

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

JÚLIA ASSIRATI

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

Botucatu, 2020

Júlia Assirati

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

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Soleo de Funari

Botucatu, 2020

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

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

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

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

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

Prof. Dr. CRISTIANO SOLEO DE FUNARI

Profa. Dra. ISABEL DUARTE COUTINHO

Prof. Dr. FERNANDO BATISTA DA COSTA



AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

Palavras-chave: resíduos agrícolas, metabolômica, Química Verde

ABSTRACT

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

Keywords: agri-food byproducts, metabolomics, Green Chemistry

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Cromatogramas representativos UHPLC-UV (esquerda) a 350 nm e GC-MS (direita) de diferentes procedimentos de extração: extratos metanólico (a), hidrometanólico (c, em preto) e n-hexânico (b e d, em preto) obtidos de extrações de referência; extratos hidroetanólicos e n-heptânicos alternativos (c e d, em verde); extratos hidroetanólico (e e g), e n-heptânico (f e h) obtidos por *Two-Liquid-Phase Dynamic Maceration (2-Mac)* e *Two-Liquid-Phase Ultrasound-Assisted Extraction with Probe (2-UAEP)*, respectivamente, usando um recipiente de 3 cm d.i. em ambas extrações. As janelas dos eixos x e y são as mesmas em cada coluna..... 20
- Figura 2 - Eficiências de extrações de uma e duas fases líquidas (1- e 2- seguidas pelas siglas da técnica de extração, respectivamente), em um frasco de 3 cm de diâmetro interno. 1-Ref refere-se à soma dos picos ou área total dos picos obtidas para os métodos de extração de referência na literatura, sem qualquer concentração de extrato. Letras minúsculas distintas acima das barras indicam diferenças significativas entre as extrações no mesmo gráfico..... 24
- Figura 3 - Efeito do diâmetro interno (d.i.) do recipiente de extração na eficiência de 2-UAEP, a 20 kHz, 125 W (esquerda) e 2-Mac a 30 °C, 1400 rpm. Letras minúsculas distintas acima das barras indicam diferenças significativas entre as extrações em frascos com diferentes d.i. As análises estatísticas foram realizadas considerando todos os resultados para a mesma resposta monitorada. 31
- Figura 4 - Cromatogramas das frações polares e apolares obtidos por UHPLC-UV a 350 nm (à esquerda) e GC-MS (à direita), respectivamente, por dois diferentes métodos de extração: 2-UAEP, utilizando um recipiente de 2,5 cm d.i. e 2-Mac, usando um recipiente de 3,0 cm d.i., para três resíduos da indústria sucroalcooleira: bagaço, palha e torta de filtro..... 34
- Figura 5 - Número de compostos identificados por classe em três subprodutos de cana-de-açúcar (bagaço, palha e torta de filtro) por 2-UAEP (a) e 2-Mac (b). 35
- Figura 6 - Espectros *online* de massas de alta resolução e ultravioleta (A e B, respectivamente) do candidato com razão m/z 577,1556 obtido na fração EtOH:H₂O 7:3 (v/v) de extrato de bagaço..... 37
- Figura 7 - Estrutura de metabólitos identificados nos resíduos sólidos de cana-de-açúcar com potenciais diversos de aplicação..... 62

LISTA DE TABELAS

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

SUMÁRIO

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

2. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver uma técnica experimental verde, simplificada e altamente eficiente para extrair e identificar tentativamente uma ampla gama de metabólitos em subprodutos da cana-de-açúcar coletados diretamente nas usinas. Para tanto, investigou-se: (i) o desempenho ambiental e de

extração de cinco configurações experimentais para extrações com duas fases líquidas lado a lado, com quatro extrações de referência de uma única fase líquida; (ii) a necessidade de cada etapa do procedimento analítico; (iii) a eficiência de solventes mais verdes, baratos, compatíveis com análises de LC-UV-MS e GC-MS e de alta disponibilidade em laboratórios de química como possíveis substituições aos solventes tradicionalmente usados para essas extrações com duas fases líquidas; (iv) o efeito da geometria do recipiente de extração nas técnicas de extração em duas fases com melhor rendimento; e (v) a abrangência real das duas melhores extrações no perfil metabólico dos três principais subprodutos sólidos da indústria sucroenergética (bagaço, palha deixada no campo e torta de filtro).

3. EXPERIMENTAL

3.1. Solventes

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os solventes listados a seguir: para as extrações, utilizou-se n-heptano (Sigma Aldrich, Alemanha), n-hexano, metanol e etanol (Merck, Alemanha) e para as análises cromatográficas utilizou-se ácido fórmico grau P.A, (Sigma Aldrich, Alemanha), etanol grau HPLC e acetonitrila (Merck, Alemanha).

3.2. Subprodutos da cana-de-açúcar

Amostras de palha foram coletadas diretamente do campo entre 1 a 7 dias depois da colheita (Usina Zilor, Lençóis Paulista, SP). Amostras de bagaço foram coletadas nas usinas Zilor e São Francisco (Sertãozinho, SP), secas ao ar e misturadas na proporção 1:1 (m/m). Amostras de torta de filtro também foram coletadas na usina São Francisco. As amostras secas foram moídas e somente partículas com tamanho entre 38-42 mesh foram extraídas.

3.3. Extrações de referência

A extração de compostos de média a alta polaridades foi baseada em Colombo et al.,^{13,35} que, até onde se pesquisou, fez a investigação mais abrangente de metabólitos de média a alta polaridade em subprodutos da cana-de-açúcar. Resumidamente, 1 g de bagaço foi extraído com 35 mL de MeOH por 1,5 min por extração assistida por ultrassom (dispositivo de banho ultrassônico, 40 kHz/160 W,

SolidSteel SSBu, Brasil). Em seguida, 2 mL de H₂O foram adicionados ao extrato e a solução resultante foi concentrada em um rotoevaporador (Heidolph Hei-VAP Advantage, Alemanha). O extrato concentrado (aprox. 2 mL) foi submetido à extração em fase sólida (Phenomenex, Strata C18 55 µm, EUA). A fase estacionária foi ativada com 1,0 mL de MeOH e equilibrada com 1,0 mL de água. Foi então carregada com 2 mL de extrato. Os compostos interferentes foram eluídos em 3 mL de água, e os compostos de interesse foram eluídos em 3 mL de MeOH. Um procedimento tradicional de refluxo previamente descrito para subprodutos de cana-de-açúcar foi definido como método de referência para a extração de compostos apolares. Brevemente, 11 g de bagaço foi extraído com 200 mL de n-hexano por 4 h em um aparato Soxhlet.¹⁵

3.4. Extrações com duas fases líquidas

As cinco extrações alternativas para bagaço de cana-de-açúcar testadas foram: (i) *Ultrasound-Assisted Emulsification-Extraction*, na qual, simultaneamente, empregou uma sonda de radiação ultrassônica (Unique 19 kHz, 495 W, Brasil) e maceração dinâmica com agitação magnética (Heidolph MR Hei-Tec com sensor de temperatura, Alemanha), a 1400 rpm, (2-UAEE; o acrônimo 2- foi empregado para diferenciar extrações de duas fases de extrações de uma fase), e que foi baseada em Serradilla et al.,²⁸ (ii) *Two-Liquid-Phase Ultrasound-Assisted Extraction with Probe* (2-UAEP) (Unique, 19 kHz/495 W, Brasil ou QSonica Q 125, 20 kHz/125 W, EUA - este último foi utilizado apenas para investigar a influência da geometria do recipiente de extração); (iii) *Two-Liquid-Phase Ultrasound-Assisted Extraction with Bath*, a 40 kHz e 160 W (SolidSteel SSBu, Brasil) (2-UAEB); (iv) *Two-Liquid-Phase Dynamic Maceration*, a 30 °C e 1400 rpm (2-Mac); (v) *Two-Liquid-Phase Vortex-Assisted Extraction*, a 3000 rpm (2-Vort) (Vortexer Heathrow Scientific, EUA). As condições gerais para todas as extrações foram 750 mg de matriz sólida em um béquer de diâmetro interno (d.i.) de 2,0 ou 3,0 cm (para 2-Mac e 2-UEAP, também foram testados recipientes com 2,5 e 3,8 cm de d.i.), nos quais foram adicionados 7,5 mL de n-heptano e 7,5 mL de EtOH-H₂O 7:3 (v/v) [para 2-UAEE, 7,5 mL de n-hexano e 7,5 mL de MeOH-H₂O 8: 2 (v/v) foram primeiramente empregados]. O tempo de extração foi de 9 min. No final de cada extração, as fases líquidas foram removidas e centrifugadas (Eppendorf 5810 R, Alemanha) a 4000 rpm por 5 min. As fases hidroetanólica e n-

heptanânica foram filtradas em um filtro de membrana de celulose regenerada de 0,22 µm e analisadas por UHPLC-UV e GC-MS, respectivamente.

3.5. Extrações com uma fase líquida

Para uma comparação adicional, 2-UAEP (19 kHz, 495 W) e 2-Mac (30 °C, 1400 rpm) também foram realizadas usando apenas uma fase líquida [EtOH-H₂O 7:3 (v/v) ou n-heptano] separadamente. Assim, 750 mg de bagaço foram extraídos com 7,5 mL de EtOH-H₂O 7:3 (v/v) ou com 7,5 mL de n-heptano, por 9 min. As extrações foram denominadas (vi) *One-Liquid-Phase Ultrasound- Assisted Extraction with Probe* (1-UAEP) e (vii) *One-Liquid-Phase Dynamic Maceration* (1-Mac). Os extratos resultantes foram analisados por UHPLC-UV e GC-MS, respectivamente.

3.6. Comparação entre extrações

Todas as extrações neste trabalho foram realizadas em triplicatas. Os parâmetros de extração monitorados foram: (i) a soma do número de picos obtidos por UHPLC-UV a 350 nm e GC-MS para os pares de extratos hidroetanólicos (ou hidrometanólicos) e n-heptânicos (ou n-hexânicos), respectivamente; (ii) a soma das áreas dos picos dos cromatogramas acima mencionados; e (iii) seu impacto ambiental, avaliado pelas métricas denominadas *Analytical-Eco Scale* e *HPLC-Environmental Assessment Tool*.^{36,37} Para (ii), como os cromatogramas UHPLC-UV e GC-MS foram obtidos em escalas diferentes, uma normalização linear foi aplicada para cada cromatograma, obtendo valores para áreas de pico total de 0 a 1 para cada cromatograma.

3.7. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu GCMS QP2020, Japão) com um injetor automático (AOC-20i). As separações foram obtidas em uma coluna capilar de dimensões 30 m × 25 mm; 0,25 µm (Zebtron ZB-5HT Inferno, Phenomenex, EUA). A pressão do sistema foi mantida constante a 103,8 kPa. O gás carreador foi hélio a uma vazão fixa de 7,0 mL/min. A temperatura do injetor foi de 380 °C. A temperatura inicial do forno foi de 180 °C, mantida por 1 min, e depois aumentada a uma taxa de 8 °C/min até atingir a temperatura de 380 °C, à qual foi mantida por 10 min. A injeção foi feita de maneira automática (2 µL) com split 3:1. O espectrômetro de massas de

impacto eletrônico operou a uma temperatura de fonte de 290 °C e uma varredura da razão massa/carga de 30 a 1000 u.m. Para comparação entre os extratos n-heptânicos, foram considerados picos com inclinação superior a 5000 $\mu\text{V}/\text{min}$. Isso foi necessário para evitar a contagem indevida de compostos derivados de sangramento da coluna como compostos da amostra. Para a identificação dos compostos, qualquer pico com inclinação igual ou superior a 100 $\mu\text{V}/\text{min}$ teve sua identidade verificada e os compostos derivados de sangramento na coluna foram excluídos.

3.8. Cromatografia líquida de ultra-alta-eficiência acoplada a arranjo de fotodiodos (PDA/UV/Vis) (UHPLC-PAD/UV)

Para o desenvolvimento do método cromatográfico e o monitoramento da eficiência das extrações, as análises foram realizadas em um sistema UHPLC (Shimadzu Nexera UC, Japão), composto por uma controladora (CBM 20-A), um degaseificador (DGU-20A), duas bombas ternárias (Nexera X2 LC-30AD), um auto injetor (Nexera X2 SIL-30AC), um compartimento de coluna termoestável (CTO-20AC) e um detector de PDA/UV (SPD-M20A). As separações foram realizadas em uma coluna C18, 150 \times 2,1 mm; 1,7 μm (Kinetex, Phenomenex, EUA). A fase móvel continha água acidificada com ácido fórmico a 0,2% (v/v) (A) e acetonitrila (ACN) (B), no seguinte gradiente: 10–13% de ACN de 0 a 3,81 min; 13–16,5% de ACN de 3,81 a 27 min; 16,5–20% de ACN de 27 a 39 min; 20–40% de 39 a 59 min; 40–60% ACN de 59 a 72 min; 60–100% de ACN de 72 a 74 min, mantendo 100% de ACN de 74 a 79 min. A taxa de fluxo do sistema foi de 0,2 mL/min. A temperatura do forno foi mantida a 30 °C e o volume de injeção foi de 3,0 μL . As separações foram monitoradas em $\lambda = 350$ nm. Apenas picos com razão sinal/ruído (S/N) superior a 3 foram considerados. Os espectros de UV (200-400 nm) foram adquiridos durante as análises. Os dados foram processados usando o software LabSolutions da Shimadzu.

