9203	1,1031
5	-1 (0,59)	-1 (33 °C)	+1 (1,2%)	0,1426	0,4268	0,4653	0,9231	1,0983
6	+1 (0,61)	-1 (33 °C)	+1 (1,2%)	0,1403	0,4209	0,4594	0,9225	1,1013
7	-1 (0,59)	+1 (37 °C)	+1 (1,2%)	0,1433	0,4179	0,4553	0,9157	1,1036
8	+1 (0,61)	+1 (37 °C)	+1 (1,2%)	0,1441	0,4121	0,4488	0,9146	1,1068
CP ^c	0 (0,60)	0 (35° C)	0 (1,0%)	0,1399 ±0,0064	0,4285 ±0,0003	0,4651 ±0,0004	0,9220 ±0,0002	1,1007 ±0,0001

^aA (Vazão, mL min⁻¹); B (Temperatura, °C); C (% AcOH em A, v/v).

^bTempo de retenção relativo (RRt) dos picos em relação ao pico de referência (destacado com um asterisco, Fig. 10a e Fig. 13).

^c Pontos centrais. Resultados apresentados como média ± desvio padrão (n=4).

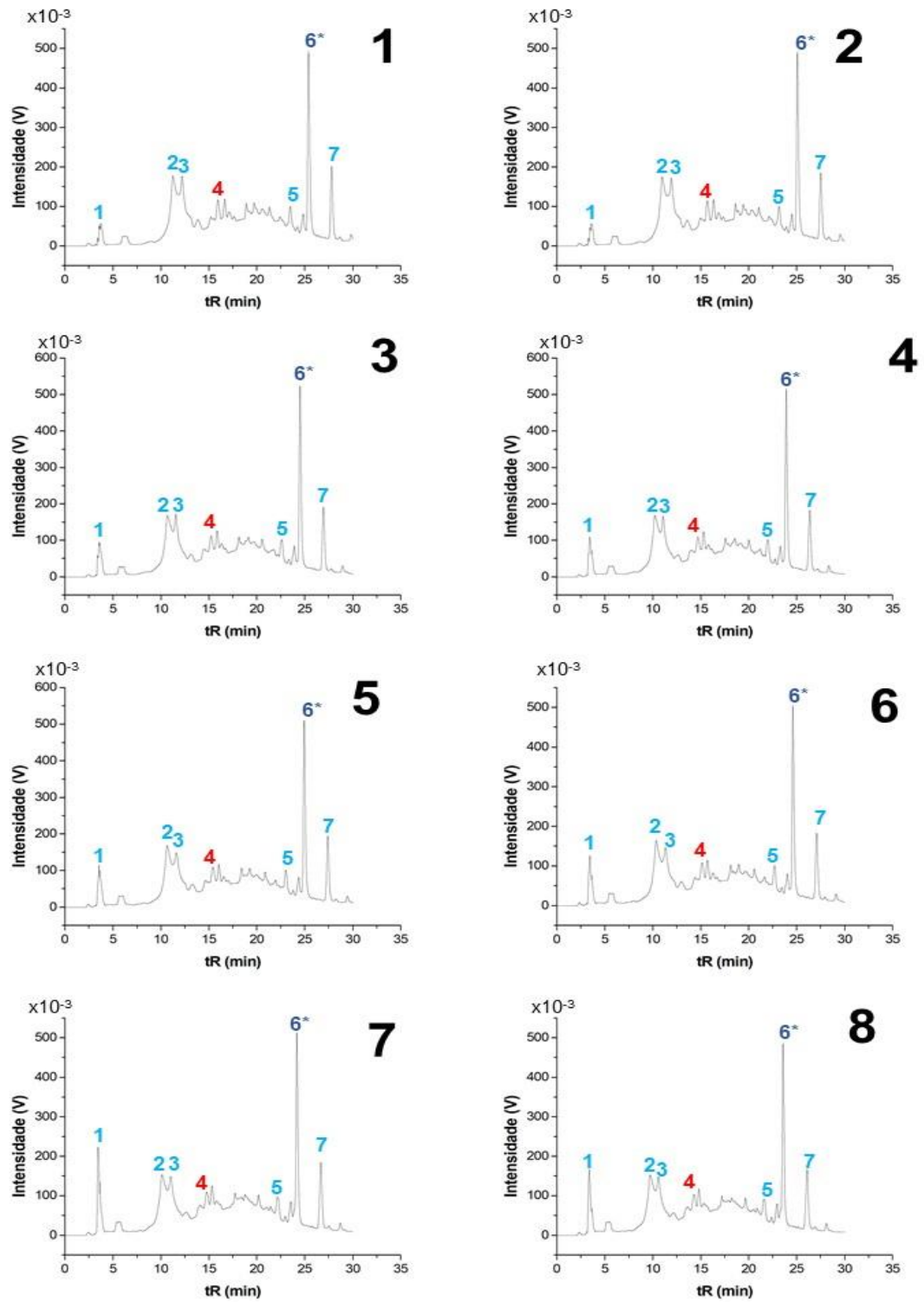


Figura 13: Cromatogramas relativos aos experimentos do Planejamento Fatorial Completo 2^3 para avaliação da robustez do método. Pontos centrais foram omitidos; realizados apenas para mensurar os erros

Os picos que se encaixaram nos critérios para avaliação da robustez em todos os experimentos realizados foram 1, 2, 3, 5 e 7 (Figs. 10a e 13). De acordo com resultados de Análise de Variância (ANOVA), no que se refere ao tempo de retenção relativo (RRt) do pico 1 em relação ao pico de referência 6 (destacado com um asterisco nas Figs. 10a e 13), não há nenhuma variável principal ou interação que tenha se mostrado significativa a 95% de confiança e nos intervalos estudados para as respectivas variáveis no Planejamento Fatorial Completo e o método apresenta robustez para esse pico em específico. No entanto, os outros picos apresentaram efeitos principais e interações significativas. Assim, em relação aos picos 2, 3, 5 e 7, as variáveis A, B e C têm de ser fixadas para garantir a robustez efetiva do método (SRINUBABU et al., 2007).

1.4.6 AGREE – Analytical GREeness

Os parâmetros de entrada no *software* da métrica AGREE estão representados na Tabela 7 e os pictogramas resultantes estão representados na figura 14a,b.

Tabela 7: Parâmetros de entrada no software da métrica AGREE para cálculo do *score* referente ao método cromatográfico desenvolvido e o método de Assunção et al. (2017).

Parâmetros de entrada (AGREE)			
Método desenvolvido com etanol		Método de Assunção et al. (2017)	
Princípio	Parâmetro	Princípio	Parâmetro
1	Off-line analysis	1	Off-line analysis
2	0.02 mL	2	0.02 mL
3	Off-line	3	Off-line
4	3 or fewer	4	3 or fewer
5	Semi-automatic / not miniaturized	5	Semi-automatic / not miniaturized
6	-	6	-
7^a	4.95	7^b	8.25
8	22/2	8	18/2
9	LC	9	LC
10	All reagents are biobased	10	None of the reagents are from bio-based sources
11	No	11	Yes/ 8.25
12	Highly flammable	12	Highly flammable/ toxic to aquatic life/ bioaccumulative

^a Volume de etanol gasto no gradiente

^b Volume de acetonitrila gasto no gradiente

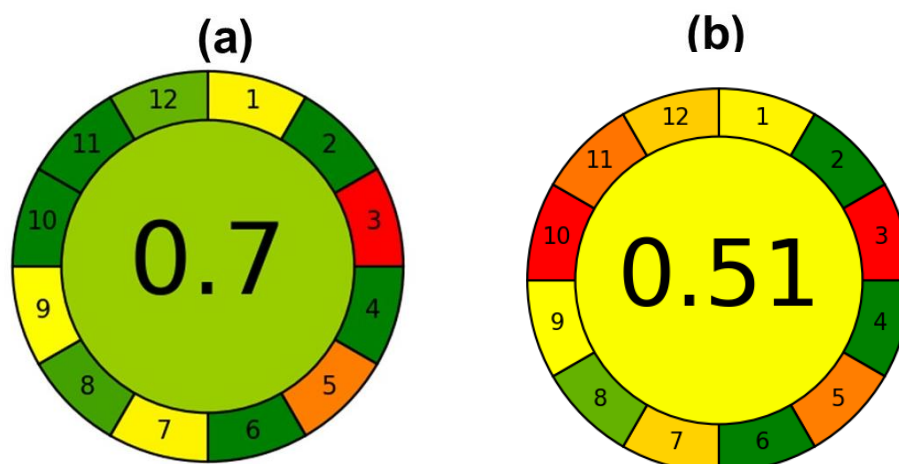


Figura 14: Pictogramas contendo os *scores* apresentados na métrica AGREE para **(a)** o método com bioetanol desenvolvido no presente trabalho e **(b)** o método de Assunção et al. (2017)

No que tange aos parâmetros de entrada, considerou-se que não foram empregados solventes tóxicos para o método de eluição desenvolvido com bioetanol visto que, comparativamente, o etanol é muito menos tóxico do que a acetonitrila, modificador orgânico empregado no método de referência. Além disso, o etanol empregado é grau alimentício, oriundo da biomassa e portanto, sob uma perspectiva global e em termos de produção e demanda, é menos tóxico do que o EtOH grau HPLC. Ambos os métodos receberam elevada penalidade no que tange ao princípio 3 da Química Analítica Verde (em vermelho nos pictogramas) considerando o posicionamento *offline* da instrumentação empregada para ambos os métodos de eluição. O princípio 5 também trouxe uma penalidade considerável aos métodos (e está em laranja em ambos os pictogramas) considerando que a metodologia foi semi-automática e o preparo de amostra não foi miniaturizado. No entanto, o método de eluição verde desenvolvido no presente trabalho apresentou superioridade em aspectos ambientais em comparação com o método de referência: Em oposição ao método de Assunção et al. (2017), o bioetanol possui uma toxicidade muito reduzida se comparada com a acetonitrila, um solvente que apresenta um risco associado muito maior do que o anterior. Assim, o método verde está em maior consonância com os princípios 10,11 e 12 da Química Analítica Verde. O condicionamento das colunas não foi considerado nos cálculos considerando que o mesmo não foi informado com detalhes no trabalho de referência.

Sob uma perspectiva global, portanto, o método desenvolvido é mais ambientalmente amigável, confirmando os resultados obtidos através da métrica HPLC-EAT.

1.5 CONCLUSÃO

Neste capítulo, foi apresentado uma alternativa ambientalmente amigável e eficiente para desenvolvimento de um método de eluição para *fingerprinting* metabólico das folhas de *Eugenia uniflora* L. O uso de um solvente mais sustentável e barato, aliado ao uso de planejamentos experimentais que possibilitam a obtenção de uma condição cromatográfica ótima através de uma abordagem multiparamétrica e holística possibilitou a substituição da acetonitrila, um solvente tóxico comumente empregado em CLAE, por bioetanol. Ainda que tal solvente seja mais viscoso, o método foi desenvolvido com uma vazão reduzida, de modo que o sistema não ultrapassou 14,5 MPa e a temperatura de análise foi próxima à temperatura ambiente, possibilitando o emprego de tal solvente em um sistema CLAE convencional e não exigindo modificações dispendiosas na instrumentação. O método considerou simultaneamente aspectos ambientais e de separação, foi qualitativamente validado e apresentou-se como, além de uma alternativa verde, uma alternativa interessante sob o aspecto analítico para controle de qualidade das folhas de pitanga e seus derivados.

CAPÍTULO 2

2.1 INTRODUÇÃO E REVISÃO

A Tecnologia Verde, uma das áreas de maior interesse da Química nos dias atuais, essencialmente tem como foco a minimização do impacto antrópico negativo sobre o planeta, e visa a preservação do meio ambiente. Assim, tal âmbito do conhecimento objetiva minimizar ou reduzir o uso de solventes danosos, poluentes e tóxicos, de modo que, em contrapartida, sejam adotadas técnicas ambientalmente amigáveis, de modo paralelo ao desenvolvimento e adoção de novos solventes alternativos de caráter sustentável. Tal campo é considerado como a área de estudo mais ativa no contexto da Química Verde (DAI et al., 2013a; ESPINO et al., 2016).

Visto que os solventes estão relacionados com a maior quantidade em massa de resíduos oriundos de sínteses e processos e que os mesmos são imprescindíveis considerando seu papel-chave em etapas como dissolução, transferência de massa e calor, purificação, separação, entre outras (ESPINO et al., 2016; BUBALO et al., 2015), desenvolver solventes sustentáveis como substitutos de solventes tradicionais mais danosos é um desafio significativo porém um objetivo prioritário (ESPINO et al., 2016; LAVILLA et al., 2014; PENA-PEREIRA, KLOSKOWSKI, NAMIEŚNIK, 2015). De modo coerente, uma das maiores prioridades da política e legislação ambiental da União Europeia entre o período de 2010 a 2050 envolve a redução significativa do emprego de solventes orgânicos voláteis (VOCs, considerando sua potencial volatilidade, inflamabilidade e, muitas vezes, elevada toxicidade) e/ou outros solventes não-inócuos de diversas origens, substituindo-o por opções mais verdes, de origem renovável e que simultaneamente atendam às demandas e objetivos tecnológicos e econômicos (BUBALO et al., 2015; RADOŠEVIĆ et al., 2016; EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY, 2013).

Durante décadas, líquidos iônicos (ILs) têm recebido o foco da comunidade científica, recebendo notoriedade por se apresentarem como solventes alternativos aos tradicionais (ESPINO et al., 2016; PAIVA et al., 2014). Eles podem ser formados a partir da associação de um ânion coordenante (a exemplo de haletos de piridínio e imidazólio) com um agente complexante (como ácidos), fenômeno que induz a deslocalização de carga e promove a redução da interação com o cátion (DURAND, LECOMTE, VILLENEUVE, 2016; ABBOTT, HARRIS, RYDER, 2007). Esses

compostos são relatados na literatura desde 1914 (CHOI et al., 2011; PLECHKOVA e SEDDON, 2008). Porém, os ILs geralmente apresentam baixa biocompatibilidade e, por consequência, apresentam um caráter pouco sustentável para os processos nos quais são empregados (PAIVA et al., 2014). Entre 2002 e 2003, houve uma modificação nesse cenário quando Abbott et al. (2003) introduziram na literatura os ‘Solventes Eutéticos Profundos’ (tradução livre de *Deep Eutectic Solvents*, ou DESs). O artigo publicado por tais autores basicamente reportou uma mistura contendo os sólidos cloreto de colina e uréia, ambos com elevados pontos de fusão quando separados. Tais componentes de partida, quando misturados, formaram um sistema eutético. A estrutura supramolecular dos DESs se relaciona com uma rede de ligações de hidrogênio e/ou interações Van der Waals em sua estrutura, às quais, sob uma perspectiva global, induzem o DES a permanecer líquido em um amplo intervalo de temperaturas e a apresentar propriedades interessantes que possibilitem seu emprego como solvente. Assim, combinações de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio podem ser estabelecidas, possibilitando a manipulação das propriedades físico-químicas e comportamento de fase dessa classe de solventes (ESPINO et al., 2016; FRANCISCO, van den BRUINHORST, KROON, 2013).