3.9. Cromatografia Líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrofotômetro UV/Vis e espectrômetros de massas por tempo de voo (UHPLC-PAD/UV-ESI-TOFMS)

Para identificação dos compostos, as análises foram realizadas em um sistema UHPLC (Waters Acquity H-Class, EUA), composto por uma bomba quaternária (Quaternary Solvent Manager), um injetor automático (Sample Manager FTN) e um compartimento de coluna termoestável, acoplado a um detector de arranjo

de fotodiodos e um espectrômetro de massas com uma ionização por *electrospray* e um analisador quadrupolo por tempo de voo (Xevo G2-XS QToF). As separações foram desenvolvidas usando a mesma coluna e condições cromatográficas descritas na subseção 2.8. Os espectros de massa foram adquiridos nos modos positivo e negativo. As condições do espectrômetro de massas foram as seguintes: temperatura da fonte, 100 °C, temperatura de dessolvatação, 650 °C, fluxo de gás de dessolvatação, 13,3 L/min; tensão capilar, (+) 3000 kV e (-) 3000 kV; tensão do cone de referência, 30 V; energia de colisão, 4,0 eV. O espectrômetro de massas operou na faixa de 100 a 1000 m/z. Para garantir a precisão da massa em baixos valores de ppm, uma referência de correção de massa interna foi usada para variações adequadas. A solução de massa de referência continha 2 compostos de referência de massa conhecida: m/z 91.040 e 1178.895. Os dados foram processados usando o software MassLynx da Water.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Configuração dos métodos cromatográficos

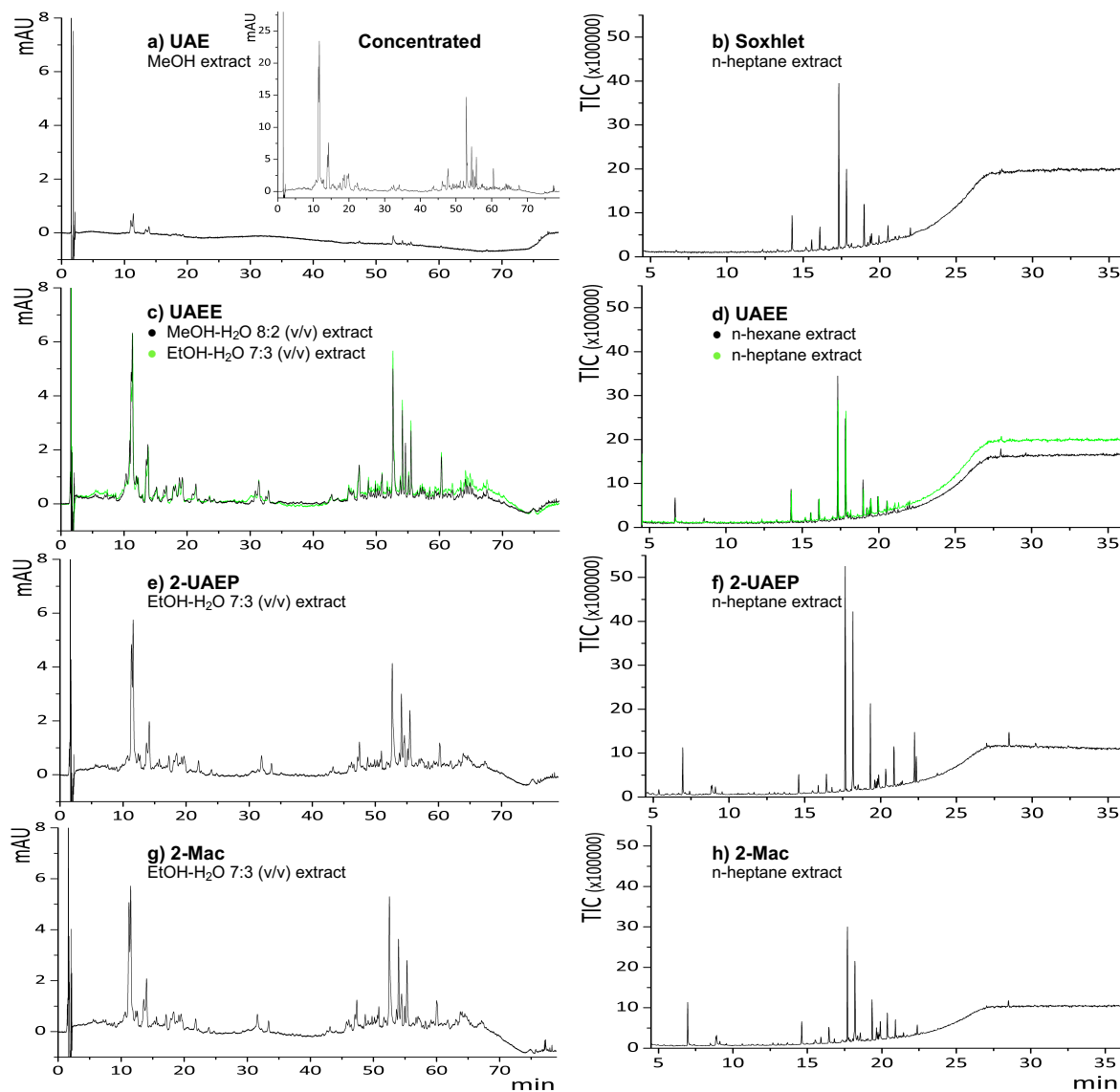
O primeiro passo foi definir métodos cromatográficos de análise por GC-MS e UHPLC-PAD/UV para avaliar de forma abrangente a qualidade das extrações investigadas com base no número total de picos e na área total dos picos em um determinado cromatograma. Um método abrangente de GC-MS selecionado foi desenvolvido por Attard et al. para analisar compostos apolares de subprodutos da cana-de-açúcar.¹⁵ Para compostos polares a semi-polares, os métodos HPLC-PAD/UV descritos por Colombo et al. e Leme et al. para analisar as folhas de cana-de-açúcar foram tomados como ponto de partida.^{12,13,35} Primeiro, cada método foi avaliado quanto ao seu impacto ambiental, usando a métrica *HPLC-Environmental Assessment Tool (HPLC-EAT)*.³⁷ Até onde se conhece, esse ainda é a melhor métrica para essa finalidade, uma vez que leva em consideração os aspectos qualitativos (impactos na segurança, saúde e meio ambiente de cada solvente usado - SHE) e quantitativos (a massa exata de cada solvente usado) dos métodos em comparação. HPLC-EAT é calculada de acordo com a Equação 1.

$$\text{HPLC-EAT} = (S_1 + H_1 + E_1) m_1 + (S_2 + H_2 + E_2) m_2 + (\dots) + (S_n + H_n + E_n) m_n \text{ (Equação 1)}$$

onde S, H e E são os fatores de segurança, saúde e meio ambiente, respectivamente (do inglês, *safety, health, environment*), para um número n de solventes, e m é a massa do(s) solvente(s).

Essa ferramenta utiliza originalmente os pontos SHE calculados por Hungerbühler e colaboradores.³⁸ De acordo com isto, os métodos descritos por Colombo et al.^{13,35} e Leme et al.¹² levaram à pontuação HPLC-EAT de 46,05 e 54,7, respectivamente. Além disso, o HPLC-EAT foi aplicado com os pontos SHE fornecidos pelo guia de referência de seleção de solventes, CHEM-21.²⁶ Novamente, o método HPLC descrito por Colombo et al.^{13,35} obteve pontuação menor que o de Leme et al.¹² (260,9 e 431,1, respectivamente). Quanto menor a pontuação final calculada por essa métrica, mais ecológico é o método. Assim, o método HPLC-UV de Colombo et al. foi selecionado e transposto para UHPLC-UV. Isso foi feito com o auxílio do software HPLC Calculator versão 3.0, desenvolvido por Guillarme et al.³⁹ As concentrações dos componentes da fase móvel foram otimizadas para obter a maior quantidade de informação química (picos e espectros de UV), necessária para comparar as configurações experimentais com maior discernimento. O novo método UHPLC-PAD/UV obtido provou ser 2,6 a 3,6 vezes mais verde que o método original para HPLC (pontuação de 17,9 e 72,0, para os valores de SHE de Capello et al. ou Prat et al.).^{26,38} Isso ocorreu devido à miniaturização da coluna UHPLC que levou a um menor consumo do modificador orgânico (5,0 mL versus 16,4 mL). Os cromatogramas representativos de UHPLC-PAD/UV usando este método estão na Figura 1 (coluna da esquerda).

Figura 1 - Cromatogramas representativos UHPLC-UV (esquerda) a 350 nm e GC-MS (direita) de diferentes procedimentos de extração: extratos metanólico (a), hidrometanólico (c, em preto) e n-hexânico (b e d, em preto) obtidos de extrações de referência; extratos hidroetanólicos e n-heptânicos alternativos (c e d, em verde); extratos hidroetanólico (e e g), e n-heptânico (f e h) obtidos por *Two-Liquid-Phase Dynamic Maceration (2-Mac)* e *Two-Liquid-Phase Ultrasound-Assisted Extraction with Probe (2-UAEP)*, respectivamente, usando um recipiente de 3 cm d.i. em ambas extrações. As janelas dos eixos x e y são as mesmas em cada coluna.



4.2. Métodos de referência

Os compostos semi-polares a polares presentes no bagaço foram extraídos usando o método descrito por Colombo et al., que empregou metanol e aparato de banho ultrassônico para extração de bagaço de cana-de-açúcar.^{13,35} Um cromatograma representativo do extrato antes da concentração de metabólitos é apresentado na Figura 1a, enquanto que o cromatograma obtido a partir da injeção da amostra após o procedimento completo de preparação da amostra, conforme

descrito pelos autores (filtração, concentração em um evaporador rotativo, extração em fase sólida e filtração por membrana) é colocada sobre a Figura 1a. O número de picos adquiridos por UHPLC-PAD/UV foi de $3,3 \pm 1,2$ e $60,3 \pm 15,0$, respectivamente. Assim, o tempo e a energia consumidos nas etapas de evaporação de solvente e extração em fase sólida se mostraram obrigatórios para o método de referência de Colombo et al.,^{13,35} quando se deseja um amplo perfil de metabólitos (o consumo de energia é apresentado posteriormente neste trabalho).

Em seguida, um método usando n-hexano e Soxhlet, usado anteriormente para extrair compostos apolares de bagaço, colmo e folhas de cana, foi empregado em um bagaço não extraído anteriormente.¹⁵ Um cromatograma representativo de GC-MS do extrato n-hexânico após a filtração é mostrado na Figura 1b, com $15 \pm 2,0$ picos.

4.3. Extrações alternativas usando duas fases líquidas

Buscando desenvolver um procedimento que combine totalmente com os princípios da Química Analítica Verde e com as extrações verdes de produtos naturais, conforme descrito por Gałuszka et al. e Chemat et al.,^{16,40} e que extraíam com eficiência o maior número possível de metabólitos presentes na matriz sólida sob investigação, duas estratégias complementares foram adotadas: (i) eliminar etapas analíticas, através de um processo que pode extrair simultaneamente de compostos polares a compostos apolares com baixo consumo de energia, permitindo sua identificação posterior e (ii) substituir os solventes utilizados pelos métodos de referência por outros preferíveis do ponto de vista da Química Verde.

Para a estratégia (i), uma extração chamada *Ultrasound-Assisted Emulsification-Extraction (2-UAEE)*, conforme relatado por Serradilla et al. para outras amostras sólidas, foi testada para o bagaço da cana-de-açúcar.²⁸ A extração foi feita com MeOH-H₂O 8:2 (v/v) e n-hexano simultaneamente, levando a dois extratos, ao invés de simplesmente duas frações. Isso ocorre porque a matriz sólida é mantida em contato com ambas fases líquidas, do início ao fim do processo, sob uma técnica de extração eficiente e reconhecida.³¹ Após a centrifugação, é possível obter um extrato hidrometanólico pronto para ser injetado no sistema UHPLC-PAD/UV de fase reversa, logo após a filtração em filtro de seringa.²⁸ Comparada com a extração de referência que utiliza apenas uma fase,^{13,35} esta extração proposta eliminaria três etapas: (i) uma filtração inicial do extrato, (ii) uma evaporação do solvente e (iii) uma extração em fase

sólida para eliminar compostos apolares que poderiam aderir irreversivelmente à fase estacionária C18 da coluna cromatográfica. Para a fração n-hexânica, testou-se a injeção direta no sistema GC-MS logo após a extração e centrifugação, embora Serradilla et al. tenha realizado sete etapas adicionais antes de injetar a solução final em um sistema GC-MS (evaporação de n-hexano, ressuspensão do resíduo seco e derivatização com metilato de sódio em metanol, seguido de uma nova centrifugação, evaporação do sobrenadante até a secura, ressuspensão em n-hexano, diluição na razão 1:10 apta a ser finalmente injetada).²⁸ Se fosse alcançado um resultado satisfatório, um procedimento mais rápido e eficiente, que economizaria recursos ambientais, como energia e solventes, teria sido desenvolvido para a amostra sob investigação. Os cromatogramas resultantes são mostrados em preto nas Fig. 1c e 1d, respectivamente.

O número médio de picos por UHPLC-PAD/UV e CG-MS foi de $50,7 \pm 1,5$ e $20,3 \pm 0,6$, respectivamente. Esses resultados evidenciaram que o 2-UAEE teve um desempenho melhor do que a soma dos resultados das extrações de referência com uma fase líquida com MeOH e n-hexano (total de 18,3 picos), mas quando estas não tiverem passado pelas etapas de concentração da amostra, de forma a permitir uma comparação direta da eficiência da extração (Figura 2). Isso também ocorre quando se compara seu desempenho ambiental por métricas complementares (os resultados são fornecidos mais adiante neste trabalho).