Quando seus materiais de partida são compostos abundantes no meio celular, a exemplo de açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e derivados de colina, tais solventes são denominados Solventes Eutéticos Naturais Profundos (tradução livre de *Natural Deep Eutectic Solvents*, ou NADESs; ESPINO et al., 2016). Os NADESs surgiram na literatura na última década e, de modo similar aos DESs, eles se notabilizam pelo potencial como meios alternativos ambientalmente amigáveis em relação a solventes perigosos frequentemente empregados na academia e na indústria (ESPINO et al., 2016; ABBOTT et al., 2004).

A existência dos NADES foi introduzida na literatura por Choi et al. (2011) Tal trabalho pioneiro enfatiza que tais fluidos são formados da combinação de metabólitos primários altamente bio-renováveis e biodisponíveis (como ácidos orgânicos, derivados de colina, açúcares e aminoácidos). Além disso, eles são desenvolvidos pela natureza e caracterizam um meio alternativo à água e aos lipídios em células de certos organismos, como plantas, mamíferos e micróbios, por exemplo, exercendo um papel primordial em funções bioquímicas e fisiológicas (CHOI et al., 2011).

Nesse contexto, com base em certa evidência experimental (como por exemplo testes que provam uma maior solubilidade da rutina em NADESs à base de cloreto de colina em comparação com a sua solubilidade em água ou a atividade enzimática de certos NADESs) e dados prévios da literatura, Choi et al. (2011) postularam que a presença dos NADESs nas células justificaria uma série de processos biológicos peculiares. Dentre estes, pode-se citar a biossíntese e armazenamento de biomoléculas ou metabólitos insolúveis em água no meio intercelular majoritariamente aquoso, bem como atividade e estabilidade enzimática, germinação, defesa e sobrevivência de certos organismos em condições extremas como frio excessivo e seca (CHOI et al., 2011). Alguns desses postulados têm sido confirmados experimentalmente desde então (DAI et al., 2013a; MONHEMI et al., 2014; WU et al., 2014; CASTRO et al., 2018); evidenciando a relevância desses solventes para a bioquímica celular, possibilitando uma compreensão mais refinada de certos mecanismos celulares, além da sua aplicabilidade como solventes verdes (CHOI et al., 2011).

De fato, os NADESs apresentam propriedades desejáveis como solventes e, portanto, são uma promissora alternativa sustentável. Dentre essas propriedades, destacam-se a viscosidade ajustável, volatilidade negligenciável, capacidade maior de solubilização de vários compostos de polaridade reduzida em comparação com solventes convencionais, permanência na fase líquida mesmo em temperaturas abaixo de 0°C, toxicidade reduzida ou nula, biocompatibilidade e custo baixo. Portanto, não é de se surpreender que uma das maiores aplicações dos NADESs sejam como solventes extratores sustentáveis (DAI et al., 2013a; ESPINO et al., 2016; RADOŠEVIĆ et al., 2016; CHOI et al., 2011; DAI et al., 2013b; WEI et al., 2015a).

Tal aplicação é especificamente interessante considerando que o emprego de solventes eutéticos naturais profundos como meios extratores viabilizam a aplicação dos 6 Princípios da Extração Verde, ou *The Six Principles of Green Extraction*, idealizados e propostos por Chemat, Vian e Cravotto (2012). Resumidamente, eles estabelecem o seguinte:

- (1) Inovação pela escolha de variedades e aplicação de recursos renováveis oriundos de material vegetal;
- (2) Uso de solventes alternativos, sobretudo agro-solventes e água;

- (3) Redução do consumo de energia por reciclagem energética e aplicação de inovações tecnológicas;
- (4) Produção de co-produtos em detrimento de resíduos perigosos de modo que a indústria de bio e agro-refino seja envolvida;
- (5) Diminuição de operações unitárias e priorização de processos controlados, seguros e robustos;
- (6) Priorização de extratos biodegradáveis e sem presença de desnaturação sem contaminantes.

Isso é especificamente interessante ao se extrair compostos de interesse de plantas considerando o anacronismo que o uso de solventes e metodologias tóxicas e perigosas caracterizam para a Química dos Produtos Naturais como um todo (FUNARI et al., 2014a,b), sobretudo quando isso envolve espécies com potencial terapêutico, a exemplo da *Eugenia uniflora* L. Assim, o presente trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de uma metodologia extratora otimizada, segura e ambientalmente amigável para parte do metaboloma das folhas de pitanga, visando mover instituições regulatórias, farmacopeias e até mesmo o setor industrial a adotar de fato metodologias completamente sustentáveis em estudos metabolômicos.

2.2 OBJETIVOS

- Desenvolver um método otimizado para extração assistida a microondas dos metabólitos fenólicos presentes nas folhas de *E. uniflora* L.;
- Comparar a capacidade extratora do solvente eutético empregado como meio extrator com um solvente de referência.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Materiais

Bioetanol (EtOH grau alimentício, Quimisul, Brasil), Ácido acético (AcOH, grau analítico, Synth, Brasil), água purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA), DL-ácido málico (MA, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich Co. EUA), D-Sorbitol (Sor, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich Co. EUA), D-(-)-frutose (Fru, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich Co. EUA), Sacarose (Suc, $\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich Co. EUA), D-(+)-glicose (Glu, $\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich Co. EUA), Ácido láctico (LA, 85% m/m, Sigma-Aldrich Co. EUA) e Cloreto de colina (ChCl, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich Co. EUA) foram empregados nesta etapa do trabalho.

2.3.2 Preparação dos solventes eutéticos naturais profundos (NADESs)

A preparação dos NADESs foi baseada na metodologia de Gomez et al. (2018) com modificações. Dois ou três componentes de partida em razões molares específicas (levando em consideração suas respectivas purezas e solubilizados em 20% de água em massa, também considerando a pureza) foram colocados em um *vial* fechado. As misturas correspondentes foram submetidas à irradiação microondas de baixa potência (200 W) em um sistema microondas (Ethos Easy, Milestone SrL, Itália, Figura 15) em ciclos de 5 minutos (3 minutos de rampa para atingir a temperatura programada de 40 ou 55 graus seguidos por 2 minutos de irradiação com a temperatura estável, Tabela 8). Cada ciclo foi repetido para cada uma das misturas eutéticas até que um fluido uniforme, homogêneo e transparente fosse obtido. As soluções resultantes foram empregadas como meio extrator dos metabólitos fenólicos presentes nas folhas de pitanga como alternativa à maceração dinâmica empregada em solução hidroalcoólica no Capítulo 1.

Tabela 8: Diferentes combinações para a preparação dos NADESs

NADES ^a	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Razão molar	Método empírico para síntese (ciclos) ^b
MA: Sor 1:1	Ácido málico	Sorbitol		1:1	
MA: Glu:Fru 1:1:1:	Ácido málico	Glicose	Frutose	1:1:1	3 minutos de rampa + 2 minutos a 55°C e 200W
La: Suc 1:2	Ácido láctico	Sacarose		1:2	
ChCl: Glu 1:1	Cloreto de colina	Glicose		1:1	
ChCl: LA 1:3	Cloreto de colina	Ácido láctico		1:3	3 minutos de rampa + 2 minutos a 40°C e 200W

^a Preparados com 20% H₂O (m/m), considerando a pureza dos componentes

^b Os ciclos foram repetidos até a formação de uma mistura completamente homogênea e uniforme

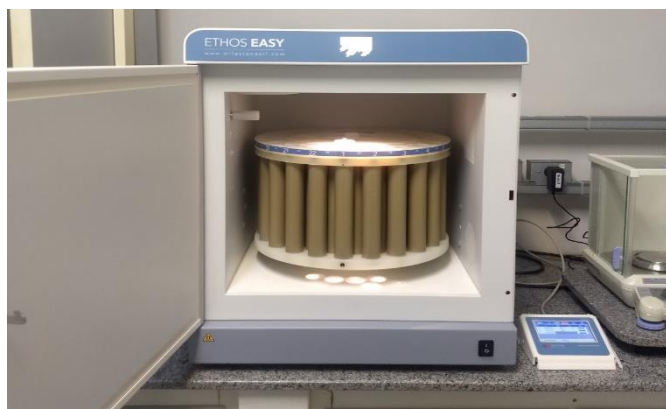


Figura 15: Equipamento empregado para síntese e extrações assistidas a microondas (Ethos Easy, Milestone Srl, Itália)

Fonte: Fotografado pelo autor

Os ciclos para síntese foram desenvolvidos empiricamente em condições nas quais (1) não ocorresse degradação ou queima dos componentes da partida antes da formação da estrutura supramolecular dos NADES e, portanto, uma mistura completamente uniforme, homogênea e transparente fosse obtida e (2) não houvesse ruptura do septo do *vial* por um eventual aumento de pressão dentro dos mesmos.

2.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho das misturas formadas foram obtidos em espectrômetro Nicolet iS10 (Thermo Scientific, EUA), utilizando método de Refletância Total Atenuada e acessório ATR com janela de Ge.

2.3.4. Extração assistida a microondas (MAE) do metaboloma de *E. uniflora*

Em todas as extrações assistidas a microondas nesse trabalho (Ethos Easy, Milestone Srl, Itália, Fig. 15), a rampa utilizada para se atingir a temperatura programada foi de 5 minutos. As extrações ocorreram conforme relatado nas seções seguintes.

2.3.4.1 Triagem com diferentes NADESs

Inicialmente, visando identificar as misturas eutéticas com maior capacidade extratora, extrações foram realizados com os solventes preparados (Tab. 8). As áreas totais dos picos apresentadas por cada extração, bem como o número total de picos cromatográficos apresentados nos cromatogramas representativos oriundos de cada extração, possibilitaram a comparação estatística da capacidade extratora de cada mistura eutética a partir de *one-way* ANOVA seguida por Teste Tukey, a 95% de confiança.

Nesta etapa, a temperatura para todas as extrações foi programada em 50°C e a potência foi fixada em 350 W. Além disso, as extrações foram realizadas em triplicata e 20 µL de cada amostra foram injetados em duplicata no sistema HPLC (vide especificações técnicas no capítulo 1).

2.3.4.2 Otimização com o Planejamento Composto Central e Função de Desejabilidade Global

Um planejamento Composto Central (CCD) de três fatores e cinco replicatas no ponto central foi executado para otimizar globalmente as condições de extração. As variáveis independentes estudadas foram a razão de material vegetal: NADES (m/m, X_1), tempo de irradiação (X_2 , em minutos) e temperatura (X_3 , °C) empregando

como meio extrator o solvente eutético ChCl + LA 1:3 (contendo 20 % de água em massa considerando a pureza dos componentes de partida), escolhido como o melhor NADES na seção 2.3.4.1. Nesta etapa, a potência foi fixada em 800 W visando atingir a temperatura programada mais rapidamente. As respostas monitoradas foram a área total do cromatograma (com propósitos não direcionados) e a área individual de 4 picos ou metabólitos-alvo (identificados como *a*, *b*, *c* e *d*), representativos dos cromatogramas obtidos em todas as extrações obtidas e/ou potenciais marcadores químicos da pitanga.

Funções de Desejabilidade foram empregadas para otimizar simultaneamente e obter uma troca ou compensação entre as cinco variáveis dependentes estudadas. As respostas foram normalizadas e convertidas em desejabilidades individuais com o emprego das Eq. 8 e 9.

Para a resposta 'área total', foi empregada a Eq. 8:

$$d_{(\text{área total})} = \left(\frac{y-L}{T-L} \right)^2 \text{ se } L \leq y \leq T \quad (8)$$

Onde $d_{(\text{área total})}$ é a desejabilidade individual para a resposta área total com peso 2 (y é o valor da resposta, T é o valor alvo para área total, ou, em nosso caso, o maior valor obtido no Planejamento Composto Central) e L é o menor valor aceitável (ou, no nosso caso, o menor valor obtido no Planejamento Composto Central; DERRINGER e SUICH, 1980; PEREIRA-FILHO, 2015; NUNES et al., 2019).

Para as respostas 'área do pico A' a 'área do pico D' foi empregada a Eq. 9:

$$d_{(\text{área do pico A-D})} = \left(\frac{y-L}{T-L} \right) \text{ se } L \leq y \leq T \quad (9)$$

Onde $d_{(\text{área do pico A-D})}$ é a desejabilidade individual para as áreas dos picos A a D com peso 1, y é o valor da resposta, T são os valores alvo para as áreas individuais (ou, em nosso caso, os maiores valores obtidos no Planejamento Composto Central) e L são os menores valores aceitáveis (ou, no nosso caso, os menores valores obtidos para as respectivas respostas no Planejamento Composto Central; DERRINGER e SUICH, 1980; PEREIRA-FILHO, 2015; NUNES et al., 2019).

O valor de desejabilidade individual para as cinco respostas foram combinados em um valor de desejabilidade global (D) por meio da média geométrica dos valores

de desejabilidade individuais para cada experimento, de acordo com a Eq. 10; DERRINGER e SUICH, 1980; PEREIRA-FILHO, 2015; NUNES et al., 2019).

$$D = \sqrt[5]{d_{(\text{área total})}d_{(\text{área do pico A})}d_{(\text{área do pico B})}d_{(\text{área do pico C})}d_{(\text{área do pico D})}} \quad (10)$$

D assume o valor zero se qualquer valor de desejabilidade individual assumir um valor inaceitável (DERRINGER e SUICH, 1980; PEREIRA-FILHO, 2015; NUNES et al., 2019).

A determinação das variáveis significativas e do modelo empírico que descreve o domínio experimental estimado com o CCD em função de D em cada desenho experimental foi realizada no nível de confiança de 95% .