O próximo passo foi substituir os solventes de referência por solventes mais verdes, com o objetivo de manter ou melhorar o desempenho da extração, uma vez que os solventes orgânicos perigosos são considerados as principais ameaças à saúde e ao meio ambiente nos procedimentos analíticos de extração.^{18,41-43} Isso foi realizado com a ajuda do CHEM-21²⁶ e de uma classificação de solventes com base no risco ambiental, usando a combinação de um modelo multimídia e análise de decisão com múltiplos critérios.⁴⁴ Com base nestes, n-hexano e MeOH-H₂O 8:2 (v/v) foram substituídos por n-heptano e EtOH-H₂O 7: 3 (v/v), respectivamente. As figuras 1c e 1d (cromatogramas verdes) ilustram o resultado dessa substituição. O desempenho da extração de compostos polares a semi-polares presentes no bagaço de cana foi mantido, uma vez que os cromatogramas têm perfis qualitativos e quantitativos muito semelhantes (Figura 1c). De fato, foram obtidos $52,0 \pm 3,0$ e $50,7 \pm 1,5$ picos para os extratos hidroetanólico e hidrometanólico, respectivamente. Para a área dos picos, o comportamento foi o mesmo (a área total dos picos foi apenas

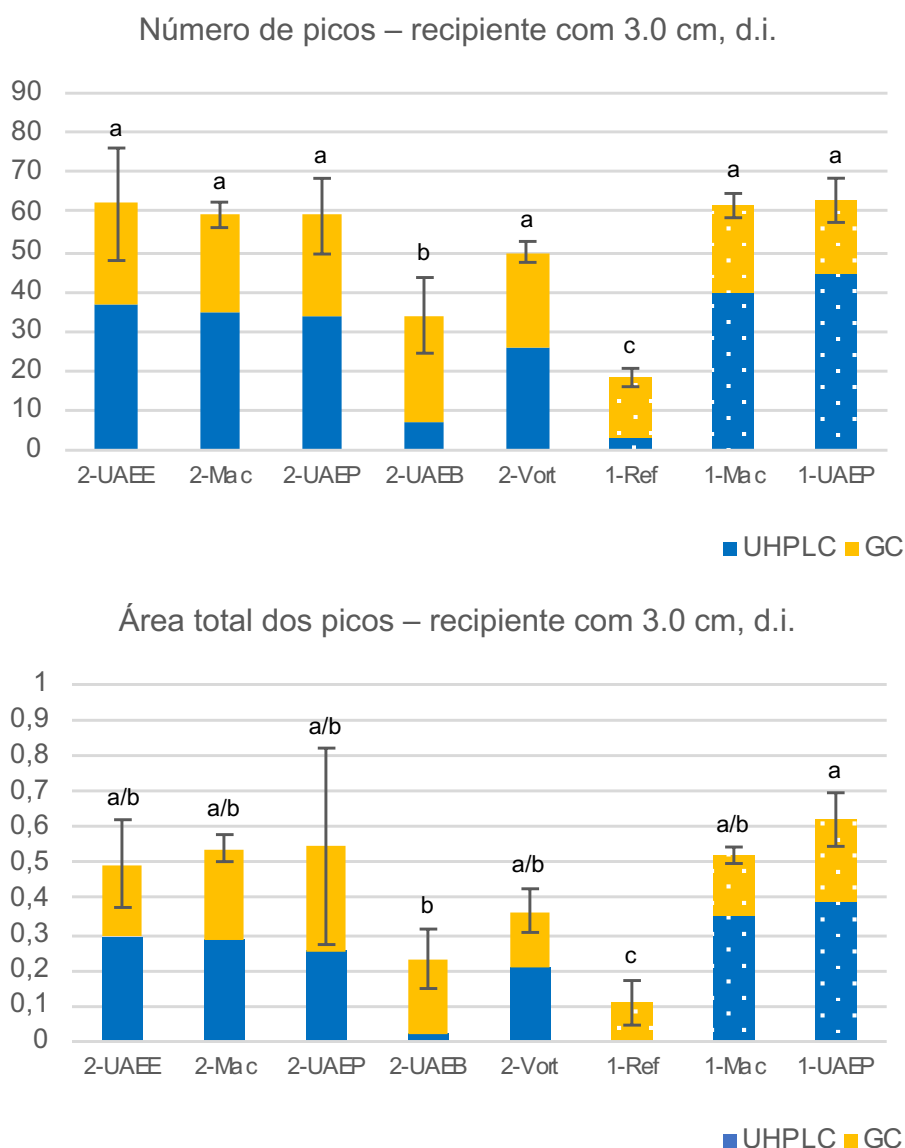
3,9% maior para o extrato hidrometanólico). Neste caso, claramente foi alcançada uma vantagem para o analista, uma vez que é de amplo conhecimento que o MeOH é prontamente absorvido por inalação e/ou exposição da pele e é metabolizado pelos seres humanos em formaldeído e ácido fórmico, ambos tóxicos e cumulativos. Embora o MeOH esteja listado como “recomendável” no CHEM-21, ao considerar a soma de suas pontuações de SHE, ele deve ser evitado sempre que possível para aumentar a segurança pessoal do operador.^{16,26,40} Por outro lado, EtOH é considerado um dos solventes orgânicos mais verdes disponíveis atualmente,^{26,40} especialmente quando obtidos por fermentação ou de fontes renováveis, incluindo a cana-de-açúcar, objeto deste estudo. Em uma biorrefinaria, o produto primário do processo (EtOH) poderia ser usado para extrair metabólitos especializados dos subprodutos obtidos do cultivo e processamento da cana-de-açúcar (a presença de metabólitos especializados de alto valor agregado no extrato etanólico é descrita em este manuscrito).

Para extrair compostos apolares, os cromatogramas representativos na Figura 1d indicaram que a substituição de n-hexano por n-heptano também não alterou o perfil cromatográfico obtido para as duas extrações. Obteve-se o valor de $19,3 \pm 1,1$ picos para o extrato de n-heptano e $20,3 \pm 0,6$ para o extrato de n-hexano, o que não é estatisticamente diferente. Para a área dos picos, o n-heptano foi 19% melhor que o n-hexano. De acordo com o guia CHEM-21, n-hexano é considerado “indesejável”, enquanto o n-heptano é classificado apenas como “problemático” e, portanto, é preferível.²⁶ Outro benefício nessa troca é que o n-heptano é menos prejudicial à saúde do operador do que o n-hexano.^{16,26} Assim, nesta fase do estudo, descobriu-se que substituir MeOH por EtOH e n-hexano por n-heptano permite um processo de extração mais verde sem perda na eficiência da extração, como posteriormente confirmado por métricas apropriadas (discutidas posteriormente).

O próximo passo foi uma tentativa de eliminar ainda mais as etapas envolvidas no 2-UAEE, mas manter sua eficiência de extração. Em geral, quanto mais passos envolvidos em um processo analítico, menos verde e menos reprodutível este é.³⁶ Como o 2-UAEE emprega extração assistida por ultrassom e agitação magnética simultaneamente,²⁸ uma única técnica de extração poderia ser avaliada, mantendo a abordagem de duas fases líquidas. Portanto, as seguintes novas extrações foram testadas: (i) *Two-Liquid-Phase Dynamic Maceration (2-Mac)*; (ii) *Two-Liquid-Phase Ultrasound-Assisted Extraction with Probe (2-UAEP)*; (iii) *Two-Liquid-Phase Ultrasound-Assisted Extraction with Bath (2 UAEB)* e (iv) *Two-Liquid-Phase Vortex-*

Assisted Extraction (2- Vort). Os resultados estão resumidos na Figura 2, enquanto os cromatogramas obtidos para 2-UAEP e 2-Mac estão na Figura 1e-h.

Figura 2 - Eficiências de extrações de uma e duas fases líquidas (1- e 2- seguidas pelas siglas da técnica de extração, respectivamente), em um frasco de 3 cm de diâmetro interno. 1-Ref refere-se à soma dos picos ou área total dos picos obtidas para os métodos de extração de referência na literatura, sem qualquer concentração de extrato. Letras minúsculas distintas acima das barras indicam diferenças significativas entre as extrações no mesmo gráfico.



Comparando as diferentes extrações com duas fases líquidas realizadas em um recipiente de 3 cm de diâmetro interno (resultando em uma coluna líquida de 2,15 cm, com uma superfície de contato entre as fases de 7 cm², quando em repouso), as extrações por maceração dinâmica com agitação magnética (2-Mac) e a assistida por ultrassom com sonda (2-UAEP) levaram a resultados estatisticamente semelhantes

aos obtidos por *Simultaneous Ultrasound-Assisted Emulsification-Extraction* (2-UAEE), com um número médio de picos de $59,3 \pm 3,2$, $59,0 \pm 9,5$ e $62,0 \pm 14,2$, respectivamente (Figura 2). Por outro lado, número médio de picos muito mais baixos foi obtido pelo dispositivo de banho ultrassônico (2-UAEB), com $34,0 \pm 9,5$ picos (Figura 2). Essa eficiência mais baixa ser justificada pelo fato de que em dispositivos de banho ultrassônico, a intensidade fornecida é altamente atenuada pela água contida no banho e pelos utensílios de vidro usados no experimento até atingir a amostra.⁴⁵ Um dispositivo de banho ultrassônico é a plataforma de extração mais empregada nos protocolos de metabolômica.^{21,24,25,27} Ele é prático, já que um grande número de amostras pode ser analisado simultaneamente. Porém, isso também é possível com um aparelho de agitação magnética, como o usado neste caso, e que se mostrou mais eficiente.

A extração assistida por *vortex* (2-Vort), em tubo plástico de fundo cônico (*falcon*) de 50 mL, apresentou desempenho intermediário, com número médio de picos de $50,0 \pm 2,6$ (Figura 2). Uma análise de variância (ANOVA) com um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$) seguido de um teste de Tukey confirmou que a técnica 2-UAEB foi a pior dentre a série de extrações em duas fases (diferiu significativamente dos outros métodos, exceto para 2-Vort) (Figura 2).

Quando o parâmetro monitorado foi a soma das áreas dos picos dos cromatogramas, as extrações com duas fases líquidas não apresentaram diferença significativa. Assim, nesta etapa, optou-se pela simplificação das extrações com duas fases líquidas, eliminando as técnicas de extração redundantes de 2-UAEE, sem perda no desempenho da extração. Isso também reduziu o consumo de energia, principalmente quando o 2-Mac foi usado. 2-Mac e 2-UAEP consumiram $0,038 \pm 0,001$ e $0,049 \pm 0,001$ KWh, respectivamente, inferiores a $0,058 \pm 0,001$ KWh, consumidos por 2-UAEE (os resultados para o consumo de energia de todas as extrações estão resumidos na Tabela 1). Esse parâmetro impactou o impacto ambiental dos métodos, conforme será apresentado posteriormente.

Tabela 1 - Visão geral das eficiências ambiental e extratora de procedimentos de referência e alternativos.

Procedimento de extração	Número de picos	Consumo energético por experimento (kWh) ¹	Pontuação <i>Analytical Eco-Scale</i>	Pontuação HPLC-EAT
Colombo et al. ²	60.3 ± 15.0	0.234 ± 0.023	78	82.05
Colombo et al. ³	3.3 ± 1.2	0.003 ± 0.001	79	73.64
Soxhlet	15 ± 2.0	0.525 ± 0.012	66	534.2
2-UAEE ⁴	62.0 ± 14.1	0.058 ± 0.001	81	30.09
2-Mac ⁵	59.3 ± 3.2	0.038 ± 0.001	81	30.09
2-UAEP	59.0 ± 9.5	0.049 ± 0.001	81	30.09
2-UAEB ⁵	34.0 ± 9.5	0.049 ± 0.001	81	30.09
2-Vort ⁶	50.0 ± 2.6	0.034 ± 0.001	81	30.09

¹Foi considerada a energia gasta para centrifugação dos procedimentos com duas fases líquidas;

^{2,3}Método de referência com (procedimento completo) e sem concentração e SPE, respectivamente;

⁴2-UAEE realizada com EtOH:H₂O 7:3 (v/v)/n-heptano. As pontuações por *Analytical Eco-Scale* e HPLC-EAT foram 77 e 32.66 para a extração original com MeOH:H₂O 8:2 (v/v)/n-hexano; ⁵Métodos capazes de extrair 3 replicatas por experimento; ⁶Método capaz de extrair 2 replicatas por experimento.

4.4. Comparação adicional de extrações de uma e duas fases líquidas

Embora uma comparação lado a lado entre extrações de uma e duas fases líquidas relatadas anteriormente na literatura tenha sido realizada neste trabalho, evidenciando a vantagem de usar a última abordagem, poder-se-ia argumentar que elas foram realizadas usando diferentes técnicas e que isso poderia influenciar a conclusão. Portanto, como prova adicional, as duas técnicas de extração com melhor desempenho exploradas até aqui (maceração dinâmica e extração assistida por ultrassom com sonda) também foram empregadas para preparar extratos de bagaço de cana-de-açúcar com uma única fase líquida de cada vez [EtOH-H₂O 7:3 (v/v) e n-heptano, separadamente]. Para tornar essa prova ainda mais desafiadora, a amostra de bagaço submetida a esta extração com apenas um solvente não foi pré-extraída com o solvente parceiro e a proporção amostra:solvente foi fixada em 1:10 (m/v). Ou seja, a mesma proporção se considerar apenas uma fase líquida individualmente nas extrações de duas fases. Os resultados obtidos, como a soma dos picos UHPLC-UV e GC-MS de cada extração injetadas diretamente nesses sistemas logo após as filtrações (com qualquer tipo de concentração de metabólitos), são apresentados nas

barras 1-Mac e 1-UAEP da Figura 2. Os resultados demonstram claramente que o desempenho dos métodos de extração com duas fases líquidas ao mesmo tempo não foi inferior ao obtido quando dois extratos foram preparados separadamente com um solvente de cada vez, com a mesma técnica, independentemente se a resposta monitorada tenha sido o número de picos ou a área total dos picos (1-Mac versus 2-Mac e 1-UAEP versus 2-UAEP, na Figura 2). Ou seja, eles levaram ao mesmo grau de informação química da amostra, apesar do fato de que (i) as extrações com duas fases líquidas 2-Mac e 2-UAEP empregavam metade da massa total da amostra usada quando ambas extrações de uma fase líquida foram realizadas individualmente e (ii) que a proporção final entre amostra:solvente para 2-Mac e 2-UAEP foi de 1:20 (m/v), enquanto que foi de 1:10 (m/v) para a extração com solventes individuais. Esses resultados sugerem fortemente que não haveria razão para escolher duas extrações únicas (uma focada na extração de metabólitos polares e semi-polares e a outra em apolares), se as condições testadas aqui fossem mantidas. Isso dobraria o tempo gasto em extrações, o consumo de energia e a quantidade de amostra, sem fornecer vantagens adicionais. Este último é um ponto muito sensível quando são realizados estudos com uma quantidade muito limitada de amostra.²⁰

Além disso, as extrações com duas fases líquidas, conforme realizadas neste estudo, também eliminam a necessidade de um pré-tratamento da amostra (“*clean up*”) antes de injetá-la em um sistema UHPLC de fase reversa. Isso geralmente é necessário ao lidar com uma matriz complexa, pois sua extração diretamente com EtOH-H₂O 7:3 (v/v) levaria à extração de uma determinada quantidade de compostos apolares (como componentes de cera, no caso do bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo), além dos compostos polares e semi-polares desejados. Compostos altamente apolares tendem a aderir irreversivelmente à coluna C18, diminuindo assim sua eficiência. O pré-tratamento mais empregado usualmente para eliminar compostos interferentes e reduzir a complexidade da amostra é a extração em fase sólida, mas há pesquisadores que ainda usam extração líquido-líquido para fazer isso.^{20,24} Historicamente, os primeiros protocolos de separação metabolômica em duas fases líquidas foram orientados por essa necessidade. Neles, um solvente apolar, indutor de separação, deveria ser adicionado no final do procedimento de extração para obter uma extração líquido-líquido.²⁷ Depois, a fração lipofílica era frequentemente descartada mesmo quando uma abordagem metabolômica ampla era adotada. Paradoxalmente, nesse caso, era preparavam outro extrato, mas focado na

extração de compostos apolares usando um protocolo de preparação de amostras lipofílicas.²⁰ Embora isso ainda ocorra atualmente, nos últimos anos, procedimentos populares de preparação de amostras tentaram gerar frações ricas em compostos hidrofílicos e lipofílicos para serem analisadas separadamente sob diferentes condições ou plataformas de separação.^{17,20,24,25,27} Alguns inconvenientes dessas abordagens, tanto do ponto de vista da Química Verde quanto em termos de eficiência de extração para compostos apolares, foram mencionados anteriormente na seção introdutória deste trabalho.

4.5. Avaliação do impacto ambiental dos processos de extração

Os impactos ambientais dos procedimentos de extração devem ser medidos empregando-se uma métrica heurística multifatorial que seja facilmente aplicável e interpretada para processos analíticos.⁴⁶ Assim, uma avaliação adequada do impacto ambiental deve considerar, de maneira quantitativa, todos os produtos químicos e energia consumidos durante o processo analítico.^{46,47} Até onde sabe-se, não há uma métrica para química analítica que considera e analisa todos esses fatores isoladamente, com suficiente poder discriminante; no entanto, há métricas disponíveis complementares que podem ser combinadas. Uma métrica semi-quantitativa desenvolvida para avaliar o grau de veracidade dos processos químicos analíticos (*Analytical-Eco Scale*)³⁶ foi aplicada em conjunto com uma métrica quantitativa projetada para avaliar a veracidade de métodos de cromatografia líquida, chamada *HPLC-Environmental Assessment Tool*.³⁷ Os resultados estão resumidos na Tabela 1. Esta tabela também mostra o consumo de energia e o número total de picos obtido para as extrações, de forma a fornecer uma visão mais ampla dos processos em comparação.

De acordo com a *Analytical Eco-Scale*, que é baseada em pontos de penalidade subtraídos de 100 (um método verde ideal),³⁶ qualquer uma das extrações de duas fases líquidas alternativas com EtOH:H₂O 7:3 (v/v) e n-heptano deve ser preferida em relação aos métodos de referência (Tabela 1). Isso ocorreu devido à maior quantidade de solventes nocivos (MeOH e/ou n-hexano) e ao maior consumo de energia dos métodos de referência quando comparados às extrações alternativas com duas fases líquidas (Tabela 1). A extração baseada em Soxhlet exigiu 200 mL de n-hexano (um solvente com quatro pictogramas de risco GHS e considerado perigoso) e $0,525 \pm 0,012$ kWh por extração, obtendo uma pontuação final de 66 (o pior da série,

uma vez que quanto maior a pontuação ou mais próxima de 100, melhor a métrica). Este foi seguido pelo método descrito por Serradilla et al. (2-UAEE), com uma pontuação final de 77. Esse método exigiu 7,5 mL de MeOH e n-hexano (solventes com três e quatro pictogramas e sinalizados como perigosos) e $0,058 \pm 0,001$ kWh por amostra. O terceiro procedimento de menor pontuação (78) foi o descrito por Colombo et al., que demandou 39 mL de MeOH e $0,234 \pm 0,023$ kWh em todo o processo analítico. As extrações de duas fases líquidas alternativas com EtOH: H₂O 7:3 (v/v) e n-heptano (EtOH e n-heptano contam dois e quatro pictogramas, respectivamente, ambos declarados como perigosos) foram consideradas as mais verdes, com uma pontuação final de 81. No entanto, de acordo com a classificação da escala proposta pelos autores, com exceção à extração que empregou 200 mL de n-hexano em um aparelho Soxhlet, por 4 h, todas as outras extrações poderiam ser consideradas excelentes análises verdes (> 75). Este é um exemplo da capacidade dessa métrica em discernir entre processos analíticos que apresentam altas diferenças nos consumos de solvente e energia, bem como sua limitação no auxílio para o ajuste fino dos procedimentos analíticos, visando um menor impacto ambiental. Por exemplo, não foi possível discernir entre 2-UAEE e 2-Mac, embora o primeiro exija um agitador magnético junto com um ultrassom de sonda, e apenas uma amostra possa ser extraída por vez, enquanto o último emprega apenas um agitador magnético e três amostras foram preparadas concomitantemente. Isso significa que o 2-UAEE demandou 4,8 vezes mais energia que o 2-Mac, levando ao mesmo grau de informação química (Tabela 1). Isso ocorreu porque a *Analytical Eco-Scale* atribui pontos de penalidade por faixa de consumo de solvente e energia.⁴⁶ Devido a essa limitação, 2-UAEE, 2-Mac, 2-UAEP, 2-UAEB, 2-Vort, 1-Mac e 1-UAEP não obtiveram pontos de penalidade para o parâmetro de energia ($< 0,1$ kWh). Essa métrica também não conseguiu discernir entre a utilização de hexano e n-heptano na pontuação final, uma vez que ambas receberam quatro pictogramas e são consideradas perigosas. No entanto, o último é preferido em relação ao primeiro, do ponto de vista da Química Verde, devido aos seus menores impactos potenciais à saúde e à segurança do analista.²⁶

Desta maneira, foi aplicada a métrica complementar HPLC-EAT (Equação 1), já empregada anteriormente neste trabalho, uma vez que também inclui o impacto na preparação da amostra antes das análises por HPLC. Essa métrica quantitativa fornece informações sobre segurança, saúde e meio ambiente (SHE) de produtos

químicos, bem como considera suas quantidades em massa, conforme mostrado na Equação 1. Diferentemente da *Analytical-Eco Scale*, quanto menor a pontuação final calculada por HPLC-EAT, mais verde é o método. Neste caso, as pontuações finais do HPLC-EAT foram calculadas com as pontuações SHE padrão fornecidas por Hungerbühler e colaboradores,³⁸ e com as do CHEM-21.²⁶ Como a ordem do grau de verdura foi exatamente a mesma para ambas, apenas as primeiras pontuações foram apresentadas na Tabela 1. A HPLC-EAT corroborou a métrica aplicada anteriormente, indicando (i) que qualquer uma das extrações de duas fases líquidas alternativas com EtOH:H₂O 7:3 (v/v) e n-heptano deve ser preferida em relação aos métodos de referência, que empregaram MeOH e/ou n-hexano e (ii) que a extração que utilizou aparato Soxhlet e n-hexano foi a pior da série. Ela foi capaz de diferenciar 2-UAEE com MeOH:H₂O 8:2 (v/v) e n-hexano, como proposto originalmente por Serradilla et al., de 2-UAEE com EtOH:H₂O 7:3 (v/v) e n-heptano, mais verdes (32,66 e 30,09, respectivamente). Ambas fases líquidas foram responsáveis por essa discriminação, uma vez que todos os quatro solventes orgânicos receberam diferentes pontuações SHE. No entanto, todas as extrações de duas fases líquidas com EtOH:H₂O 7:3 (v/v) e n-heptano alcançaram uma pontuação final de 30,09 (Tabela 1). Isso ocorre porque HPLC-EAT não considera o consumo de energia de um processo, enquanto *Analytical Eco-Scale* considera, mas com a limitação discutida anteriormente.

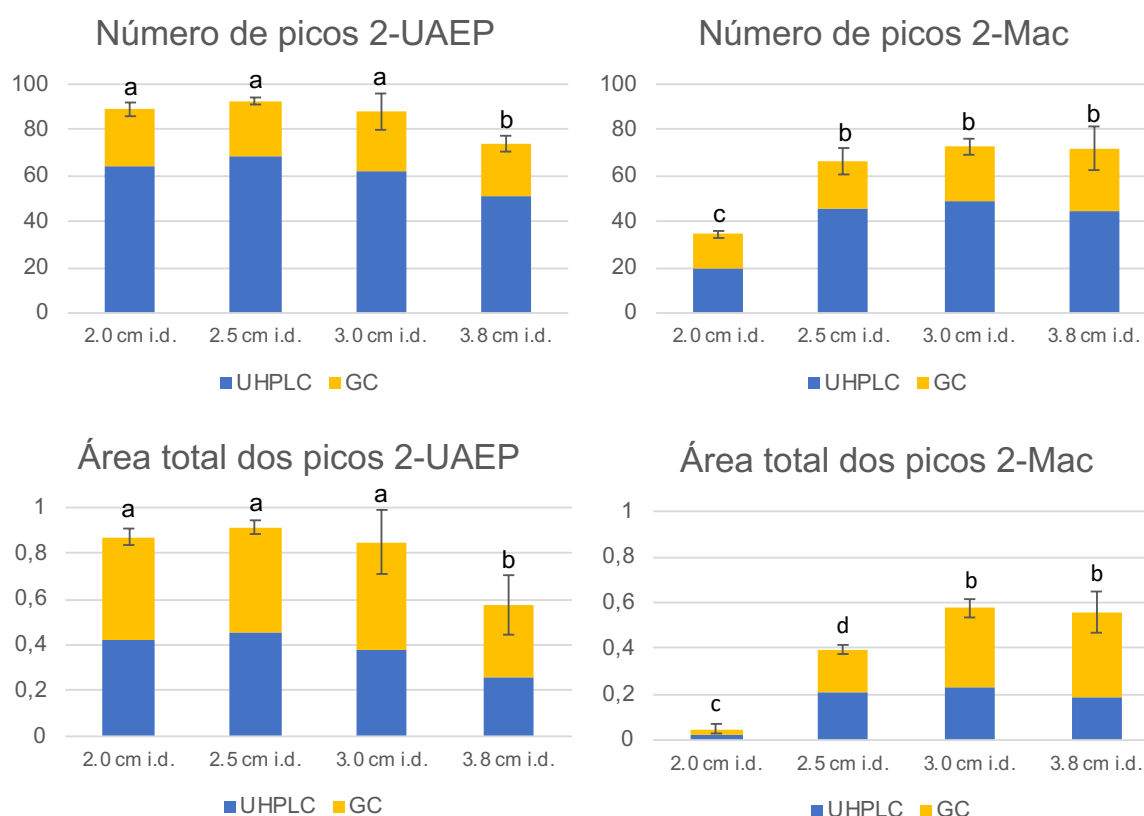
Apesar disto, as pontuações HPLC-EAT podem ser analisadas juntamente com o consumo de energia por amostra (Tabela 1), de forma a obter uma visão mais ampla do impacto ambiental dos processos. Assim, 2-Mac e 2-UAEB aparecem como as extrações mais verdes, pois estão no grupo com menor impacto ambiental (pontuação HPLC-EAT de 30,09, Tabela 1), exigindo apenas 0,013 e 0,016 kWh por amostra, respectivamente. Por outro lado, as extrações que requerem uma sonda de ultrassom (2-UAEE e 2-UAEP) só podem executar uma amostra de cada vez, exigindo mais energia por amostra (62 e 59 kWh, respectivamente) (Tabela 1).

4.6. A influência da geometria do recipiente de extração

Ao longo do trabalho, mostrou-se interessante verificar se a geometria do frasco de extração influencia ou não a eficiência da extração quando é realizada uma extração com duas fases líquidas. Isso porque com a mesma quantidade de bagaço (750 mg) e solventes imiscíveis (7,5 mL da solução hidroetanólica e 7,5 mL de n-heptano), quando recipientes com 2,0 ou 3,0 cm de d.i. foram utilizadas, foi observada

uma diferença na superfície de contato inicial entre as fases líquidas, bem como na altura das colunas da fase líquida da ordem de 2,25 vezes (as áreas de superfície entre as fases líquidas foram de 3,14 e 7,07 cm², enquanto as alturas das colunas líquidas foram de 4,84 e 2,15 cm para os frascos com 2,0 e 3,0 cm de d.i., respectivamente). A hipótese era que isso também influenciaria o grau de contato entre as fases líquidas e a matriz sólida após o início da extração. Assim, dois frascos de diâmetros internos intermediários foram incluídos na análise. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 3.

Figura 3 - Efeito do diâmetro interno (d.i.) do recipiente de extração na eficiência de 2-UAEP, a 20 kHz, 125 W (esquerda) e 2-Mac a 30 °C, 1400 rpm. Letras minúsculas distintas acima das barras indicam diferenças significativas entre as extrações em frascos com diferentes d.i. As análises estatísticas foram realizadas considerando todos os resultados para a mesma resposta monitorada.