Cálculos de análise de variância (ANOVA), Testes de Tukey e T de Student, probabilidade normal e gráficos de superfície de resposta foram realizados nos softwares GNU Octave 4.2.1, GraphPad Prism (GraphPad Software, EUA), Statistica 7 (Stat-Ease, Inc, EUA) e Excel 2013 (Microsoft, EUA).

Uma vez que a interação sinérgica entre vários compostos é responsável pelas propriedades terapêuticas globais de uma espécie vegetal (TISTAERT, DEJAEGER, VANDER HEYDEN, 2011; LIANG, XIE, CHAU, 2010), o peso da desejabilidade individual referente à área total dos picos foi 2, enquanto que a mesma foi 1 para as demais respostas. As extrações foram realizadas em ordem aleatória para evitar a inserção de erros sistemáticos ou viés na otimização e a determinação de fatores significativos ou a estimativa de modelos de regressão foram realizados a 95% de confiança.

Nesta etapa específica, 20 µL de cada amostra preparada no Planejamento Composto Central foram injetados em triplicata no sistema CLAE.

2.3.5 Preparação das amostras para injeção no sistema CLAE

Todos os extratos preparados à base de NADES foram centrifugados no mínimo por 25 minutos (7200 rpm, BioPet Technologies, Global Trade, Brasil). Uma massa conhecida de cada sobrenadante foi transferida para outro *vial* e diluída na razão 1:3 (em massa) com água. As soluções foram filtradas através de um microfiltro

de PTFE (0,45 μm , SimplePure – Allcrom, Brasil) e 20 μL foram injetados no sistema CLAE (vide descrição detalhada no capítulo 1).

2.3.6 Análises em CLAE

As amostras foram analisadas a partir do método de eluição ambientalmente amigável desenvolvido no capítulo 1 para obtenção da impressão digital cromatográfica das folhas de *Eugenia uniflora* L. O método estatisticamente otimizado utilizou como fases móveis um sistema binário composto por H_2O + 1% AcOH (v/v, A) e EtOH 95 ° GL (B). O equilíbrio da coluna foi atingido com 5,26% de B em 25 min e vazão de 1 mL min^{-1} (eluição isocrática com 10 volumes, considerando as recomendações do fabricante da coluna), seguida por gradiente linear de 5,26 - 52,63 % de B em 30 minutos, a 0,6 mL min^{-1} e 35°C. Antes de cada experimento, a coluna foi equilibrada com a porcentagem inicial de B do gradiente linear seguinte. Após cada corrida cromatográfica, a fase estacionária foi lavada com um mínimo de 6 mL de B para que corridas subsequentes não fossem afetadas por compostos menos polares retidos na coluna.

2.3.7 Comparação entre extração assistida a microondas desenvolvida e otimizada com NADES e metodologia extratora com solvente de referência

A metodologia otimizada para extração desenvolvida através do Planejamento Composto Central (0,05:1 de razão material vegetal/ NADES, m/m); 47 minutos de irradiação, 39°C e 800W de potência) foi executada utilizando o NADES escolhido na etapa de triagem ('ChCl: LA 1:3') e com a solução hidroalcoólica de EtOH/ H_2O 7:3 (v/v), empregada como meio extrator de referência para fins de comparação. Ambos os solventes extratores foram comparados mediante a capacidade extratora (através da avaliação da área total dos picos dos cromatogramas provenientes das respectivas extrações) e o impacto ambiental de cada sistema solvente (avaliado a partir a métrica HPLC *Environmental Assessment Tool*; HPLC-EAT, GABER et al., 2011; descrita em detalhes no capítulo 1).

Os dados que tangem aos parâmetros Segurança (S), Saúde (H) e impacto ambiental (E) para a mistura eutética composta por cloreto de colina e ácido láctico são

provenientes do trabalho de Sutton et al. (2018) e da *OECD Existing Chemicals Database* (OECD Secretariat, 2017).

Alternativamente, a métrica AGREE (*Analytical GREenEss Calculator*; PENA-PEREIRA, WOJNOWSKI, TOBISZEWSKI, 2020; descrita detalhadamente no capítulo 1) também foi empregada para fins de comparação entre as extrações envolvendo NADES e a solução hidroalcoólica.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Aspecto dos solventes eutéticos naturais profundos (NADESs) preparados

Conforme resumido na tabela 9, os cinco solventes eutéticos naturais profundos preparados no presente trabalho (NADESs, Fig. 16a-e), majoritariamente, apresentaram moderada ou elevada viscosidade (mesmo contendo 20% de água em massa), com exceção do NADES composto por cloreto de colina e ácido láctico na razão molar 1:3 ('ChCl:LA 1:3').

Tabela 9: Solventes eutéticos naturais profundos sintetizados (contendo 20% de H₂O, m/m) e aspecto apresentado pelas misturas resultantes. Para condições de síntese vide Tab. 8.

NADESs	Abreviatura	Aspecto
Ácido málico: sorbitol 1:1	MA: Sor 1:1	Muito viscoso, transparente
Ácido málico: glicose: frutose 1:1:1	MA: Glu: Fru 1:1:1	Muito viscoso, transparente, levemente amarelado
Ácido láctico: sacarose 1:2	LA: Suc 1:2	Muito viscoso, transparente, intensamente amarelado
Cloreto de colina: glicose 1:1	ChCl: Glu 1:1	Moderadamente viscoso, transparente
Cloreto de colina: ácido láctico 1:3	ChCl: LA 1:3	Transparente

Também foi possível notar que as cinco misturas apresentaram um aspecto transparente. As misturas ácido málico: glicose: frutose 1:1:1 (MA: Glu: Fru 1:1:1, Fig. 16b) e ácido láctico: sacarose 1:2 (LA: Suc, 1:2, Fig. 16c) apresentaram uma coloração levemente e intensamente amarelada, respectivamente, enquanto que os demais NADESs sintetizados não apresentaram cor.

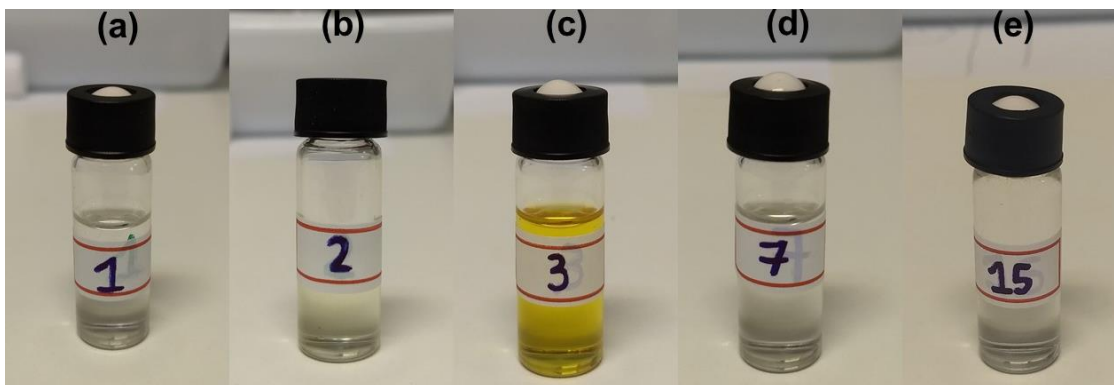


Figura 16: Solventes eutéticos naturais profundos (NADESs) preparados. **(a)** 'MA: Sor 1:1', **(b)** 'MA: Glu: Fru 1:1:1', **(c)** 'LA: Suc 1:2', **(d)** 'ChCl: Glu 1:1', **(e)** 'ChCl: LA 1:3'

Fonte: Fotografado pelo autor

Adicionalmente, a mistura 'ChCl: LA 1:3' necessitou de apenas um ciclo de irradiação por microondas para que se tornasse transparente e completamente homogênea. É importante enfatizar que para tal mistura, tal ciclo de irradiação foi empregado apenas como garantia uma vez que os componentes de partida (juntamente com a água) apresentaram notória miscibilidade entre si e provavelmente formariam uma mistura homogênea mesmo sem irradiação. Isso pode ser majoritariamente justificado pelo elevado caráter higroscópico do cloreto de colina ('ChCl'), um dos componentes de partida da mistura e único componente sólido presente na mesma.

2.4.2 Caracterização dos solventes eutéticos naturais profundos (NADESs): espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho obtidos para cada um dos cinco NADESs sintetizados estão representados na Fig. 17a-e.

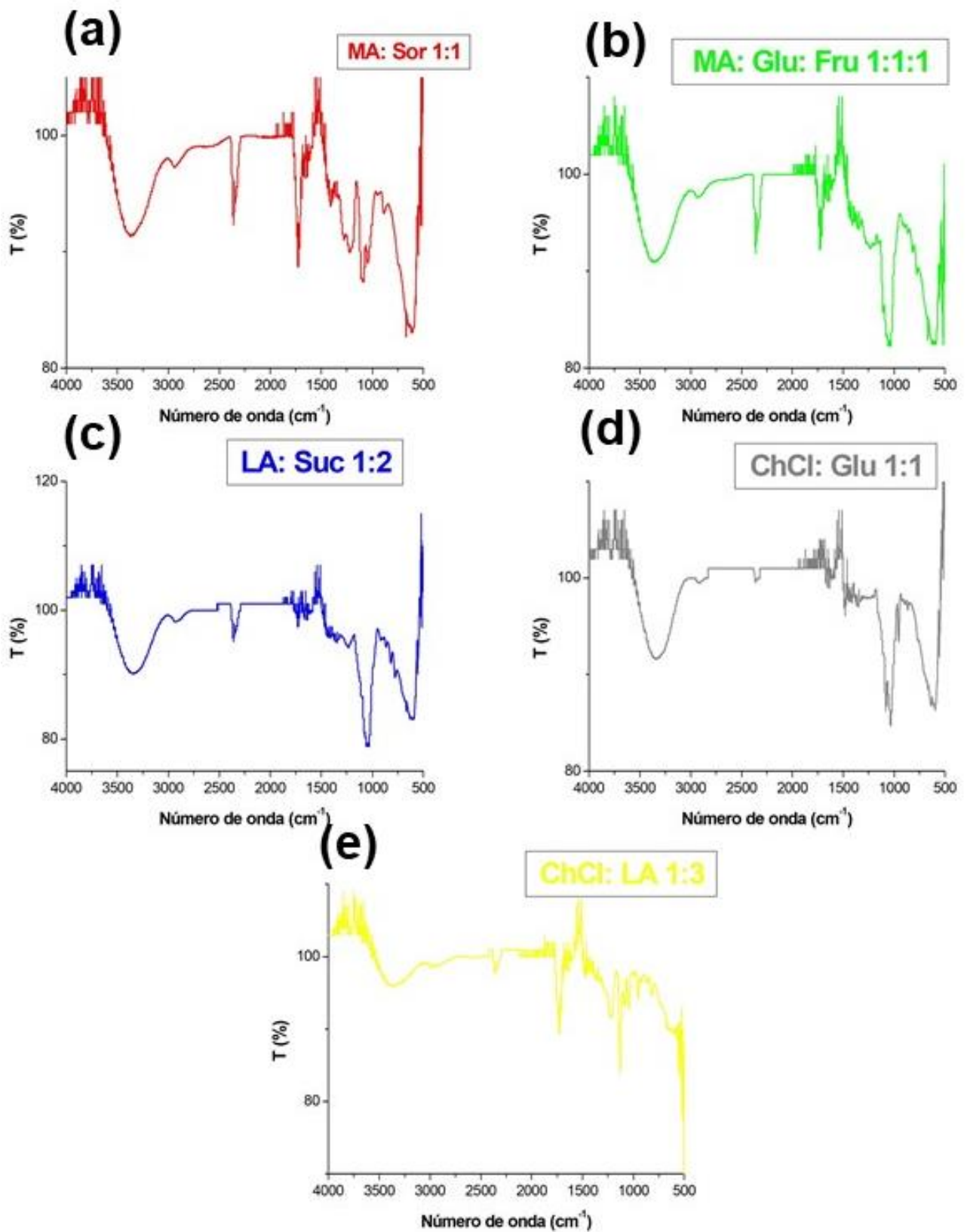


Figura 17: Espectros na região do infravermelho (IV) dos solventes eutéticos naturais profundos sintetizados. (a) 'MA: Sor 1:1', em vermelho; (b) 'MA: Glu: Fru 1:1:1', em verde; (c) 'LA: Suc 1:2', em azul; (d) 'ChCl: Glu 1:1', em cinza; (e) 'ChCl: LA 1:3', em amarelo

Os cinco espectros (Fig 17a-e) apresentam uma banda larga compreendida entre aproximadamente 3200-3700 cm^{-1} que pode ser atribuída ao estiramento da ligação -OH presente na água (Fig 17a-e), glicose (Fig. 17b,d), frutose (Fig. 17b), sacarose (Fig. 17c) e ácido láctico (Fig 17e). As estruturas dos componentes de partida dos NADESs preparados estão apresentados na Figura 18. Bandas próximas a 1400 cm^{-1} e a 1150 cm^{-1} correspondentes ao dobramento de C-O-H e ao estiramento C-O, respectivamente, podem ser visualizadas nos espectros. Bandas próximas a cm^{-1} podem ser relacionadas a grupos éster ou cetona, e bandas próximas a 3000 cm^{-1} , 1500-1350 cm^{-1} e 1250-1150 cm^{-1} podem ser relacionadas ao estiramento e dobramento de ligações C-H, respectivamente. Uma banda próxima a 560 cm^{-1} pode ser atribuída ao dobramento da ligação -OH e bandas próximas a 1030 cm^{-1} e 860 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento C-C-O assimétrico e simétrico, respectivamente. Bandas próximas de 1200 cm^{-1} podem ser atribuídas ao dobramento de C-O-H (PAVIA et al., 2010; DELGADO-MELLADO et al., 2018)

O espectro 17d apresenta bandas próximas a 1450-1500 cm^{-1} que podem ser atribuídas à combinação de bandas de C-C-H e C-O-H, e as bandas intensa próximas a 1000 cm^{-1} se relacionam às vibrações de estiramento das ligações C-O e C-C. Os últimos dois espectros (Fig. 17d,e), obtidos para misturas contendo cloreto de colina como componente de partida, apresentam bandas próximas a 3200 cm^{-1} ou 1100-1200 a 900 cm^{-1} relacionadas a presença de um grupo hidroxila e/ou um grupo nitrogenado em tal composto: como, por exemplo, o estiramento simétrico de ligações C-N⁺ (por volta de 1200-900 cm^{-1}). Bandas entre 3000-2850 cm^{-1} também podem ser atribuídas a grupos alquila. O dobramento de CH₂ entre 1500-1400 cm^{-1} é característico dos NADESs contendo cloreto de colina (PAVIA et al., 2010; DELGADO-MELLADO et al., 2018).