Para 2-Mac, foi observado um aumento no número de picos com o aumento no d.i. do frasco até 3,0 cm ($34,3 \pm 1,5$, $66,3 \pm 5,8$, $72,7 \pm 3,5$ e $72,0 \pm 9,5$ picos para 2,0, 2,5, 3,0 e 3,8 cm, respectivamente). A partir de 3,0 cm, um aumento no diâmetro interno do recipiente não mais influenciou positivamente a eficiência da extração (Figura 3). Considerando o número de picos total obtido para cada extração, uma análise ANOVA com nível de confiança de 95% seguida por um teste de Tukey

mostrou que apenas o recipiente de 2 cm d.i. poderia ser considerado diferente, sendo o pior da série. Para a área total dos picos como resposta, no entanto, apenas os frascos com 3,0 e 3,8 cm d.i. não diferiram estatisticamente entre si, levando às melhores respostas (Figura 3). Como consequência, o recipiente escolhido como ideal para extrações 2-Mac foi de 3,0 cm d.i., uma vez que obteve quantitativamente o maior número de picos e área total dos picos, enquanto obtendo o menor desvio padrão (Figura 3).

O efeito oposto foi observado para o 2-UAEP. A partir do frasco de 2,5 cm d.i., o número médio de picos diminuiu com o aumento do diâmetro do frasco ($89,0 \pm 3,0$, $92,7 \pm 1,5$, $88,0 \pm 7,9$ e $74,0 \pm 3,5$ para os *vials* de 2,0, 2,5, 3,0 e 3,8 cm, respectivamente). Não importou se a resposta monitorada foi o número de picos ou a área total dos picos, ANOVA com nível de confiança de 95%, seguida pelo teste de Tukey, evidenciou que apenas o recipiente de 3,8 cm d.i. pode ser considerado estatisticamente diferente, com o pior resultado (Figura 3). O recipiente com 2,5 cm de diâmetro interno foi escolhido para a extração seguinte utilizando 2-UAEP, pois obteve o maior número de picos com o menor desvio padrão. Como observado visualmente, o frasco de 2,5 cm d.i. permitiu uma melhor circulação das fases, promovendo uma mistura completa entre as fases do sistema (líquidas e sólida). Além disso, perdas de vazamento, que ocorreram principalmente nos *vials* de 3,0 e 3,8 cm, foram menos observadas.

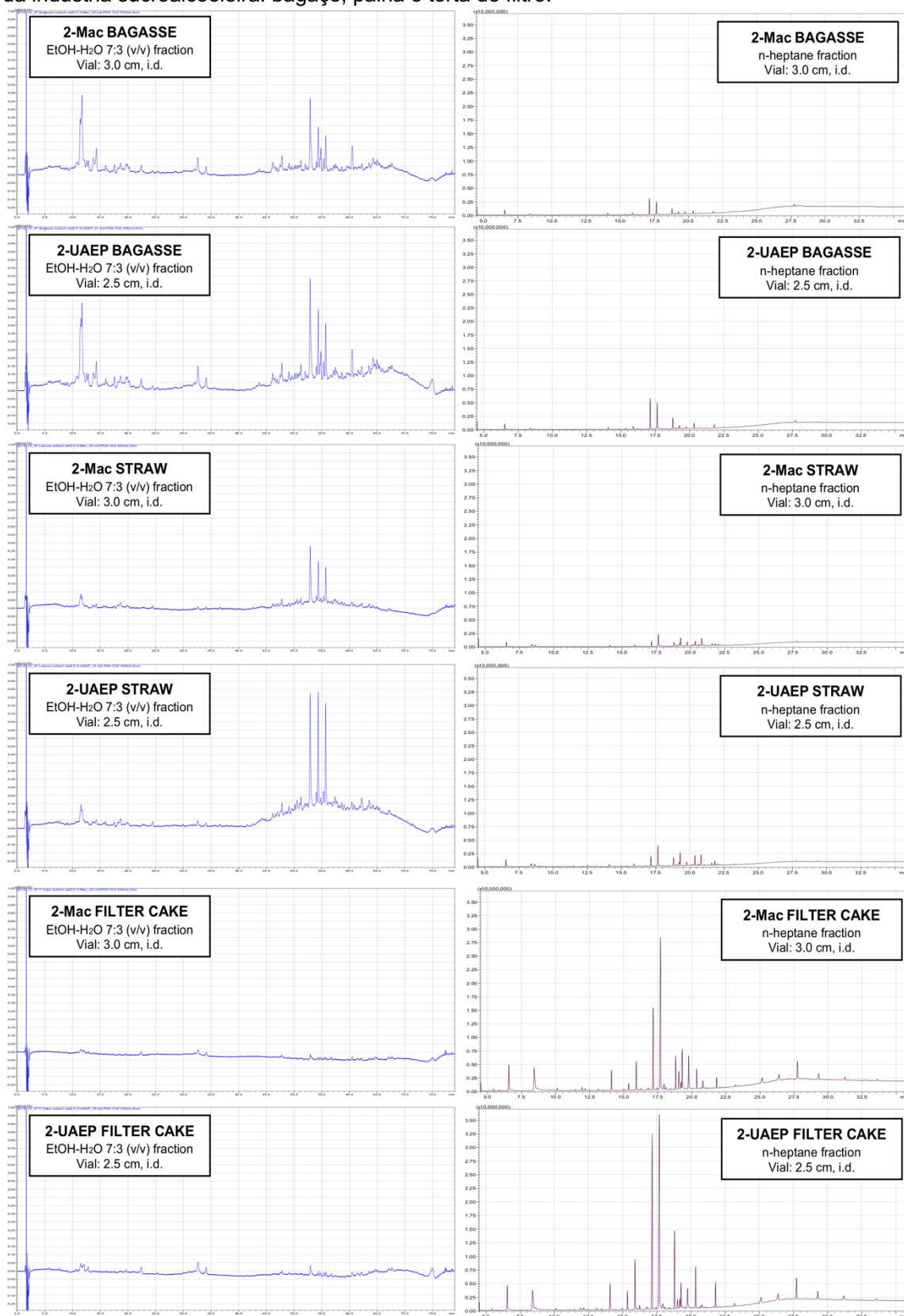
Comparando-se os melhores resultados obtidos para ambas as técnicas, 2-UAEP em um frasco de 2,5 cm d.i. levou a um número maior de picos e área total dos picos do que o observado para 2-Mac com recipiente de 3,0 cm (Figura 3). A superioridade do primeiro foi confirmada por ANOVA seguida pelo teste de Tukey (Figura 3). No entanto, os dois tipos de extração foram selecionados para a aplicação em uma análise metabolômica ampla, por três razões principais: (i) um aparelho de ultrassom com sonda nem sempre está disponível em laboratórios, enquanto agitadores magnéticos são mais acessíveis, pois são mais baratos e versáteis; (ii) múltiplas amostras podem ser extraídas de uma só vez em um agitador magnético, o que acelera a investigação enquanto reduz a quantidade de energia gasta por amostra, conforme demonstrado; e (iii) em metabolômica, a maceração dinâmica pode ser usada ao menos como extração controle, uma vez que é uma técnica mais amena do que a extração assistida por ultrassom, mais energética, que pode induzir a

formação de artefatos.³¹ Assim, extrações com ambas as técnicas foram processadas e seus perfis cromatográficos comparados.

4.7. Identificação de produtos naturais nos três principais resíduos sólidos de cana-de-açúcar

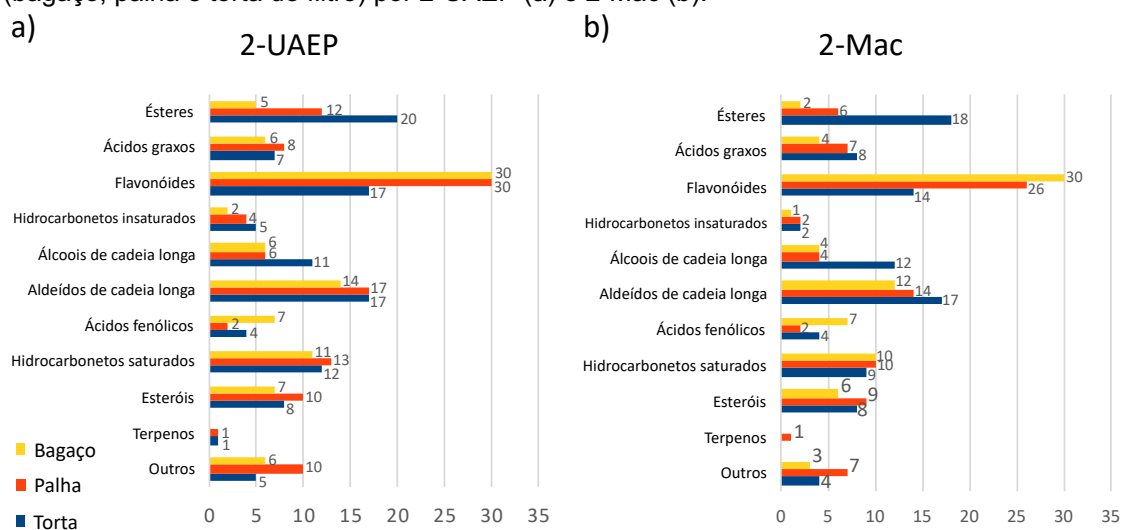
Uma vez definidas as melhores configurações experimentais para extração de metabólitos em bagaço de cana-de-açúcar, foi realizado um novo conjunto de extrações, incluindo os outros dois subprodutos sólidos mais abundantes da indústria da cana (palha e torta de filtro), aplicando esses procedimentos. Os cromatogramas representativos para cada resíduo sólido extraído por 2-UAEP (com recipiente de 2,5 cm d.i.) e 2-Mac (com recipiente de 3,0 cm d.i.) com EtOH-H₂O 7:3 (v/v) e n-heptano juntos são mostrados na Figura 4. A etapa seguinte consistiu em analisar suas abrangências em gerar dados espectrais ricos em informações para uma grande variedade de produtos naturais.

Figura 4 - Cromatogramas das frações polares e apolares obtidos por UHPLC-UV a 350 nm (à esquerda) e GC-MS (à direita), respectivamente, por dois diferentes métodos de extração: 2-UAEP, utilizando um recipiente de 2,5 cm d.i. e 2-Mac, usando um recipiente de 3,0 cm d.i., para três resíduos da indústria sucroalcooleira: bagaço, palha e torta de filtro.



Considerando a soma dos extratos hidroetanólico e n-heptanânico, o número total de compostos tentativamente identificados em bagaço de cana, excluindo aqueles em que apenas sugeriu-se uma fórmula molecular validada ou uma classe de composto, foram 92 e 77 para 2-UAEP e 2-Mac, respectivamente. Para a palha, o número total de picos tentativamente identificados foi 111 e 87, enquanto foram 106 e 95 para a torta de filtro, com 2-UAEP e 2-Mac, respectivamente. A Figura 5 fornece uma visão geral dos compostos identificados pelas principais classes. As Tabelas 2 e 3, fornecem a lista de compostos identificados, por tipo de extração, por matriz sólida. Até onde se buscou, esse é o mais amplo perfil metabólico apresentado para subprodutos da cana-de-açúcar em um único trabalho. Outros trabalhos concentraram-se em polaridades específicas (*targeted*), sejam compostos polares a semi-polares ou apolares, quando as extrações foram realizadas com uma única fase líquida. Além disso, o melhor resultado alcançado pela *Ultrasound-Assisted Emulsification-Extraction* (2-UAEE), como proposto por Luque de Castro e colaboradores, foi para casca de laranja em uma abordagem ampla, não direcionada (*untargeted*).³⁰ Foram tentativamente identificados 22 compostos por HPLC-MS/MS e outros 18 tiveram suas famílias químicas sugeridas. Esses resultados serviram como parâmetros que evidenciaram o sucesso das extrações 2-UAEP e 2-Mac aqui apresentadas. Em outras palavras, as duas estratégias desenvolvidas alcançaram excelente faixa dinâmica de polaridade, levando à extração e identificação desde a sacarose, altamente polar, até ao n-hexatriacontanal, altamente apolar, ou mesmo um éster de cera de cadeia longa (C53).

Figura 5 - Número de compostos identificados por classe em três subprodutos de cana-de-açúcar (bagaço, palha e torta de filtro) por 2-UAEP (a) e 2-Mac (b).



4.8. Identificação de compostos por UHPLC-PAD/UV-ESI-TOF-MS

As frações hidroetanólicas obtidas por 2-UAEP e 2-Mac para bagaço, palha e torta de filtro foram analisadas por UHPLC-PAD/UV-ESI-TOF-MS e metabólitos foram anotados de acordo com Funari et al. e Wolfender et al.^{22,34}

O procedimento completo para um composto selecionado será descrito a seguir. Inicialmente, foi obtida uma razão m/z de 577,1556 durante uma análise por HPLC-PAD/UV-HRMS da fração hidroetanólica (2-UAEP) do bagaço, em modo negativo. Este m/z foi utilizado para gerar uma lista de fórmulas moleculares compatíveis, com uma tolerância de até 5,0 ppm (1º filtro). O software do instrumento gerou uma lista de 18 fórmulas moleculares, incluindo C, H, O e N. Em seguida, cada fórmula da lista foi introduzida no SciFinder. A fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{14}$ gerou uma lista de 317 compostos com essa fórmula molecular (2º filtro). A lista de referências relacionadas a estes compostos foi refinada com a palavra-chave “*sugarcane*” ou “*Saccharum*”, reduzindo a lista de possíveis candidatos a apigenina-6-C-glucosil-rhamnosídeo, apigenina-8-C-glucosil-rhamnosídeo, vitexins-7-O-rhamnosídeo e luteolina-8-C-ramnosil-7-O-ramnosídeo (3º filtro). Em seguida, os espectros UV e MS esperados/teóricos para estes candidatos restantes foram testados quanto à sua compatibilidade com os espectros UV e MS obtidos experimentalmente durante as análises de HPLC-PAD/UV-HRMS (Figura 6). Para este caso específico, um UV_{max} de 270 nm e 327 nm obtido provou ser compatível com uma flavona, enquanto o espectro MS era típico de flavonas C-glicosiladas com uma ramnose adicional ligada à hexose, levando a uma perda inicial de 146 u.m. e perda posterior de 18 u.m. (H_2O), característica de 6-C-heterosídeo com 2 hidroxilas vizinhas (5-OH e 7-OH), com perda de 90 ($^{0,3}X$) e 120 ($^{0,2}X$) de clivagens de anel cruzado em uma hexose (4º e 5º filtros) (Figura S2).⁴⁸ Assim, o composto com tempo de retenção 17,09 min foi identificado como apigenina-6-C-glucosil-rhamnosídeo. O mesmo procedimento foi aplicado para identificar outros compostos nos três subprodutos da cana-de-açúcar sob investigação, e os resultados estão resumidos na Tabela 2.

Um total de 38, 33 e 23 compostos (2-UAEP) e 38, 30 e 20 (2-Mac) foram identificados nas frações hidroetanólicas de bagaço, palha e torta de filtro, respectivamente, enquanto outros 16, 19 e 15 (2-UAEP) e 18, 11 e 15 (2-Mac) tiveram suas fórmulas moleculares sugeridas (Tabela 2).

Figura 6 - Espectros *online* de massas de alta resolução e ultravioleta (A e B, respectivamente) do candidato com razão m/z 577,1556 obtido na fração EtOH:H₂O 7:3 (v/v) de extrato de bagaço.

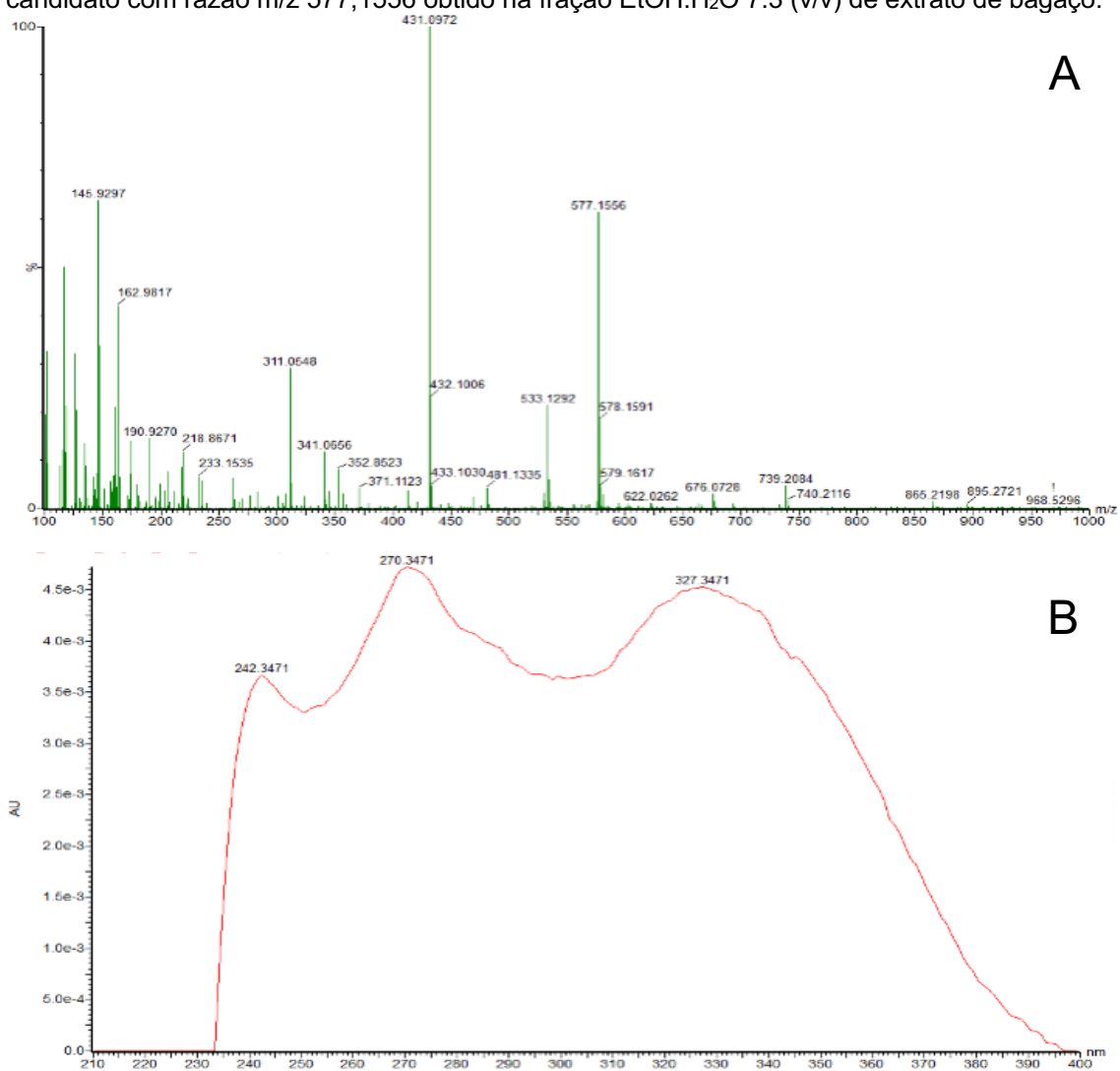


Tabela 2 - Lista de compostos tentativamente identificados e sua ocorrência em extratos hidroetanólicos de subprodutos da cana-de-açúcar obtidos por 2-UAEP, com recipiente de 2,5 cm d.i. e 2-Mac, com recipiente de 3,0 cm d.i.

Composto	t _R (min)	Fórmula molecular neutra	Massa medida (modo -) (Δppm)3	Fragmentos MS no modo - (abundância relativa)	Massa medida (modo +) (Δppm)3	Fragmentos MS no modo + (abundância relativa)	UVmáx (nm)	2-UAEP				2-Mac				Referências
								B	P	T	B	P	T	B	P	
Sacarose	1.47	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341.1089 (1.5)	341.1089 (100),	-	-	211, 269	+	+	+	+	+	+	+	11	
				377.080 (45),												
				179.0556 (16), 165.0399 (15)												
Ácido gentísico 5-O-β- glucosídeo	2.59	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	315.0705 (3.5)	145.9296 (100),	-	-	215, 281	+	+	+	+	+	+	+	11	
				162.9816 (69),												
				315.0705 (45)												
Ácido gentísico 2-O-β- glucosídeo	2.89	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	315.0708 (2.5)	145.9297 (100),	-	-	218, 278	+	+	+	+	+	+	+	11	
				162.9818 (70),												
				169.0495 (59) 315.0708 (39)												
Ácido sinápico	3.14	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	223.0600 (2.7)	223.0600 (100),	-	-	214, 281	+	+	+	+	+	+	+	49-54	
				145.9297 (78),												
				162.9818 (52)												

Ácido clorogénico (ácido trans-4-cafeoilquinico)	5.33	$C_{16}H_{18}O_9$	353.0869 (1.1)	191.0550 (100), 145.9297 (81), 162.9818 (53) 353.0869 (19)	-	211, 255	+	+	11,52,55-57
	5.72	$C_{17}H_{20}O_9$	367.1020 (2.5)	193.0493 (100), 271.0961 (92), 145.9296 (92), 367.1020 (25)	-	230, 281	+	+	11,56
	7.41	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.1456 (0.0)	609.1456 (100), 145.9296 (79), 162.9818 (52), 351.1284 (24)	611.1613 (0.2)	238, 282	+	+	51,58,59
	7.98	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1500 (1.0)	145.9295 (100), 593.1500 (74), 162.9816 (71), 517.1549 (19)	595.1660 (0.5)	239, 281	+	+	11,60
Luteolina-6-C-arabinosil-8-C-glucosídeo (Isocarlinosídeo)	8.58	$C_{26}H_{28}O_{15}$	579.1349 (0.2)	579.1349 (100), 145.9296 (100), 162.9817 (69), 467.1547 (22), 563.1399 (16)	581.1503 (0.5)	238, 274	+	+	11
				279.0933 (100), 128.9510 (86), 141.9591 (67), 224.1280 (18), 581.1503 (6), 469.1700 (2),					

Luteolina-6-C-glucosil-8-C-arabinosideo (Neocarlinosideo)	8.64	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	579.1343 (1.2)	579.1343 (100), 467.1542 (96), 145.9295 (87), 563.1393 (80), 162.9816 (62)	581.1505 (0.2)	279.0935 (100), 128.9510 (88), 158.9616 (63), 224.1281 (18), 581.1505 (8), 491.1526 (5)	238, 273	+ + + + + + + +	11,60
A (Ácido fendólico)	9.04	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	371.0971 (1.9)	515.1909 (100), 145.9295 (76), 371.0971 (71), 249.0601 (39), 467.1689 (19)	-	-	229, 276	+ + + + + + + +	-
β-D-Glicopiranoze (ácido p-cumaroilglicosideo)	10.30	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	325.0917 (1.8)	145.9296 (100), 265.0704 (83), 325.0917 (51), 193.0494 (45)	-	-	238, 318	+ + + + +	11,56
Diosmetina 7-O-β-D-glicopiranosil-(6←1)-α-L-arabopiranosideo	10.36	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1502 (0.7)	593.1502 (100), 145.9296 (67), 515.1909 (48), 162.9816 (46)	595.1661 (0.3)	279.0936 (100), 128.9511 (89), 158.9616 (64), 595.1661 (10), 309.0969 (6), 354.2850 (5)	238, 318	+ + + + + + + +	13
Apigenina-6-C-arabinosil-8-C-glicosideo (Isoschaftosideo)	11.11	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563.1402 (0.2)	119.0493 (100), 563.1402 (81), 163.0390 (5), 145.9296 (4)	565.1557 (0.0)	147.0443 (100), 279.0934 (54), 565.1557 (43), 186.9565 (20), 224.1280 (10), 423.0401 (10)	228, 309	+ + + + + + + +	56,61-68

Isoorientina	11.23	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0919 (100),	449.1081 (0.7)	128.9510 (100),	235,	+	+	+	+	11,50,69
			119.0491 (63), 145.9296 (34), 327.0494 (23), 357.0602 (21)								
Luteolina 8-C- neohesperidosídeo	11.63	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1505 (100),	595.1659 (0.7)	279.0935 (100),	238,	+	+	+	+	63
			623.1609 (89), 145.9296 (39), 162.9817 (27), 447.0918 (23)								
Orientina	12.01	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0920 (100),	-	-	-	+	+	+	+	11,13,50,60,64-67,70
			145.9296 (35), 116.9272 (26), 162.9817 (24), 327.0497 (14)								
Quercitrina	12.24	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-	449.1074 (2.2)	128.9508 (100),	242,	+	+	+	+	51,58
			461.1080 (100), 145.9297 (20), 447.0918 (7)								
Swertiajaponina	12.42	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461.1080 (100),	463.1238 (0.4)	279.0935 (100),	242,	+	+	+	+	60,67
			145.9297 (20), 447.0918 (7)								

Neoisoschaftosídeo ou seu isômero	12.89	$C_{26}H_{28}O_{14}$	563.1395 (1.1)	145.9297 (100),	565.1557 (0.0)	279.0935 (100),	+	+	+	+	+	+	242, 282sh	56.60-68
				563.1395 (96),		186.9565 (42),								
				162.9816 (71),		224.1281 (18),								
				461.1077 (47)		303.8844 (5),								
Apigenina-6-C-glicosídeo-8-C-arabinosídeo (Schaftosídeo)	13.15	$C_{26}H_{28}O_{14}$	563.1401 (0.0)	563.1401 (100),	565.1555 (0.4)	279.0934 (100),	+	+	+	+	+	+	241, 277, 318	12.56.61-68
				145.9297 (38),		224.1280 (18),								
				162.9817 (25),		565.1555 (14),								
				549.1254 (16)		303.8842 (5),								
Luteolina-6,8-C-diarabinosídeo	13.18	$C_{25}H_{26}O_{14}$	549.1254 (1.8)	563.1401 (100),	-	-	+	+	+	+	+	+	241, 277, 318	11
				549.1254 (16),										
				461.1081 (8),										
				352.8524 (5),										
Neoisoschaftosídeo ou seu isômero	14.17	$C_{26}H_{28}O_{14}$	563.1399 (0.4)	563.1399 (100),	565.1558 (0.2)	279.0936 (100),	+	+	+	+	+	+	241, 281	56.60-68
				145.9296 (91),		141.9592 (69),								
				162.9816 (61),		224.1281 (18),								
				537.1604 (40),		565.1558 (6),								
Apigenina-8-C-glicosilarabinosídeo	15.45	$C_{26}H_{28}O_{14}$	563.1406 (0.9)	563.1406 (100),	565.1556 (0.2)	279.0934 (100),	+	+	+	+	+	+	242, 273, 323	11
				145.9298 (32),		141.9591 (69),								
				162.9818 (21),		224.1280 (18),								
				227.0704 (13),		565.1556 (18),								
				389.1234 (9)		303.8842 (5),								
						354.2848 (5)								

Apigenina-6-C-glicosilarabinosídeo	15.52	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.0972 (1.4)	145.9297 (100),	433.1130 (1.2)	128.9510 (100),	+	+	+	+	242,	272,	321	11
				431.0972 (86),		279.0934 (95),								
				162.9817 (66),		303.8842 (6),								
				563.1401 (69),		433.1130 (5)								
Apigenina-6-C-glicosilrhamnosídeo	17.09	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	577.1556 (0.2)	431.0972 (100),	579.1711 (0.5)	128.9509 (100),	+	+	+	+	242,	273,	323	11
				577.1556 (62),		224.1279 (19),								
				145.9297 (61),		433.1129 (10),								
				162.9817 (40),		354.2947 (6),								
				533.1292 (21)	579.1711 (2)									
Apigenina-6,8-C-diarabinosídeo	17.28	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₃	533.1293 (0.4)	431.0972 (100),	-	-	+	+	+	+	242,	273,	323	11
				145.9297 (61),										
				162.9817 (40),										
				533.1292 (21),										
				218.8671 (11)										
B (Flavonóide)	18.45	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	577.1549 (1.4)	145.9295 (100),	-	-	+	+	+	+	244,	273,	322sh	-
				162.9816 (65),										
				577.1549 (19),										
				352.8520 (12),										
				513.1748 (8)										