É importante salientar que, ainda que determinados componentes de partida apresentem vários grupos funcionais que potencialmente apresentariam bandas características no espectro na região do infravermelho, tais bandas eventualmente não aparecem principalmente devido à formação da estrutura supramolecular dos NADES (HAYYAN et al., 2015; DELGADO-MELLADO et al., 2018).

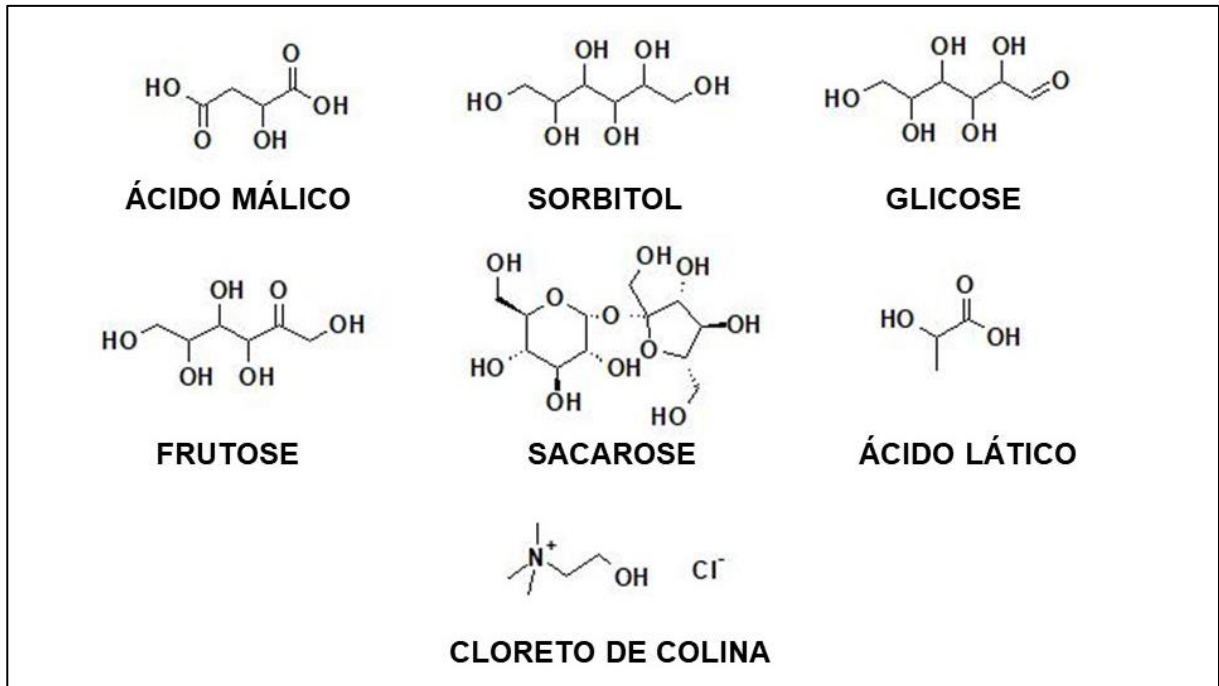


Figura 18: Estrutura dos componentes de partida dos NADESs preparados no presente trabalho

Fonte: Elaborado pelo autor

2.4.3 Triagem: Avaliação da performance dos solventes eutéticos naturais profundos como solventes extratores do metaboloma de *E. uniflora*

Os parâmetros norteadores para se mensurar a performance dos solventes eutéticos sintetizados no que se refere à capacidade de extração dos metabólitos fenólicos presentes nas folhas de pitanga foram (1) a área total dos cromatogramas relativos aos extratos de tais NADESs e (2) o número de picos cromatográficos apresentados por cada cromatograma. Os resultados estão resumidos na tabela 10 e na Figura 19.

Tabela 10: Área total e número de picos apresentados ao se empregar os solventes eutéticos sintetizados como meio extrator em extração assistida a microondas

NADESS	Abreviatura	Área total ^a	Número de picos ^a
Ácido málico: sorbitol 1:1	MA: Sor 1:1	50,27 ± 3,93	27,50 ± 2,50
Ácido málico: glicose: frutose 1:1:1	MA: Glu: Fru 1:1:1	50,92 ± 8,86	26,17 ± 0,29
Ácido láctico: sacarose 1:2	LA: Suc 1:2	53,17 ± 15,02	27,33 ± 2,08
Cloreto de colina: glicose 1:1	ChCl: Glu 1:1	73,27 ± 3,71	31,83 ± 0,76
Cloreto de colina: ácido láctico 1:3	ChCl: LA 1:3	156,78 ± 17,26	35,00 ± 3,04

^a Resultados indicados como média ± desvio padrão (n=3)

A partir dos resultados da *one-way* ANOVA, seguida por Teste de Tukey (a 95% de confiança), foi possível constatar que no que se refere à área total dos cromatogramas, a mistura 'ChCl: LA 1:3', do ponto de vista estatístico, apresentou uma maior performance extratora, apresentando diferença estatística em relação aos outros NADES. Os demais NADESs não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si.

Esse resultado é coerente considerando dois aspectos principais: (1) a mistura 'ChCl: LA 1:3' é muito menos viscosa do que as outras. Assim, ao se utilizar tal mistura como meio extrator em detrimento dos outros solventes mais viscosos, há uma maior viabilização do transporte de massas envolvendo tal NADES e portanto, uma maior capacidade extratora da parte de tal solvente em relação aos outros (PENG et al., 2015; ZAINAL-ABIDIN et al., 2017). Porém, um fator preponderante (e que apresenta sinergia em relação ao fator supracitado no que tange à performance extratora), considerando se tratar de uma matriz complexa, é a polaridade da mistura eutética: Provavelmente a polaridade desse NADES (juntamente com a menor viscosidade, fator também apontado por Qi et al., 2015) possibilitou a sua penetração nas células vegetais com parede lipofílica, de modo que as interações intermoleculares NADES-metabólitos foram mais efetivas do que as interações dos mesmos metabólitos extraídos com a parede da célula vegetal. Eventualmente, o pH reduzido de tal NADES em relação aos outros (considerando que o mesmo tem ácido láctico como componente de partida) também pode ter apresentado influência na capacidade extratora. Além disso (2), há vários trabalhos na literatura que indicam que solventes eutéticos naturais profundos compostos por cloreto de colina e ácido láctico se

notabilizam em termos de capacidade extratora. Wei et al. (2015b) constataram que, de 13 solventes eutéticos naturais profundos investigados (incluindo NADESs à base de açúcares, de modo similar às comparações realizadas no presente trabalho), o NADES composto por cloreto de colina e ácido lático na razão molar 1:2 e com 20% de H₂O apresentou os melhores resultados para a extração assistida a microondas dos flavonoides baicalina, wogonosídeo, baicaleína e wogonina da espécie *Radix scutellariae*. De modo similar, Li et al. (2015) identificaram que uma mistura composta por cloreto de colina e ácido lático e também com 20% de água apresentou a melhor performance extratora para catequinas das folhas da espécie *Camellia sinensis*.

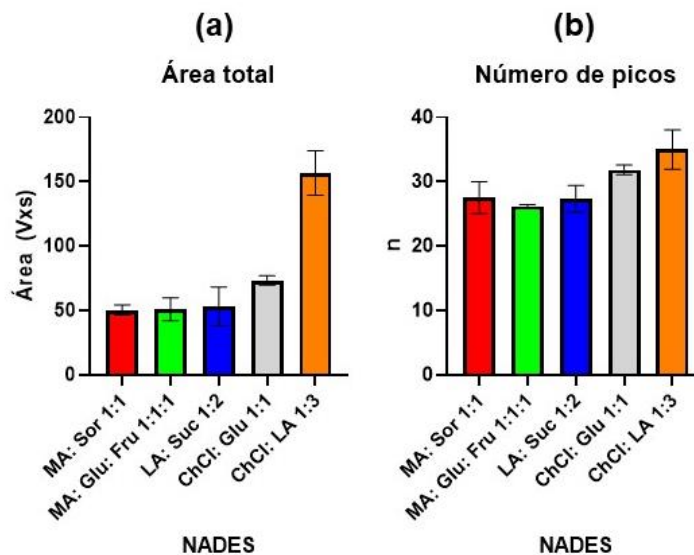


Figura 19: Valores de **(a)** área total de picos (Vxs) e **(b)** número de picos obtidos ao se empregar os solventes eutéticos naturais profundos como meios extratores. Resultados indicados como valor médio \pm desvio padrão (n=3)

O NADES composto por ácido lático e sacarose apresentou um elevado desvio padrão considerando a elevada viscosidade desse solvente eutético. A relação entre elevada viscosidade e variabilidade entre os resultados entre replicatas também foi observado por Fraige et al. (2018). Ainda que o desvio padrão absoluto seja menor em relação ao desvio padrão apresentado pelas replicatas do NADES composto por cloreto de colina e ácido lático, de um ponto de vista comparativo a média de área total apresentado por tal NADES foi bem maior em relação ao composto por ácido lático e sacarose (tão maior que apresentou diferença do ponto de vista estatístico). Em oposição, o NADES composto por ácido lático e sacarose apresentou réplicas

com diferença de aproximadamente 39,3% entre si no que se refere à área total de picos.

No que tange ao número de picos cromatográficos detectados, os NADES formados 'MA: Sor', 'MA: Glu: Fru' e LA: Suc' apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao NADES 'ChCl: LA', o qual, portanto, apresentou maior capacidade de extração da informação química da matriz em relação aos mesmos. De fato, desconsiderando os picos referentes aos NADES e ao bioetanol empregado como fase móvel (indicados com asterisco, vide Fig. 20), as cinco extrações apresentaram perfis cromatográficos qualitativamente similares, com variações apenas nas intensidades e áreas de pico. Assim, considerando que o NADES formado por cloreto de colina e ácido láctico, comparativamente, apresentou de modo geral elevada capacidade de extração da informação química (representada pelo número de picos) e a maior superioridade extratora em relação aos outros NADES (conclusão obtida especificamente dos dados oriundos da área total), a mistura 'ChCl: LA 1:3' foi selecionada como solvente de trabalho e empregada nas etapas subsequentes de otimização multivariada da extração assistida a microondas.

No que se refere especificamente à etapa de triagem, a temperatura foi fixada em 50°C porque, de modo coerente, Funari et al. (2019) indicaram que extrações à base de NADES à temperatura ambiente apresentam uma baixa eficiência e, por isso, as extrações precisam ser levemente aquecidas. A porcentagem de água em massa nos solventes eutéticos foi fixada em 20% (m/m) tanto na fase de triagem quanto nas otimizações subsequentes considerando dados prévios da literatura. Além de os trabalhos supracitados de Wei et al. (2015b) e Li et al. (2015) terem apresentado resultados satisfatórios com misturas contendo tal quantidade de água nos NADES avaliados, Fraige et al. (2018) constataram que, por exemplo, uma mistura de cloreto de colina e glicerol na razão molar 1:1 contendo essa mesma quantidade de água apresentou uma maior eficiência extratora para metabólitos secundários de *Byrsonima intermedia* em relação à mesma mistura porém com apenas 10% de água. Além disso, Wei et al. (2015a) também identificaram elevada capacidade extratora de metabólitos de distintas polaridades para um NADES composto por cloreto de colina e maltose contendo 20% de água. Assim, é provável que a adição de 20% de água aos componentes de partida dos NADES para sua síntese seja uma quantidade que reduz a viscosidade dos NADES propiciando melhores extrações e simultaneamente

mantém a estrutura supramolecular de tais solventes eutéticos (FRAIGE et al., 2018; DAI et al., 2015; BONACCI et al., 2020).

Alguns artigos revelam que quando a água é adicionada em quantidades elevadas, ela pode atuar como um anti-solvente e romper a estrutura supramolecular dos NADES (DAI et al., 2015; PISANO et al., 2015).

Os cromatogramas representativos das extrações assistidas a microondas empregando as misturas supracitadas estão indicados na figura 20.

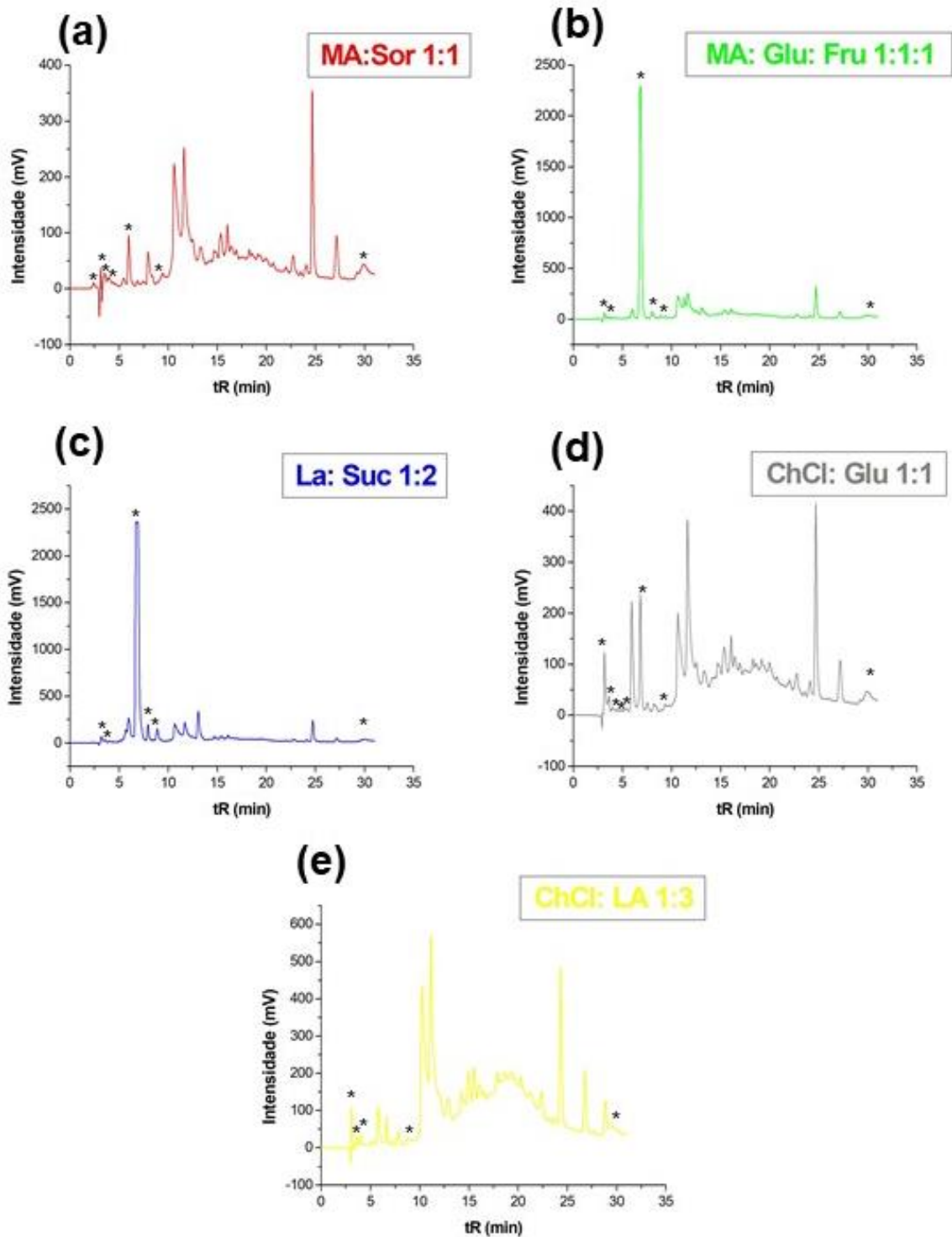


Figura 20: Cromatogramas obtidos para as extrações realizadas com (a) 'MA: Sor 1:1', em vermelho; (b) 'MA: Glu: Fru 1:1:1', em verde; (c) 'LA: Suc 1:2', em azul; (d) 'ChCl: Glu 1:1', em cinza; (e) 'ChCl: LA 1:3', em amarelo. Para condições cromatográficas, vide Seção 2.3.6.

Picos indicados com o asterisco referentes a sinais detectados no tempo morto, a impurezas do bioetanol empregado como fase móvel e até mesmo ao solvente eutético natural profundo, foram desconsiderados no cômputo dos valores médios da área total e do número de picos.

2.4.4 Otimização da extração através Planejamento Composto Central (CCD) e comparação com sistema solvente de referência

As condições para as extrações assistidas a microondas, bem como as respostas obtidas para cada experimento em um Planejamento Composto Central estão dispostas na Tabela 11, e cromatogramas representativos de cada experimento estão indicados nas Figuras 21 e 22.

Tabela 11: Valores codificados (e reais) para as variáveis estudadas no Planejamento Composto Central (CCD) e respectivas respostas obtidas

Exp.	Variáveis independentes			Respostas					
	X ₁ ^a	X ₂ ^a	X ₃ ^a	Área total (V·s) ^b	Pico a (V·s) ^b	Pico b (V·s) ^b	Pico c (V·s) ^b	Pico d (V·s) ^b	D ^c
1	-1 (0,0261:1)	-1 (11,919 min)	-1 (38 °C)	55,16	4,70	6,44	4,63	2,31	0,00
2	+1 (0,0439:1)	-1 (11,919 min)	-1 (38 °C)	88,17	8,57	11,51	7,33	3,44	0,45
3	-1 (0,0261:1)	+1 (38,081 min)	-1 (38 °C)	66,68	5,98	8,14	5,62	2,83	0,15
4	+1 (0,0439:1)	+1 (38,081 min)	-1 (38 °C)	112,57	10,46	14,11	9,60	4,54	0,79
5	-1 (0,0261:1)	-1 (11,919 min)	+1 (48 °C)	90,63	6,25	8,14	3,40	2,17	0,10
6	+1 (0,0439:1)	-1 (11,919 min)	+1 (48 °C)	145,17	7,67	13,61	4,39	1,87	0,00
7	-1 (0,0261:1)	+1 (38,081 min)	+1 (48 °C)	86,84	6,29	8,09	3,31	2,08	0,00
8	+1 (0,0439:1)	+1 (38,081 min)	+1 (48 °C)	152,06	9,16	14,57	4,57	2,27	0,47
9	-α ^d (0,02:1)	0 (25 min)	0 (43 °C)	56,10	4,64	6,37	4,45	2,22	0,00
10	+α ^d (0,05:1)	0 (25 min)	0 (43 °C)	141,51	10,75	14,08	6,46	3,73	0,76
11	0 (0,035:1)	-α ^d (3 min)	0 (43 °C)	65,26	5,93	8,02	5,38	2,63	0,13
12	0 (0,035:1)	+α ^d (47 min)	0 (43 °C)	90,42	7,85	11,11	5,92	3,02	0,37
13	0 (0,035:1)	0 (25 min)	-α ^f (35 °C)	69,73	6,33	8,48	5,75	2,94	0,19
14	0 (0,035:1)	0 (25 min)	+α ^f (51 °C)	117,72	8,05	11,57	3,65	2,02	0,21
PC ^e	0 (0,035:1)	0 (25 min)	0 (43 °C)	97,75 ± 9,71	8,50 ± 0,68	11,26 ± 0,96	6,57 ± 0,47	3,42 ± 0,26	0,46 ± 0,08

^a X₁ (Razão de material vegetal: NADES, m/m); X₂ (Tempo de extração, min); X₃ (Temperatura, °C).

^b Valores médios para injeções em triplicata (20 µL de cada amostra no sistema CLAE).

^c Desejabilidade Global (D) no que tange aos valores de desejabilidades individuais (d_i, baseados nos maiores e menores valores obtidos no CCD) para área total e área de picos representativos e/ou potenciais marcadores químicos de *E. uniflora*. Valores de d_i em relação à área total têm peso 2 e valores das 4 outras variáveis dependentes têm peso 1. D envolve a média geométrica das cinco resposta avaliadas. Valores aproximados para D com duas casas decimais.

^d ±α = ±1,68179.

^e Pontos centrais. Resultados mostrados como média ± desvio padrão (n=5).

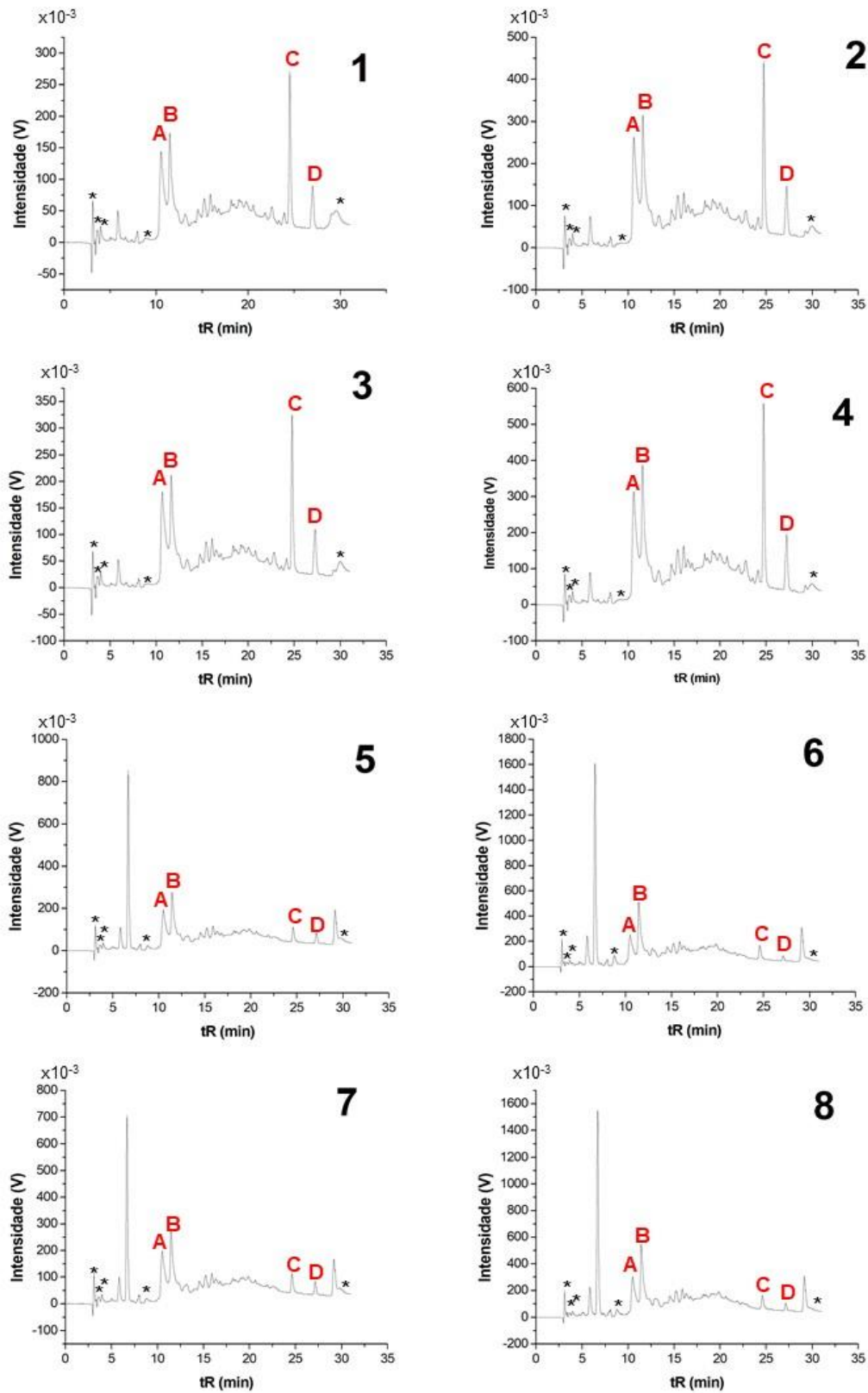


Figura 21: Cromatogramas 1 a 8 do Planejamento Composto Central. Para condições cromatográficas, vide seção 2.3.6. Picos oriundos do tempo morto, da mistura eutética ou do bioetanol empregados como meio extrator e/ou componente de fase móvel (destacados com asterisco) foram desconsiderados.

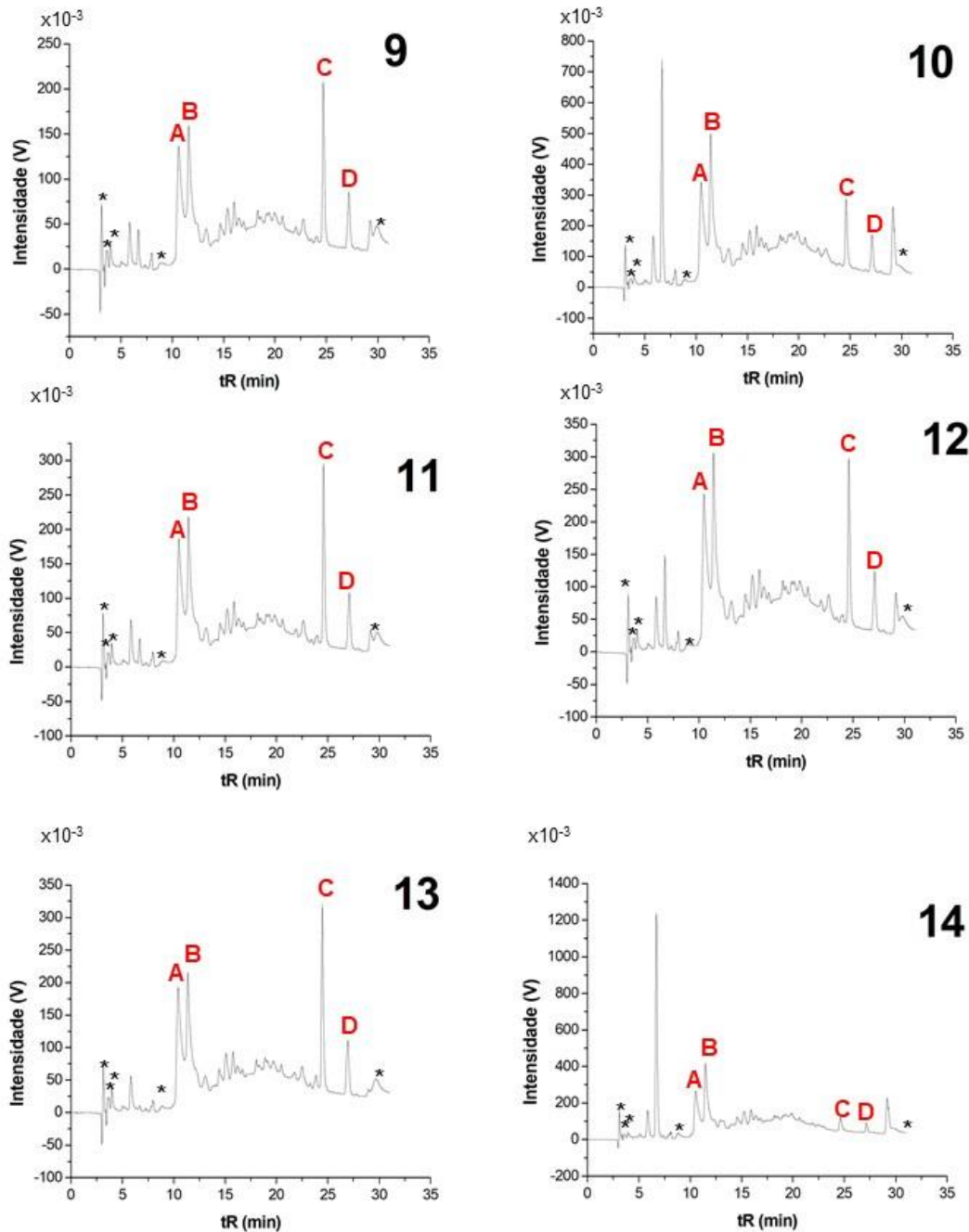


Figura 22: Cromatogramas 9 a 14 do Planejamento Composto Central. Cromatogramas do ponto central foram omitidos; realizados apenas para cômputo dos erros. Para condições cromatográficas veja seção 2.3.6. Picos oriundos do tempo morto, da mistura eutética ou do bioetanol empregados como meio extrator e/ou componente de fase móvel (destacados com asterisco) foram desconsiderados.