Tricina 7-O-glicosídeo	32.86	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	491.1184 (1.2)	651.1584 (100), 491.1184 (3), 433.1490 (1)	493.1342 (0.8)	279.0933 (100), 128.9510 (95), 224.1280 (19), 354.2848 (6), 493.1342 (1)	247, 269, 347sh	+ + + + + + + +	11,56,62,64-66,68,73- 75
Tricina 7-O- rhamnosilgalacturonídeo	33.01	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₇	651.1564 (0.5)	651.1584 (100), 145.9296 (16), 491.1184 (3), 433.1490 (1)	653.1713 (0.8)	279.0933 (100), 128.9510 (95), 653.1713 (35), 224.1280 (19), 354.2848 (6), 493.1342 (1)	247, 269, 347sh	+ + + + + + + +	11,35,56,64,67,68,71,72
Isômero da tricina 7-O- neohesperidosídeo	34.48	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	637.1766 (0.5)	637.1766 (100), 145.9296 (33), 162.9816 (22), 218.8671 (6), 352.8521 (4)	639.1920 (0.8)	279.0934 (100), 186.9565 (42), 639.1220 (22), 224.1280 (19), 354.2848 (6), 494.8116 (1)	246, 271, 338sh	+ + + + + + + +	11,13,56,61,62,64- 66,69
1,3-Propanediol, 2-[4- [2,3-dihidro-3- (hidroximetil)-5-(3- hidroxi-1-propen-1-il)-7- metoxi-2-benzofuranil]- 2-metoxifenoxi]-1-(4- hidroxi-3,5- dimetoxifenil)-	47.03	C ₃₁ H ₃₆ O ₁₁	583.2181 (0.3)	583.2181 (100), 145.9294 (62), 277.0679 (45), 555.1864 (16), 401.0863 (11)	-	-	247, 274, 320sh	+ + + + + + + +	76

1,3-Propanediol, 2-[4-[2,3-dihidro-3-(hidroximetil)-5-(3-hidroxi-1-propen-1-il)-7-metoxi-2-benzofuranil]-2,6-dimetoxifenoxi]-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-	49.20	C ₃₁ H ₃₆ O ₁₁	583.2174 (0.9)	583.2174 (100), 277.0675 (77), 285.9634 (27), 555.1861 (17), 385.0910 (15)	-	-	247, 280, 316sh	+	+	+	+	+	+	76
	49.43	C ₃₃ H ₃₆ O ₁₆	687.1918 (1.0)	469.1878 (100), 277.0681 (55), 507.1284 (50), 687.1918 (31)	-	-	243, 283	+	+	+	+	+	+	11,13,35,64,66
Éter 7-O-glicopiranosídeo da tricina 4'-O-(eritro ou treo-β-guaiaçilgliceril)	50.50	C ₃₃ H ₃₆ O ₁₆	687.1920 (0.7)	507.1284 (100), 145.9296 (77), 277.0681 (57), 687.1920 (40)	-	-	243, 282	+	+	+	+	+	+	11,13,35,64,66
	51.56	C ₃₆ H ₄₂ O ₁₉ C ₄₂ H ₅₂ O ₁₆	777.2245 (0.4) 811.3159 (2.2)	581.2019 (100), 811.3159 (10), 777.2245 (9), 657.2172 (5), 277.0681 (7)	-	-	243, 282	+	+	+	+	+	+	NSSR (*)
Éter 7-O-glicopiranosídeo da tricina 4'-O-(eritro ou treo-β-guaiaçilgliceril)	53.18	C ₂₆ H ₂₆ O ₈ C ₃₇ H ₃₈ O ₁₅	465.1541 (1.7) 721.2131 (0.1)	329.0658 (100), 314.0421 (31), 581.2021 (18), 465.1541 (4), 721.2131 (4)	-	-	243, 270, 327	+	+	+	+	+	+	NSSR (*)

Éter da tricina 4'-O- (eritro ou treo-β- guaiacilgliceril)	54.73	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₁	525.1391 (1.1)	525.1391 (100), 809.3008 (19), 329.0652 (9), 670.0612 (2)	-	-	243, 283	+	+	+	+	+	13,35,64,66
					-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	55.23	C ₃₈ H ₄₄ O ₂₀	819.2350 (0.2)	819.2350 (100), 331.2479 (7), 521.1804 (2), 721.2493 (2)	-	-	243, 283	+	+	+	+	+	NSSR (*)
					-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	55.72			329.2329 (100), 413.1234 (11), 495.1291 (5), 581.2019 (1)	-	-	243, 284, 311	+	+	+	+	+	NSSR (*)
					-	-	-	-	-	-	-	-	-
Éter da tricina 4'-O- (eritro ou treo-β- guaiacilgliceril)	56.09	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₁	525.1396 (0.2)	525.1396 (100), 329.2326 (86), 329.0655 (16), 747.2647 (4), 581.2016 (3)	-	-	243, 285, 313	+	+	+	+	+	13,35,64,66
					-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	58.60	C ₃₇ H ₃₆ O ₁₄	703.2028 (0.1)	495.2592 (100), 703.2028 (13), 594.1774 (2), 162.9270 (8)	-	-	242, 283	+	+	+	+	+	NSSR (*)
					-	-	-	-	-	-	-	-	-

H	59.92	C ₄₀ H ₄₀ O ₁₃	727.2383 (1.1)	481.2799 (100), 527.2856 (89), 727.2383 (14), 162.9814 (10), 580.1967 (8)	-	-	242, 283	+	+	+	NSSR (*)
I	60.11	C ₄₀ H ₄₀ O ₁₃	727.2394 (0.4)	727.2394 (100), 329.2321 (5), 545.1805 (1)	-	-	243, 311sh	+	+	+	NSSR (*)
J	60.94	C ₄₀ H ₄₆ O ₂₁ C ₄₁ H ₄₄ O ₁₅	861.2460 (0.8), 775.2594 (1.0)	861.2460 (100), 923.3128 (19), 775.2594 (2)	-	-	244, 311	+	+	+	NSSR (*)
K	61.40	C ₄₀ H ₄₂ O ₁₃	729.2548 (0.1)	447.1331 (100), 729.2548 (28), 567.1498 (9), 701.2218 (6)	-	-	242, 285	+	+	+	NSSR (*)
L	64.01	C ₄₀ H ₄₀ O ₁₃	727.2391 (0.0)	727.2391 (100), 923.3123 (28), 653.1656 (5), 547.1600 (2)	-	-	244, 311	+	+	+	NSSR (*)

M	65.39	C ₄₀ H ₄₀ O ₁₃	727.2397	479.2645 (100),	-	-	243,	+	+	NSSR (*)
			(0.8)	727.2397 (4),						
				547.2516 (2),						
				465.2849 (2)						
N	66.37	C ₃₇ H ₃₂ O ₁₄	699.1716	511.2906 (100),	-	-	243,	+	+	NSSR (*)
			(0.3)	465.2849 (84),						
				699.1716 (5),						
				808.5342 (5),						
		610.2076 (6)								
O	67.56	C ₄₀ H ₃₈ O ₁₂ C ₃₈ H ₃₆ O ₁₁	709.2288	923.3132 (100),	-	-	244,	+	+	NSSR (*)
			(0.4)	667.2186 (65),						
			667.2186	709.2288 (16),						
			(1.0)	313.2375 (14)						
P	67.83	C ₄₀ H ₄₀ O ₁₃	727.2397	727.2397 (100),	-	-	244,	+	+	NSSR (*)
			(0.8)	311.2219 (71),						
				923.3129 (52),						
				293.2112 (27),						
		714.5077 (7)								
Q	68.06	C ₄₀ H ₄₀ O ₁₃	727.2394	727.2394 (100),	-	-	245,	+	+	NSSR (*)
			(0.4)	923.3129 (65),						
				313.2375 (33),						
				714.5075 (6)						

R	68.92	$C_{33}H_{56}O_{14}$	675.3597 (0.7)	675.3597 (100), 721.3649 (11), 649.3073 (9)	-	-	248, 312	+	+	NSSR (*)	
S	70.41	$C_{33}H_{58}O_{14}$	677.3752 (0.6)	595.2884 (100), 677.3752 (34), 723.3803 (4)	-	-	248, 312	+	+	NSSR (*)	
T	71.27	$C_{33}H_{58}O_{14}$	677.3763 (2.2)	677.3763 (100), 723.3818 (13), 504.3095 (10), 397.1346 (8), 609.2767 (6)	-	-	248, 312	+	+	NSSR (*)	
U	72.88	$C_{31}H_{58}O_{14}$	653.3761 (2.0)	653.3761 (100), 311.1682 (60), 480.3093 (24), 699.3815 (11), 540.3306 (8)	-	-	249, 311	+	+	NSSR (*)	
V	73.52	$C_{41}H_{69}N_3O_7$	714.5076 (2.7)	311.1679 (100), 714.5076 (19), 646.4083 (2)	-	-	250, 311	+	+	+	NSSR (*)
W	73.84	$C_{44}H_{65}N_7O_3$	738.5078 (0.9)	555.2842 (100), 311.1674 (10), 808.5345 (9)	-	-	250, 312	+	+	+	NSSR (*)

X	74.67	$C_{41}H_{69}N_3O_7$	714.5079	295.2273 (100),	-	246,	+	+	+	+	NSSR (*)
			(3.1)	714.5079 (15),							
				325.1833 (7)							
Y	74.82	$C_{41}H_{69}N_3O_7$	714.5080	295.2272 (100),	-	250,	+	+	+	+	NSSR (*)
			(3.2)	714.5080 (21),							
				277.2164 (22)							
Z	75.9	$C_{41}H_{69}N_3O_7$	714.5078	714.5078 (100),	-	277	+	+	+	+	NSSR (*)
			(2.9)	325.1835 (96),							
				293.2104 (64)							
AA	76.7	$C_{41}H_{69}N_3O_7$	714.5080	714.5080 (100),	-	274	+	+	+	+	NSSR (*)
			(3.2)	311.2009 (57),							
				646.4090 (20),							
				606.3775 (18)							

B = bagaço; P = palha; T = Torta de filtro

¹A ocorrência do composto em um dado extrato é indicado por (+)

²Compostos A-AA são de picos sem identificação com fórmula molecular validada, que não foram previamente identificados em extratos de cana-de-açúcar

³O erro m/z está indicado entre parênteses, alcançando um valor máximo de 3,5 ppm.

NSSR (*) significa que não foi reportado no SciFinder composto correspondente na busca por "sugarcane" ou "Saccharum".

4.9. Identificação de compostos por GC-MS

As frações de n-heptano obtidas por 2-UAEP e 2-Mac para bagaço, palha e torta de filtro foram analisadas por GC-MS, e identificações tentativas foram feitas comparando-se padrões de fragmentação e índices de retenção das bibliotecas NIST e WILEY com espectros obtidos experimentalmente. O procedimento completo para um composto selecionado (1-octacosanol) será discutido a seguir. Resumidamente, foi observado um pico em 17.687 min na fração n-heptânica de torta de filtro de cana-de-açúcar. As bibliotecas NIST e WILEY sugeriram 25 candidatos com mais de 94% de similaridade espectral. Em seguida, os índices de retenção teóricos destes candidatos foram comparados com o calculado experimentalmente, que foi 3114 (com base em uma série homóloga de hidrocarbonetos C_x-C_y). Esse filtro reduziu o número de candidatos para um (1-octacosanol). Quando se inseriu o número CAS (557-61-9) no campo “*substance identifier*” do banco de dados SciFinder, a lista de referências resultante foi refinada usando o tópico “*sugarcane*”, e foram encontrados 16 trabalhos de pesquisa que relataram esse composto em cana-de-açúcar. e/ou derivados. O mesmo procedimento foi aplicado para identificar outros compostos nos três subprodutos da cana-de-açúcar em investigação. Os resultados estão sumarizados na Tabela 3.

Como já observado anteriormente, os extratos n-heptânicos de torta de filtro exibiram o maior número e picos e os mais intensos. Isto foi traduzido em 83 compostos identificados para 2-UAEP (Tabela 3). Octacosanal e 1-octacosanol apresentaram os picos mais intensos do cromatograma (tempos de retenção de 17,161 e 17,687 min, respectivamente, Figura 4). O perfil obtido para a torta de filtro foi semelhante ao relatado na literatura, que indica a presença de hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, ácidos graxos e esteróis, como β -sitosterol, estigmasterol e campesterol.⁷⁷⁻⁷⁹

A palha foi o segundo subproduto em número de metabólitos identificados, com um total de 78 compostos (Tabela 3). Para esse extrato, 1-octacosanol e 1-dotriacontanol, dois policosanóis, apresentaram os picos mais intensos do cromatograma (tempos de retenção 17,657 e 20,816 min, respectivamente, Figura 4). Finalmente, 54 compostos foram identificados no bagaço. Os picos mais intensos foram aqueles atribuídos ao octacosanal e ao 1-octacosanol (tempos de retenção de 17,130 e 17,640 min, respectivamente, Figura 4).

Um total de 47 compostos foram tentativamente identificados com base no Índice de Retenção e nas bibliotecas acima mencionadas. No entanto, eles não estavam relacionados à pesquisa *sugarcane/Saccharum* no SciFinder.