A partir do Planejamento Composto Central realizado, foi possível estimar um modelo matemático polinomial que correlaciona os termos de interesse com a desejabilidade global (D). O modelo recalculado, após a eliminação dos termos não significativos e a 95% de confiança, é representado pela seguinte expressão:

$$D = 0,433_{(\pm 0,093)} + 0,200_{(\pm 0,068)} x_1 + 0,093_{(\pm 0,068)} x_2 + 0,096_{(\pm 0,089)} x_1 x_2 - 0,090_{(\pm 0,089)} x_1 x_3 - 0,074_{(\pm 0,067)} x_2^2 - 0,092_{(\pm 0,067)} x_3^2 \quad (\text{Eq. 11}).$$

A Análise de Variância (ANOVA, Tabela 12) para o modelo estimado indicou que a equação apresenta regressão significativa, visto que o valor de F calculado (aproximadamente 12,17) é cerca de 4,06 vezes maior que o valor de F tabelado (aproximadamente 3,00; com 6 e 12 graus de liberdade a 95% de nível de confiança). Adicionalmente, o modelo não apresentou falta de ajuste, considerando que o valor de F calculado (aproximadamente 2,50) é menor que o valor F tabelado (aproximadamente 6,04). Além disso, o modelo apresenta um elevado coeficiente de determinação ($R^2 = 0,86$). Desse modo, o modelo pode ser empregado para realizar previsões (MONTGOMERY, 2017; PEREIRA-FILHO, 2015).

Tabela 12: Análise de Variância (ANOVA) para o modelo estimado (Eq. 11) através do Planejamento Composto Central (CCD) correlacionando os termos significativos com a Desejabilidade Global (D)

Tabela ANOVA			Testes F (95% de confiança)	
Fonte de variação	GL	MQ	F calculado	F tabelado
SQR	0,98	6	0,16	
SQr	0,16	12	0,01	12,17
SQT	1,14	18		3,00
R ²	0,86			
EP	0,03	4	0,01	
FAj	0,13	8	0,02	2,50
				6,04

SQR, Soma Quadrática de Regressão; SQr, Soma Quadrática dos Resíduos; SQT, Soma Quadrática Total; R², Coeficiente de Determinação; EP, Erro Puro; FAj, Falta de Ajuste; GL, Graus de Liberdade; MQ, Média Quadrática

Superfícies de respostas foram plotadas para o modelo multivariado estimado (Figura 23). Através da sua visualização, acoplado ao emprego da ferramenta Solver, presente no Microsoft Excel (Microsoft, EUA) foi possível elucidar as condições ótimas para a extração assistida a microondas com emprego de 'ChCl: LA 1:3' como meio

extrator. A metodologia de superfície e resposta e a ferramenta Solver indicaram que as condições ótimas para extração são obtidas quando os níveis das variáveis X_1 , X_2 e X_3 (vide Tabela 11) são estabelecidos em 1,68179, 1,68179 e -0,82420, respectivamente, níveis que correspondem aos valores experimentais de 0,05:1 de razão material vegetal/ NADES (X_1), 47 minutos de irradiação com microondas a 800W (X_2) e 39°C de temperatura (X_3), o que forneceria o valor teórico de 1,049 para a Desejabilidade Global (D).

Tal condição foi testada em laboratório. O valor real de desejabilidade global obtido foi de $0,88 \pm 0,05$ ($n=3$). O valor médio é maior do que o maior valor de desejabilidade originalmente obtido no Planejamento Composto Central (Tabela 11, experimento 4), o que indica que a otimização foi bem sucedida e uma condição experimental ótima de fato foi obtida. Um cromatograma representativo da condição ótima está representado na Figura 24a.

A condição experimental ótima obtida (Fig. 25) é coerente considerando as respostas originais do CCD: Com os valores de Desejabilidade Global (D) obtidos para os experimentos 4 e 10, por exemplo, foi possível constatar que quanto maior a razão material vegetal: NADES (m/m, X_1), maior a resposta obtida e, por consequência, maior é o rendimento extrator tanto sob uma perspectiva não-direcionada (no que diz respeito à resposta 'área total') ou considerando metabólitos alvo (no que diz respeito às áreas dos picos A,B,C e D). Também, foi possível perceber que um maior tempo de irradiação (X_2) propicia ou viabiliza equilíbrios e transferência de massa envolvendo o solvente extrator e o material vegetal, aumentando a extração. Tempos maiores garantem a completude da extração, e isso é coerente com os resultados de Bajkacz e Adamek (2018), que constataram que tempos maiores de extração empregando o solvente eutético natural profundo cloreto de colina: ácido láctico na razão molar 2:1 (contendo 30% de água) propiciaram maior rendimento de polifenóis.

Em oposição às variáveis X_1 e X_2 , valores maiores de Desejabilidade Global são obtidos quando a temperatura de extração (X_3) é estabelecida em níveis reduzidos. Isso ocorre porque, de modo similar ao que foi comentado anteriormente, maiores valores de temperatura reduzem as áreas dos picos C e D e aumentam a área de um pico eluído a 6 minutos (vide experimentos 5 a 8 do CCD), o que reduz globalmente o valor de Desejabilidade Global. Isso ocorre porque provavelmente

valores maiores de temperatura viabilizam a hidrólise de metabólitos de polaridade mais reduzida. Assim, ainda que temperaturas mais elevadas favoreçam a redução da viscosidade do NADES, o aumento da difusividade e a remoção dos metabólitos da matriz vegetal (BAJKACZ e ADAMEK, 2018), a redução que o mesmo fenômeno propicia nas áreas dos picos C e D fazem com que as condições experimentais ótimas envolvam uma temperatura próxima à ambiente.

A capacidade extratora e o aspecto verde da mistura 'ChCl: LA 1:3' foram comparados com aspectos idênticos concernentes à mistura EtOH: H₂O 7:3 (v/v, n=3), um sistema solvente apropriado para ser adotado como referência para fins de comparação. As condições extratoras empregando a solução hidroalcoólica foram idênticas às do ponto ótimo realizado com o NADES composto por cloreto de colina e ácido láctico (Fig. 24b).

Para estabelecer as comparações entre ambos os sistemas solvente, inicialmente foram avaliados (1) a área total dos cromatogramas resultantes da extração com cada uma das misturas e (2) o impacto ambiental de cada mistura, avaliada através da métrica HPLC *Environmental Assessment Tool* (HPLC-EAT; GABER et al., 2011). Adicionalmente, empregou-se uma métrica híbrida para se avaliar a capacidade extratora e o impacto ambiental de ambas as soluções extratoras a partir de uma perspectiva holística (de modo análogo às métricas n/EAT e GCFR/EAT empregadas para desenvolvimento de métodos cromatográficos ambientalmente amigáveis, vide FUNARI et al., 2014; FUNARI et al., 2015). Um cromatograma representativo da extração empregando a solução hidroalcoólica está indicado na Figura 24b e os resultados relacionados à capacidade extratora e impacto ambiental de cada mistura estão resumidos na Tabela 13.

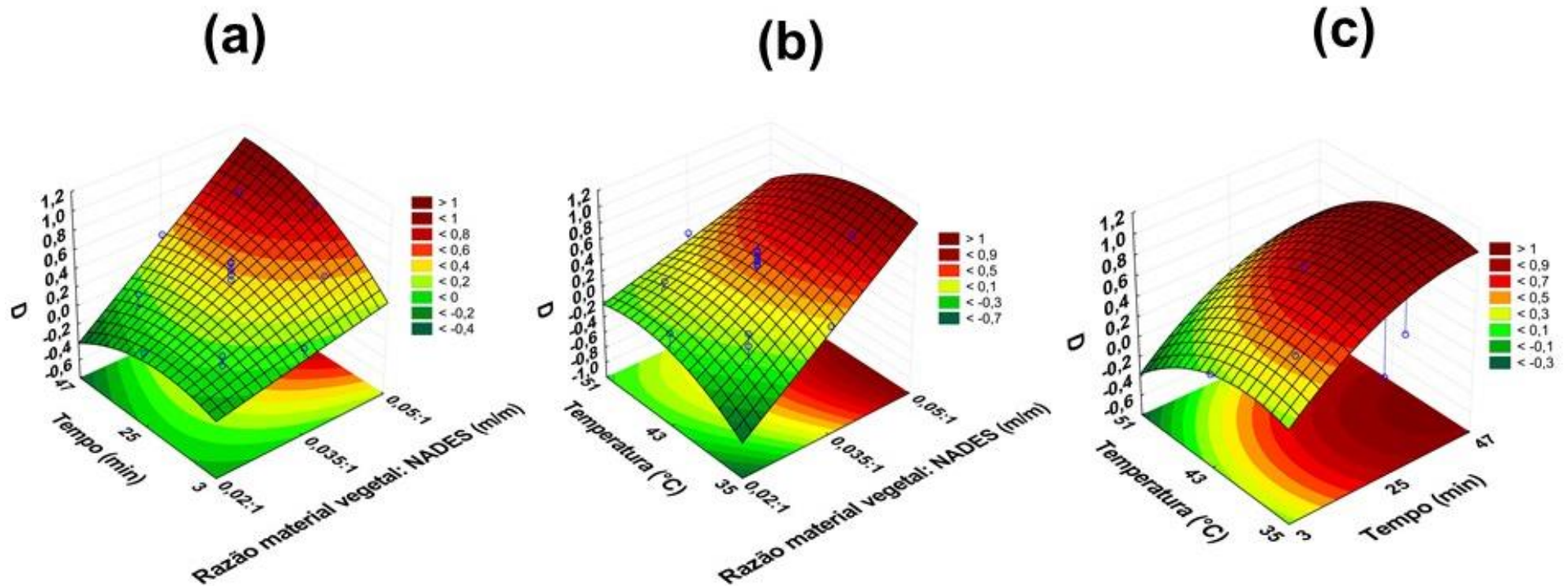


Figura 23: Superfícies de resposta obtidas para o modelo polinomial (Eq. 11) estimado a partir do Planejamento Composto Central (CCD). **(a)** D versus tempo (min, X_2), razão material vegetal/NADES (m/m, X_1); temperatura fixada em $-0,82420$ (39°C , X_3), **(b)** D versus temperatura ($^\circ\text{C}$, X_3), razão material vegetal/NADES (m/m, X_1); tempo fixado em $1,68179$ (47 min, X_2), **(c)** D versus temperatura ($^\circ\text{C}$, X_3), Tempo (min, X_2); razão material vegetal/NADES (m/m, X_1) fixada em $1,68179$ ($0,05:1$, m/m).

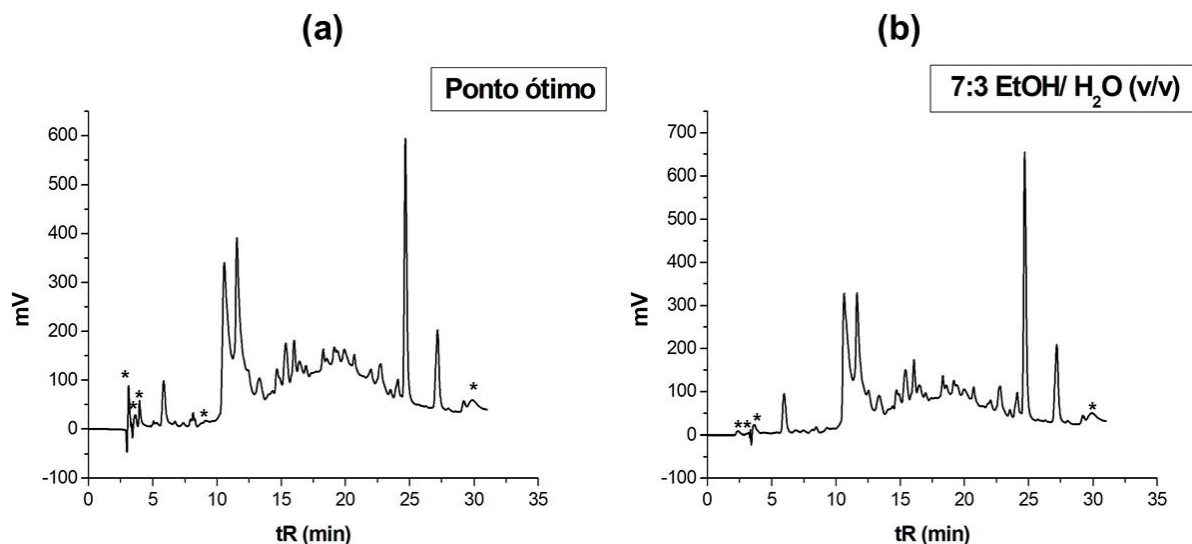


Figura 24: Cromatogramas obtidos a partir das extrações assistidas a microondas nas condições ótimas determinadas pelo Planejamento Composto Central nas misturas extratoras **(a)** ChCl + LA 1:3 (+20% H₂O m/m) e **(b)** EtOH/ H₂O 7:3 (v/v). Picos oriundos da mistura eutética ou do bioetanol empregados como meio extrator e/ou componente de fase móvel (destacados com asterisco) foram desconsiderados



Figura 25: Rampa de aquecimento e método ótimo (fotografados pelo autor) para extração assistida a microondas no visor do equipamento empregado para extração

A partir dos dados da Tabela 6 foi possível realizar um teste T de Student a 95% de confiança possibilitando comparar estatisticamente a área total e o score área total/EAT apresentados por ambas as soluções extratoras.

Tabela 13: Comparação entre a capacidade extratora, impacto ambiental e performance holística do solvente eutético natural 'ChCl + LA 1:3' e a mistura de referência composta por EtOH e H₂O na proporção 7:3 (v/v)

Mistura Extratora	Área total (Vxs)	HPLC-EAT ^a				Área total/EAT
		S ^{a,b}	H ^{a,b}	E ^{a,b}	Total ^{a,c}	
ChCl + LA 1:3 (+20% H ₂ O m/m)	119,61 ± 1,50	0,787	0,275	0,237	1,299	92,11 ± 1,15
EtOH/ H ₂ O (7:3, v/v) ^d	92,26 ± 1,39	1,212	0,132	0,314	1,658	55,63 ± 0,84

Resultados apresentados como media ± desvio padrão (n=3)

^a HPLC *Environmental Assessment Tool* (Gaber et al., 2011) . O resultado não leva em consideração as análises cromatográficas subsequentes à extração.

^b Valores oriundos do trabalho original de Gaber et al. (2011) Sutton et al. (2018) e/ou da *OECD Existing Chemicals Database* (OECD Secretariat, 2017) considerando a quantidade *real* de componente de partida (descontando a impureza)

^c Score total considerando 1g da solução extratora (vide Eq.3). No caso da mistura 'ChCl + LA 1:3' , 20% de H₂O na síntese do solvente extrator foram empregados nas razões envolvendo as massas dos componentes de partida para o cômputo dos parâmetros de saúde, segurança e impacto ambiental ^d

Densidade (e massa) da solução extratora mensurados a partir de valores de densidade do etanol e da água a 25° C (0,785 e 0,997 g cm⁻³, respectivamente, vide LIDE, 2006)

Considerando os valores obtidos para o score área total/ EAT, um teste T de Student a 95% de confiança indicou que a metodologia empregando ChCl + LA 1:3 (+20% H₂O m/m) apresenta, do ponto de vista estatístico, uma melhor performance extratora e simultaneamente apresenta um menor impacto ambiental.

É importante salientar que, no que se refere aos parâmetros de segurança (S), saúde (H) e impacto ambiental (E) atribuídos à mistura 'ChCl: LA 1:3, os mesmos não estão disponíveis na versão original da métrica desenvolvida por Gaber et al. (2011). Eles foram obtidos a partir de dados oriundos de Sutton et al. (2018) e *Organization for Economic Co-operation and Development (OECD)*. Considerando que os NADES nem sempre são alvos de estudos toxicológicos e dados confiáveis que tangem a tais

materiais nem sempre estão prontamente disponíveis, os valores mais impactantes concernentes aos componentes de partida da mistura escolhida para otimização da extração assistida a microondas no presente trabalho (i.e., cloreto de colina e ácido láctico) foram escolhidos para elucidação e determinação dos *scores* para S, H e E. Assim, pode ser que o impacto causado por tal mistura eutética (e, portanto, o valor de EAT) esteja superestimado (SUTTON et al., 2018).

Paralelamente, os *scores* S, H e E para a mistura hidroalcoólica empregada como solvente de referência muito provavelmente também estão superestimados, considerando que o etanol empregado em tal etapa específica é o etanol grau alimentício, oriundo da biomassa. Porém, os *scores* atribuídos a tal mistura tem como base o etanol grau HPLC, de origem petroquímica (obtido através da hidratação do eteno; uma via muito mais impactante do que a fermentação de cereais, rota mais sustentável empregada para obtenção do bioetanol; FUNARI et al., 2016; SUTTON et al., 2018). Ainda assim, tais *scores* permitem uma comparação minimamente razoável entre os meios extratores supracitados.

2.4.5 AGREE: Analytical GREEness Calculator

Alternativamente, por meio da métrica *Analytical GREEness Calculator* (AGREE; PENA-PEREIRA, WOJNOWSKI, TOBISZEWSKI, 2020) estabeleceu-se uma comparação entre o impacto ambiental gerado a partir da metodologia extratora otimizada empregando o NADES à base de cloreto de colina e ácido láctico e a mesma empregando solução hidroalcoólica como referência (EtOH/ H₂O 7:3, v/v). Os parâmetros de entrada para cada um dos sistemas solvente estão representados na tabela 14.

Tabela 14: Parâmetros de entrada no *software* da métrica AGREE para cálculo do *score* referente às extrações empregando como solvente 'ChCl: LA 1:3' e 'EtOH/H₂O 7:3 (v/v)'

Parâmetros de entrada (AGREE)			
ChCl: LA 1:3 (+ 20% H₂O m/m)		EtOH/ H₂O 7:3 (v/v)	
Princípio	Parâmetro	Princípio	Parâmetro
1	Off-line analysis	1	Off-line analysis
2	1g	2	1g
3	Off-line	3	Off-line
4	4	4	4
5	Manual/ not miniaturized	5	Manual/ not miniaturized
6	-	6	-
7^a	0.52	7^b	0.65
8	36/1	8	36/1
9	Microwave-assisted extraction	9	Microwave-assisted extraction
10	All reagents are biobased	10	All reagents are biobased
11	No	11	No
12	Corrosive	12	Highly flammable

^a Massa aproximada de ácido láctico presente em 1g de NADES 'ChCl: LA 1:3' (+ 20% H₂O em massa considerando a pureza dos componentes)

^b Massa aproximada de etanol presente em 1g de solução de EtOH/H₂O 7:3 (v/v, considerando densidade de EtOH e H₂O como 0,785g cm⁻³ e 0,997 gcm⁻³, respectivamente; LIDE, 2006)

Ao contrário do capítulo 1, nesta etapa optou-se em comparar a massa de componente e/ou solvente problemático para facilidade dos cálculos, considerando que há componentes sólidos ou muito viscosos envolvidos e que a métrica permite tal opção. A partir dos dados de entrada inseridos para as extrações envolvendo ambos os solventes, foram obtidos o mesmo *score* de 0,65 (vide pictogramas gerados pelo *software da métrica*; Figuras 26a,b). Essencialmente, ambas as metodologias extratoras sofreram penalização (1) pela ausência de ensaios *in situ* e/ou a total automatização e miniaturização do processo de extração (contrariando princípios 3 e 5 da Química Analítica Verde, destacados em vermelho) e (2) pelo emprego da técnicas analíticas indiretas para as quais o preparo de amostra é mandatário (contrariando princípio 1 da Química Analítica verde, em amarelo) e pelo uso de uma técnica de extração que emprega uma quantidade relevante de energia (a irradiação via microondas emprega, *segundo os dados e a referência original da métrica*; entre 0,1 e 1,5 kWh por amostra; contrariando parcialmente o princípio 9 da Química Analítica Verde; GALUSZKA et al., 2013; PENA-PEREIRA, WOJNOWSKI, TOBISZEWSKI, 2020).

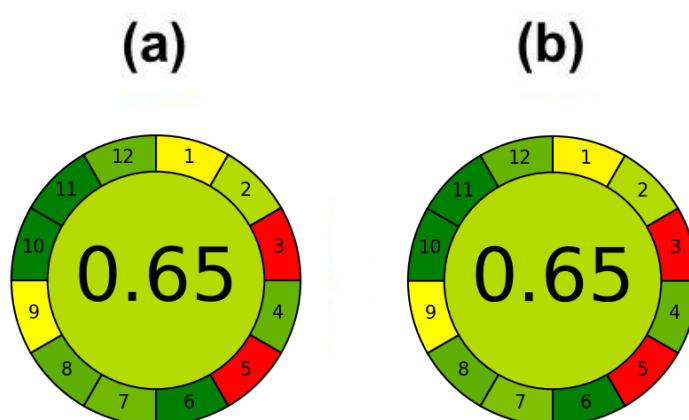


Figura 26: Scores obtidos na métrica AGREE para as metodologias extratoras envolvendo (a) 'ChCl: LA 1:3' e (b) EtOH/ H₂O 7:3 (v/v)

Entretanto, é interessante notar que o *score* permanece próximo de 1 apesar das desvantagens supracitadas. Isso ocorre principalmente devido à consonância que as metodologias extratoras apresentam com os princípios 6, 10 e 11 da Química Analítica Verde (destacados em verde nas Figs. 26a,b), visto que as extrações não empregaram derivação e reagentes de origem renovável foram empregados. Os

princípios 2,4, 7, 8 e 12 também foram aplicados parcial ou totalmente, visto que o tamanho da amostra foi minimizado quando possível, apenas 4 etapas foram envolvidas na obtenção da amostra a ser analisada (extração, centrifugação, diluição e filtração), uma quantidade reduzida de resíduos perigosos foi gerada, o valor médio de 36 picos cromatográficos foram mensurados a partir das extrações representativas envolvendo ambas as soluções extratoras (de modo que uma metodologia 'multi-analito' foi envolvida) e a segurança do analista foi majoritariamente garantida considerando que as substâncias empregadas no processo apresentavam toxicidade e riscos reduzidos.

Considerando que o *score* é o mesmo para ambos os solventes e a extração empregando NADES apresentou uma maior capacidade extratora, pode-se considerar que a extração envolvendo 'ChCl LA 1:3' apresenta uma maior performance sob uma perspectiva global (i.e., considerando parâmetros analíticos e ambientais). Além disso, é importante destacar que a métrica AGREE apresentou uma diferença relativa no que tange ao *score* envolvendo a métrica HPLC-EAT (o que, sob uma perspectiva global, resultou em um impacto idêntico envolvendo as extrações para ambas as soluções extratoras) porque a métrica AGREE leva em consideração aspectos como o consumo de energia e a eficiência, enquanto que a métrica HPLC-EAT avalia essencialmente o risco associado aos solventes empregados na extração. É importante salientar que o cálculo do *score* principalmente no que se refere ao estabelecimento de comparações entre metodologias deve envolver vários critérios e às vezes pode apresentar um caráter subjetivo dependendo dos objetivos do experimentador.

2.4.6 Princípios da Extração Verde aplicados

Dos 6 Princípios da Extração Verde estabelecidos por Chemat, Vian e Cravotto (2012), foi possível a aplicação de 4 princípios através da extração assistida a microondas empregando NADES como meio extrator. Através do uso de componentes de partida dos NADES que são metabólitos primários de plantas, foi possível aplicar o princípio número 1. Além disso, o uso de solventes alternativos (a exemplo do solvente eutético empregado) possibilitaram a aplicação do princípio 2. Resíduos perigosos não foram gerados, viabilizando a aplicação do princípio 4, e um extrato biodegradável com a ausência de contaminantes foi obtido, permitindo a aplicação do princípio 6.

2.5 CONCLUSÃO

O presente capítulo apresentou uma alternativa otimizada, eficiente e de impacto ambiental reduzido para extração dos compostos bioativos das folhas de pitanga. De acordo com os parâmetros analíticos e métricas apropriadas, foi possível constatar que a metodologia desenvolvida apresenta um impacto ambiental reduzido e uma eficiência extratora elevada.

O solvente eutético natural profundo cloreto de colina: ácido láctico 1:3 (contendo 20% de água) apresenta fácil preparação, viscosidade reduzida e pode ser um substituto apropriado de solventes de referência, a exemplo da solução hidroalcoólica de EtOH/H₂O 7:3 (v/v), frequentemente empregada para extração do metaboloma das folhas da espécie vegetal em questão. A abordagem multiparamétrica empregada para otimização das condições de extração permitiram, sob uma perspectiva global, a obtenção de uma condição ótima que possibilita a extração satisfatória dos metabólitos de polaridades distintas e ao mesmo tempo a extração elevada de compostos representativos que potencialmente possam ser marcadores da espécie vegetal.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos no presente trabalho propõem uma mudança paradigmática no que diz respeito ao conceito de eficiência em processos envolvidos em estudos metabolômicos de matrizes vegetais complexas. Desconsiderar aspectos envolvendo sustentabilidade no estudo e exploração racional de plantas medicinais e focar exclusivamente na eficiência do processo se mostra uma ideia anacrônica e contraditória. Solventes alternativos como bioetanol e NADESs abrem a possibilidade de processos mais seguros, ambientalmente amigáveis, baratos e eficientes em comparação com solventes tradicionais. A adoção de abordagens multiparamétricas possibilitam a economia de tempo e recursos e estabelece um compromisso com um conceito de eficiência que contempla conceitos e ideias da Química Analítica Verde, da bioeconomia, e portanto, das demandas do mundo atual, no qual a adoção de práticas seguras, sustentáveis e eficientes é urgente.

As metodologias desenvolvidas e otimizadas neste trabalho podem ser prontamente aplicadas para controle de qualidade da pitanga e seus derivados e abrem caminho para que o setor industrial, a academia e instituições regulatórias revejam conceitos e valorizem processos eficientes mas que sobretudo considerem parâmetros ambientais.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, A.P. et al. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 29, p. 9142-9147, 2004.

ABBOTT, A.P. et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical Communications**, n. 1, p. 70-71, 2003.

ABBOTT, A.P. et al. The effect of additives on zinc electrodeposition from deep eutectic solvents. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 14, p. 5272-5279, 2011.

ABBOTT, A.P.; HARRIS, R.C.; RYDER, K. S. Application of hole theory to define ionic liquids by their transport properties. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 18, p. 4910-4913, 2007.

ABDUL HADI, N. et al. Performance of choline-based deep eutectic solvents in the extraction of tocots from crude palm oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 92, n. 11-12, p. 1709-1716, 2015.

ALAERTS, G. et al. Recent developments in chromatographic fingerprints from herbal products: set-up and data analysis. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 13, n. 10, p. 900-922, 2010.

ANASTAS, P., EGHBALI, N. Green Chemistry: principles and practice. **Chemical Society Reviews**, v.39, n.1, pp. 301-312, 2010.

ANASTAS, P.T., WARNER, J.C. **Green Chemistry: Theory and Practice**, Oxford: Oxford University Press, 1998.

ARAI, I. et al. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, n. 1-3, p. 307-314, 1999.

ASSUNÇÃO, P.I.D. et al. Development and Validation of a HPLC-UV Method for the Evaluation of Ellagic Acid in Liquid Extracts of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) Leaves and Its Ultrasound-Assisted Extraction Optimization. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2017, pp.1-9, 2017.

BAGETTI, M. et al. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Food Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 147-154, 2011.

BAJKACZ, S.; ADAMEK, J. Development of a method based on natural deep eutectic solvents for extraction of flavonoids from food samples. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 5, p. 1330-1344, 2018.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E., **Como Fazer Experimentos: Pesquisa E Desenvolvimento Na Ciencia E Na Industria**, Bookman, Porto Alegre, 2010.

BEZERRA, J.E.F.. Comportamento da pitangueira (*Eugenia uniflora* L) sob irrigação na região do vale do rio Moxotó, Pernambuco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 177-179, 2004.

BONACCI, S. et al. Natural Deep Eutectic Solvent as Extraction Media for the Main Phenolic Compounds from Olive Oil Processing Wastes. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 513, 2020.

BREITKREITZ, M.C., JARDIM, I.C.S.F., BRUNS, R.E. Combined column–mobile phase mixture statistical design optimization of high-performance liquid chromatographic analysis of multicomponent systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 9, p. 1439-1449, 2009.

BUBALO, M.C. et al. Green solvents for green technologies. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 90, n. 9, p. 1631-1639, 2015.

CASTRO, V.I.B. et al. Natural deep eutectic systems as alternative nontoxic cryoprotective agents. **Cryobiology**, v. 83, p. 15-26, 2018.

CELLI, G. B., PEREIRA-NETTO, A.B., BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**, v. 44, p.2442-2451, 2011.

CHEMAT, F.; VIAN, M.A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8615-8627, 2012.

CHOI, Y. H. et al. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? **Plant Physiology**, v. 156, n. 4, p. 1701–1705, 2011.

CHRIST, A.P. et al. Development and validation of a stability-indication LC-UV method for determination of daptomycin injectable form and kinetic study in alkaline medium. **Analytical Methods**, v. 6, n. 4, p. 1242-1247, 2014.

CONSOLINI, A.E.; BALDINI, O.A.N.; AMAT, A.G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 33-39, 1999.

DAI, Y. et al. Natural deep eutectic solvents as New Potential Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 6272-6278, 2013b.

DAI, et al. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. **Food Chemistry**, v. 187, p. 14-19, 2015.

DAI, Y., et al. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p.61-68, 2013a.

DELGADO-MELLADO, N. et al. Thermal stability of choline chloride deep eutectic solvents by TGA/FTIR-ATR analysis. **Journal of Molecular Liquids**, v. 260, p. 37-43, 2018.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

DURAND, E.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. From green chemistry to nature: the versatile role of low transition temperature mixtures. **Biochimie**, v. 120, p. 119-123, 2016.

ESPINO, M. et al. Natural designer solvents for greening analytical chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 126–136, 2016.

EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY. **Towards a green economy in Europe. EU environmental policy targets and objectives 2010–2050**, EEA Report No 8/2013, 2013.

FERREIRA, S.L.C. et al. Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. **Microchemical Journal**, v. 131, p. 163-169, 2017.

FIEHN, O. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. **Plant Mol. Biol.** 48, 155–171, 2002.

FRAIGE, K. et al. Using natural deep eutectic solvents for the extraction of metabolites in *Byrsonima intermedia* leaves. **Journal of Separation Science**, v. 42, n. 2, p. 591-597, 2019.

FRANCISCO, M.; VAN DEN BRUINHORST, A.; KROON, M. C. Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 11, p. 3074-3085, 2013.

FRITZ, R., RUTH, W., KRAGL, U. Assessment of acetone as an alternative to acetonitrile in peptide analysis by liquid chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.23, p.2139-2145, 2009.

FUNARI, C. S., et al. Green chromatographic fingerprinting: An environmentally friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 37-44, 2014a.

FUNARI, C.S. et al. A tradeoff between separation, detection and sustainability in liquid chromatographic fingerprinting. **Journal of Chromatography A**, v.1354, pp. 34-42, 2014b.

FUNARI, C.S. et al. Natural deep eutectic solvents and aqueous solutions as an alternative extraction media for propolis. **Food Research International**, v. 125, p. 108559, 2019.

FUNARI, C.S. et al. On Track for a Truly Green Propolis—Fingerprinting Propolis Samples from Seven Countries by Means of a Fully Green Approach. **ACS Sustainable & Chemistry Engineering**, v.4, pp. 7110-7117, 2016.

GABER, Y., et al. HPLC-EAT (Environmental Assessment Tool): A tool for profiling safety, health and environmental impacts of liquid chromatography methods. **Green Chemistry**, v.13, p.2021-2025, 2011.

GAŁUSZKA, A. et al. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v.37, pp. 61–72, 2012.

GAŁUSZKA, A., MIGASZEWSKI, Z., NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical Chemistry**, v.50, p.78-84, 2013.

GOMEZ, F.J.V. et al. A Greener Approach to Prepare Natural Deep Eutectic Solvents. **ChemistrySelect**, v.3, n.22, pp.6122-6125, 2018.

GUILLARME, D. et al. HPLC calculator v3. 0: software for chromatographic performance evaluation and HPLC method transfer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 430-440, 2008.

HAYYAN, M. et al. Functionalization of graphene using deep eutectic solvents. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, p. 1-26, 2015.

HUTCHINSON, J.P. et al. Investigation of polar organic solvents compatible with Corona Charged Aerosol Detection and their use for the determination of sugars by hydrophilic interaction liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.750, p.199-206, 2012.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**, ICH, 2005.

JELIŃSKI, T.; CYSEWSKI, P. Application of a computational model of natural deep eutectic solvents utilizing the COSMO-RS approach for screening of solvents with high solubility of rutin. **Journal of Molecular Modeling**, v. 24, n. 7, p. 180, 2018.

JI, Y.B. et al. Development, optimization and validation of a fingerprint of Ginkgo biloba extracts by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1066, n. 1-2, p. 97-104, 2005.

KALJURAND, M.; KOEL, M. Recent advancements on greening analytical separation. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 41, n. 1, p. 2-20, 2011.

LAVILLA, I. et al. Greener derivatization in analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 61, p. 1-10, 2014.

LEARDI, R. Experimental design in chemistry: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 652, n. 1-2, p. 161-172, 2009.

LEE, M.H. et al. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1343-1349, 1997.

LI, J. et al. Efficient extraction of major catechins in *Camellia sinensis* leaves using green choline chloride-based deep eutectic solvents. **RSC advances**, v. 5, n. 114, p. 93937-93944, 2015.

LI, Y. et al. Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quality consistency evaluation of an herbal medicinal preparation produced by different manufacturers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 4, p. 597-602, 2010.

LIANG, Y.; XIE, P.; CHAU, F. Chromatographic fingerprinting and related chemometric techniques for quality control of traditional Chinese medicines. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 3, p. 410-421, 2010.

LIDE, D. R. **Handbook of Chemistry and Physics**, vol. 87, CRC. 2006.

LIRA JUNIOR, J. S. et al. 2007. **Pitangueira. Recife**: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – 546 IPA.

LIU, X. et al. Broad range chemical profiling of natural deep eutectic solvent extracts using a high performance thin layer chromatography–based method. **Journal of Chromatography A**, v. 1532, p. 198-207, 2018.

MABRY, T. J., MARKHAN, K. R., THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970.

MALAMAN, F.S. et al. Supercritical fluid extracts from the Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.): relationship between the extracted compounds and the characteristic flavour intensity of the fruit. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 85-92, 2011.

MARTINEZ-CORREA, H.A., et al. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritic Fluids**, v. 55, p. 998-1006, 2011.

MBOUS, Y.P. et al. Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges. **Biotechnology Advances**, v.35, n.2, pp.105-134, 2017.

MCCORMICK, K; KAUTTO, N. The bioeconomy in Europe: An overview. **Sustainability**, v. 5, n. 6, p. 2589-2608, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE. **MS elabora Relação de Plantas Medicinais de interesse ao SUS**. Brasília: Agência Saúde, 2009. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf>. Acesso em: 13 mar.2019.

MONHEMI, H. et al. How a protein can remain stable in a solvent with high content of urea: insights from molecular dynamics simulation of *Candida antarctica* lipase B in urea: choline chloride deep eutectic solvent. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 28, p. 14882-14893, 2014.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. John Wiley & Sons, Inc., New York, 2017.

MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. John Wiley & Sons, 2016.

NAM, M.W. et al. Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: application to flavonoid extraction from *Flos sophorae*. **Green Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 1718-1727, 2015.

NICHOLSON, J.K.; LINDON, J. C. Metabonomics. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1054-1056, 2008.

NUNES, L.C. et.al. A chemometric approach exploring Derringer's desirability function for the simultaneous determination of Cd, Cr, Ni and Pb in micronutrient fertilizers by laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 154, p. 25-32, 2019.

NUTRIZIO, M. et al. High-Voltage Electrical Discharges in Green Extractions of Bioactives from Oregano Leaves (*Origanum vulgare* L.) Using Water and Ethanol as Green Solvents Assessed by Theoretical and Experimental Procedures. **Food Eng. Rev.**, 2020.

OECD Secretariat. OECD Existing Chemicals Database. <<http://www.oecd.org/env/hazard/data>>. Acesso em: 19 set. 2019.

OLIVES, A.I.; GONZALEZ-RUIZ, V.; MARTÍN, M.A.. Sustainable and eco-friendly alternatives for liquid chromatographic analysis. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 7, p. 5618-5634, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (1991). **Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines**. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/58865/1/WHO_TRM_91.4.pdf>. Acesso em: 17 de maio de 2020.

PAIVA, A. et al. Natural deep eutectic solvents—solvents for the 21st century. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 5, p. 1063-1071, 2014.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, 2010.

PENA-PEREIRA, F.; KLOSKOWSKI, A.; NAMIEŚNIK, J.. Perspectives on the replacement of harmful organic solvents in analytical methodologies: a framework toward the implementation of a generation of eco-friendly alternatives. **Green Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 3687-3705, 2015.

PENA-PEREIRA, F.; WOJNOWSKI, W.; TOBISZEWSKI, M.. AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 14, p. 10076-10082, 2020.

PENG, X. et al. Green extraction of five target phenolic acids from *Lonicera japonica* Flos with deep eutectic solvent. **Separation and Purification Technology**, v. 157, p. 249-257, 2016.

PEREIRA FILHO, E.R. **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**. EdUFSCar, 2015.

PILON, A.C. et al. Partial least squares model and design of experiments toward the analysis of the metabolome of *Jatropha gossypifolia* leaves: extraction and chromatographic fingerprint optimization. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 6, p. 1023-1030, 2016.

PISANO, P. L. et al. Structural analysis of natural deep eutectic solvents. Theoretical and experimental study. **Microchemical Journal**, v. 143, p. 252-258, 2018.

PLECHKOVA, N. V.; SEDDON, K.R. Applications of ionic liquids in the chemical industry. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 1, p. 123-150, 2008.

PRAT, D. et al. CHEM21 selection guide of classical-and less classical-solvents. **Green Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 288-296, 2015.

PRAT, D.; HAYLER, J.; WELLS, A. A survey of solvent selection guides. **Green Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 4546-4551, 2014.

PUBLIC HEALTH ENGLAND. **Compendium of Chemical Hazards: Methanol, Toxicological Overview.**

<https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/456293/Methanol_TO_PHE_260815.pdf>. Acesso em: 7 de Maio de 2020.

QI, X-L. et al. Green and efficient extraction of bioactive flavonoids from *Equisetum palustre* L. by deep eutectic solvents-based negative pressure cavitation method combined with macroporous resin enrichment. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 142-148, 2015.

RADOĆŠEVIĆ et al. Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. **LWT- Food Science and Technology**, v.73, p. 45-51, 2016.

RATTMANN, Y.D., et al. Analysis of Flavonoids from *Eugenia uniflora* Leaves and Its Protective Effect against Murine Sepsis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 9p. 2012.

RIBEIRO, B.D.; COELHO, M.A.Z; MARRUCHO, I.M. Extraction of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*) with cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents. **European Food Research and Technology**, v. 237, n. 6, p. 965-975, 2013.

RUTZ, J.K. et al. Microencapsulation of purple Brazilian cherry juice in xanthan, tara gums and xanthan-tara hydrogel matrixes. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1256-1265, 2013.

SCHAPOVAL, E. E. S. et al. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, n. 3, p. 137-142, 1994.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 183-186, 1987.

SCHUMACHER, N.S.G. et al. Identification and antioxidant activity of the extracts of *Eugenia uniflora* leaves. characterization of the anti-inflammatory properties of aqueous extract on diabetes expression in an experimental model of spontaneous type 1 diabetes (NOD Mice). **Antioxidants**, v. 4, n. 4, p. 662-680, 2015.

SILVA, S M. **Pitanga**. Revista Brasileira de Fruticultura, 28(1), 2006.

SMITH, E.L.; ABBOTT, A.P.; RYDER, K. S. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 21, p. 11060-11082, 2014.

SOUZA, O.A., et al. Fingerprinting *Cynara scolymus* L. (Artichoke) by Means of a Green Statistically Developed HPLC-PAD Method. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 1977–1985, 2018.

SRINUBABU, G. et al. Development and validation of a HPLC method for the determination of voriconazole in pharmaceutical formulation using an experimental design. **Talanta**, v. 71, n. 3, p. 1424-1429, 2007.

SUTTON, A. T. et al. Natural deep eutectic solvents as the major mobile phase components in high-performance liquid chromatography—searching for alternatives to organic solvents. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 16, p. 3705-3713, 2018.

THE UNITED NATIONS. **Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development**. Disponível em: <<https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld>>. Acesso em: 26 ago. 2019.

TISTAERT, C., DEJAEGHER, B., VANDER HEYDEN, Y. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprintings. **Analytica Chimica Acta**, v. 690, p. 148–161, 2011.

TOBISZEWSKI, M., MECHLIŃSKA, A., NAMIEŚNIK, J. Green analytical Chemistry – theory and practice. **Chemical Society Reviews**, v.39, p.2869-2878, 2010.

TOBISZEWSKI, M.; NAMIEŚNIK, J.; PENA-PEREIRA, F. Environmental risk-based ranking of solvents using the combination of a multimedia model and multi-criteria decision analysis. **Green Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 1034-1042, 2017.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry Botanical Drug Product**. Rockville: US Department of Health and Human Services, 2004.

VENTURA, S.P.M. et al. Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends. **Chemical Reviews**, v.117, n.10, pp.6984-7052, 2017.

WAGLE, D. V.; ZHAO, H.; BAKER, G. A. Deep eutectic solvents: sustainable media for nanoscale and functional materials. **Accounts of Chemical Research**, v. 47, n. 8, p. 2299-2308, 2014.

WANG, H.; DING, J.; REN, N. Recent advances in microwave-assisted extraction of trace organic pollutants from food and environmental samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.75, pp. 197-208, 2016.

WANG, L; WELLER, C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science and Technology**, v.17, n.6, pp.300-312, 2006.

WEI, Z., et al. Application of natural deep eutectic solvents for extraction and determination of phenolics in *Cajanus cajan* leaves by ultra performance liquid

chromatography. **Separation and Purification Technology**, v.149, p. 237-244, 2015a.

WEI, Z.F. et al. Fast and green extraction and separation of main bioactive flavonoids from *Radix Scutellariae*. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 175-181, 2015b.

WELCH, C. J. et al. Cocktail chromatography: enabling the migration of HPLC to nonlaboratory environments. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 2015, v.3, n.5, pp. 1000–1009,2015.

WELCH, C.J., et al. Greening analytical chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v.7, p.667-680,2010.

WOLFENDER, J.L. et al. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 1056-1090, 2013.

WOLFENDER, J.L.et al. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 136-164, 2015.

WU, B.P. et al. Insights into the impact of deep eutectic solvents on horseradish peroxidase: Activity, stability and structure. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 101-107, 2014.

YULIANA, N.D. et al. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 2, p. 157-169, 2011.

ZABED, H. et al. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 475-501, 2017.

ZAINAL-ABIDIN, M.H. et al. New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 979, p. 1-23, 2017.

ZHANG, Q. et al. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 21, p. 7108-7146, 2012.

ZHAO, B.Y, et al. Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from *Sophora japonica*. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v.3, n. 11, p. 2746-2755, 2015.