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os de Attard et al.¹⁵, que publicaram uma investigação química abrangente sobre compostos lipofílicos em ceras de cana-de-açúcar. Eles relataram que (i) a palha tem um conteúdo lipofílico maior que o bagaço; (ii) as principais classes de compostos identificados na palha e no bagaço foram semelhantes; (iii) a palha é uma fonte de ésteres; (iv) aldeídos de cadeia longa são os principais compostos lipofílicos do bagaço, sendo 1-octacosanol e 1-octacosanal os metabólitos mais abundantes.¹⁵ Além disso, os esteróis também foram destacados nesse resíduo. No entanto, os trabalhos diferem em outros pontos. Por exemplo, os compostos mais frequentes relatados por esses autores em palha foram terpenos, enquanto aldeídos de cadeia longa não estavam abundantemente presentes nesse subproduto.¹⁵ Exatamente o oposto foi observado no presente trabalho: aldeídos de cadeia longa foram os mais frequentes e terpenos foram muito menos frequentes em palha de cana-de-açúcar. Enquanto Attard et al. descobriram que os ésteres de cera eram mais abundantes no bagaço do que na palha, o contrário foi observado neste trabalho (Tabela 3). Essas diferenças podem ser devidas à localização geográfica, estação de colheita e diferenças genéticas entre as amostras. Além disso, enquanto a amostra de palha desta pesquisa foi coletada diretamente do solo entre 1 e 7 dias após a colheita, e as amostras de bagaço foram coletadas em usinas diretamente após o processamento industrial da cana-de-açúcar, Attard et al. subdividiu e processou plantas de cana de açúcar por um ano em ambiente de laboratório antes de analisá-las.¹⁵

Tabela 3 - Lista de compostos tentativamente identificados e sua ocorrência nos extratos n-heptânicos de subprodutos da cana-de-açúcar, obtidos por 2-UAEP, com recipiente de 2,5 cm d.i e 2-Mac, com recipiente de 3.0 cm d.i.

Composto	R _{lcalc}	R _{lteór}	t _r	2-UAEP			2-Mac			Ref.
				Bagaço	Palha	Torta	Bagaço	Palha	Torta	
Ácidos graxos										
Ácido 1-tetradecanóico	-	1.769	4,614	X	X	X	X	X	X	80-88
Ácido n-Pentadecanóico	1.855	1.869	5,519		X	X			X	86,89
Ácido Palmítico (ácido 9-Hexadecenóico)	1.940	1.976	6,349	X		X			X	89
Ácido n-Hexadecanóico	1.960	1.968	6,548	X	X	X	X	X	X	14,15,61,81-97
Ácido n-Heptadecanóico	2.058	2.067	7,561	X	X	X	X	X	X	14,15,86,98,99
Ácido Linoleico	2.138	2.183	8,398	X	X	X	X	X	X	14,15,61,83,84,88,90,99 1,100,101
Ácido 9-Octadecenóico	2.141	-	8,428		X			X	X	102
Ácido esteárico (ácido 1-Octadecanóico)	2.161	2.167	8,638	X	X	X	X	X	X	14,15,83,84,86- 89,91,97-99,103
Ácido n-Eicosanóico	2.366	2.366	11,003		X			X		14,15,86,87,90,98,99
Hidrocarbonetos Saturados										
n-Octadecano	1.800	1.800	5,001	X				X		96,99
n-Eicosano	2.001	2.000	6,698	X	X			X		94,99

n-Heneicosano	2.101	2.100	8,004	X	X				83,94,96,99
n-Docosano	2.201	2.200	9,057	X	X	X			83,96
n-Tricosano	2.300	2.300	10,100	X	X	X	X	X	15,94,99,104
n-Tetracosano	2.401	2.407	11,140	X	X	X	X	X	94,96,99,104
n-Pentacosano	2.501	2.500	12,142	X	X	X	X	X	15,83,99,104
n-Hexacosano	2.600	2.606	13,115	X	X	X	X	X	94,96,99,104
n-Heptacosano	2.701	2.700	14,073	X	X	X	X	X	15,94,99,104,105
n-Octacosano	2800	2800	14,982	X	X	X	X	X	15,94,96,99,104
n-Nonacosano	2903	2900	15,901	X	X	X	X	X	15,94,99,104
n-Triacontano	3004	3000	16,772	X	X		X		94,96,99,104
n-Tritriacontano	3302	3300	19,183	X	X	X	X	X	99,104,105
Derivado de hidrocarboneto	3400	-	19,927	X	X				NSSR (*)
n-Pentatriacontano	3501	3500	20,676	X	X	X	X	X	15,104

Hidrocarbonetos Insaturados

1-Octadeceno	-	1.801	4,966	X					94
3-Octadeceno	-	1.818	4,946		X				NSSR (*)
Neofitadieno	1.843	1.838	5,407	X	X	X	X	X	NSSR (*)
2-Metil-7-octadecino	1.889	1.863	5,840	X			X		NSSR (*)
8-Heptadeceno	1.942	1.944	6,369	X					NSSR (*)
1-Docoseno	2.095	2.198	7,950		X				101

1,11,13-Octadecatrieno, (Z,E)-	2.135	1.685	8,362	X				NSSR (*)
1-Heptacoseno	2.686	2.688	13,930		X			NSSR (*)
1-Nonacoseno	2888	2888	15,769		X			NSSR (*)
Esteróis								
Campesterol	3013	2632	16,850		X			14,15,88,98,101,106-110
(Ergost-5-en-3-ol, (3 β ,24R)-)	3029	2579	16,975	X	X	X		NSSR (*)
Colesta-4,6-dien-3-ol, (3- β)-	3062	2861	17,253	X		X		NSSR (*)
3 β -Acetoxistigmasta-4,6,22-trieno	3078	3036	17,387		X		X	14
γ -Tocoferol	3084	2739	17,433	X	X	X		14,15,88,98,101,106-108,110,111
Estigmasterol	3144	2731	17,929	X	X	X	X	14,15,88,98,101,106-108,110,111
β -Sitosterol	3163	3149	18,084		X	X	X	14,94,112
Vitamina E (α -tocoferol)	3281	3290	19,018	X	X	X	X	108
Clionasterol	3423	3370	20,102	X	X	X	X	14,108
4-Campestene-3-ona	3435	2569	20,193		X		X	NSSR (*)
Colestan-3-ona	3480	2696	20,521	X	X	X	X	14
Estigmasta-3,5-dien-7-ona	3492	2827	20,609		X		X	15
β -Simiarenol								

14,108

X

3518 2714 20,808

Estigmast-4-en-3-ona

108

X

X

3596 2875 21,360

Estigmastane-3,6-diona, (5 α)-**Ésteres**

Acetato de Fitol	1887	5,820	X	X	NSSR (*)
Palmitato de etila	1.995	1.978	6,898	X	86,94,113
Tricloroacetato de tetradecila	2.198	2.166	9,026	X	NSSR (*)
Hexadecanoato de 2-hidroxietila	2.243	2.220	9,497	X	NSSR (*)
Éster de cera C21	2.253	2.210	9,604	X	NSSR (*)
Linoleato de etila	2.462	2.193	11,750	X	113
Heptadecanoato de heptadecila	2.479	3.568	11,923	X	NSSR (*)
Docosanoato de metila	2.486	2.500	11,990	X	NSSR (*)
Palmitato de glicerol	2.513	2.482	12,267	X	114
Éster de cera C26	2.772	2.749	14,780	X	NSSR (*)
Éster de cera C27	2881	2849	15,703	X	NSSR (*)
Éster de cera C30	3156	3149	18,022	X	NSSR (*)
Trifluoroacetato de octacosila	3200	3005	18,383	X	NSSR (*)
Carbonato de tridecyl vinila	3201	18,389	X		NSSR (*)
Heptanoato de docosila	3215	3071	18,496	X	NSSR (*)
Éster de cera C32	3327	3349	19,372	X	NSSR (*)
Éster de cera C33	3489	3449	20,586	X	NSSR (*)

Éster de cera C34	3532	3549	20,898		X	X	X	X	NSSR (*)
Éster de cera C36	3741	3749	22,334		X	X	X	X	NSSR (*)
Éster de cera C38	3977	3949	23,925		X	X	X	X	15
Éster de cera C40	4161	4149	25,133	X		X	X	X	15
Éster de cera C42	4354	4349	26,379		X	X	X	X	15
Éster de cera C44	4554	4549	27,725	X		X	X	X	15
Éster de cera C46	4782	4749	29,277		X	X	X	X	15
Éster de cera C49	5069	5049	31,185		X	X	X	X	15
Éster de cera C53	5427	5449	33,563		X	X	X	X	15

Aldeídos de cadeia longa

1-Octadecanal	2.025	1.999	7,209		X	X	X	X	NSSR (*)
1-Nonadecanal	2.127	2.102	8,282		X	X	X	X	NSSR (*)
Icosanal (1-Eicosanal)	2.228	2.221	9,345	X		X	X	X	NSSR (*)
1-Heneicosanal	2.331	2.307	10,415	X		X	X	X	NSSR (*)
1-Docosanal	2.432	2.408	11,453	X		X	X	X	14
n-Tricosanal	2.535	2.511	12,475	X		X	X	X	NSSR (*)
1-Tetracosanal	2.637	2.614	13,461	X		X	X	X	14,15,101,115
n-Pentacosanal	2739	2738	14,420	X		X	X	X	NSSR (*)
n-Hexacosanal	2841	2815	15,351	X		X	X	X	14,15,105,115-117
n-Heptacosanal	2943	2944	16,248	X		X	X	X	105

n-Octacosanal	3051	3014	17,161	X	X	X	X	X	X	14,15,92,105,115-118
n-Nonacosanal	3150	-	17,973	X						NSSR (*)
n-Triacontanal	3253	3251	18,799	X	X	X	X	X	X	14,15,105,115-118
n-Hentriacontanal	3352	3350	19,561	X	X	X	X	X	X	NSSR (*)
n-Dotriacontanal	3455	3450	20,339	X	X	X	X	X	X	15,105
n-Tritriacontanal	3555	3550	21,064							NSSR (*)
n-Tetatriacontanal	3659	3650	21,799	X	X	X	X	X	X	15,105
n-Hexatriacontanal	3862	3850	23,179	X	X	X	X	X	X	15,105

Álcoois de cadeia longa

9-Hexadecin-1-ol	1.903	1.872	5,974					X		NSSR (*)
9-Octadecen-1-ol, (Z)-	2.064	2.061	7,625	X	X	X	X	X	X	NSSR (*)
1-Octadecanol	2.085	2.053	7,842	X	X	X	X	X	X	99
18-Nonadecen-1-ol	2.171	2.143	8,747					X		NSSR (*)
1-Nonadecanol	2.195	2.153	9,002				X	X	X	NSSR (*)
1-Heneicosanol	2.396	2.400	11,086					X		99,101
9,12-Octadecadien-1-ol, (Z,Z)-	2.477	2.069	11,908					X		NSSR (*)
1-Tricosanol	2.596	2.577	13,079					X		99,119,120
1-Heptacosanol	3.004	3.016	16,768	X	X	X	X	X	X	88,99,119,121
1-Octacosanol	3.114	3.110	17,687	X	X	X	X	X	X	14,15,88,99,101,109,11 6,119-123

1-Triacontanol	3313	3246	19,265	X	X	X	X	X	X	14,15,88,99,101,116,119,121,122
1-Dotriacontanol	3521	-	20,816	X	X	X	X	X	X	14,15,88,119,121
1-Tetracontanol	3721	-	22,233	X	X	X	X	X	X	14,15,88,121

Terpenos

β -Farneseno	1.928	1.440	6,224	X	X	X	X	X	X	113,124
Friedelina	3.628	2.858	21,585	X	X	X	X	X	X	15

Outros

Fitona	1850	1841	5,474	X	X	X	X	X	X	15,102
Fitol	2.119	2.015	8,213	X	X	X	X	X	X	15,94,102
Éter trietilenoglicol monodecílico	2275	2.281	9,853	X	X	X	X	X	X	NSSR (*)
n-Heptadecilciclohexano	2.348	2.371	10,591	X	X	X	X	X	X	NSSR (*)
13-Docosenamida, (Z)-	2786	2625	14,857	X	X	X	X	X	X	NSSR (*)
9-Octadecenamida, (Z)-	2787	2397	14,858	X	X	X	X	X	X	¹⁰³
2-Nonadecanona	2922	2090	16,066	X	X	X	X	X	X	NSSR (*)
Éter octílico e tetraicosílico	3203	3252	18,407	X	X	X	X	X	X	NSSR (*)
Éter metílico e tetratriacontílico	3723	3630	22,245	X	X	X	X	X	X	NSSR (*)

NSSR (*) significa que não foi reportado no SciFinder composto correspondente na busca por "sugarcane" ou "Saccharum".

4.10. Aplicações potenciais para compostos selecionados de subprodutos

Esta seção destaca algumas aplicações potenciais de alguns produtos naturais identificados neste trabalho nos três principais subprodutos sólidos sucroenergéticos, mas não é uma revisão exaustiva da literatura. A Figura 7 ilustra alguns destes compostos. Por exemplo, muitas flavonas C-glicosiladas biologicamente ativas foram identificadas nos extratos hidroetanólicos dos subprodutos investigados, especialmente em bagaço e palha (Tabela 2). A orientina, por exemplo, exibe efeitos antibacterianos, antidepressivos, anti-inflamatórios, antivirais, vasodilatadores, cardioprotetores, neuroprotetores, anti-adipogênicos e antinociceptivos.¹²⁵ A apigenina-8-C-glicosil-arabinosídeo, encontrada nos três subprodutos sob investigação, pode ser hidrolisada para vitexina, um metabólito que recentemente recebeu maior atenção devido à sua ampla gama de efeitos farmacológicos ligados especialmente aos sistemas nervoso e cardiovascular central.¹²⁶ De fato, muitos estudos relataram seus efeitos anti-inflamatórios,¹²⁷ antidiabéticos,¹²⁸ anti-Alzheimer,^{128,129} anticâncer,¹³⁰ e anti-hipertensivos, entre outros.¹³¹

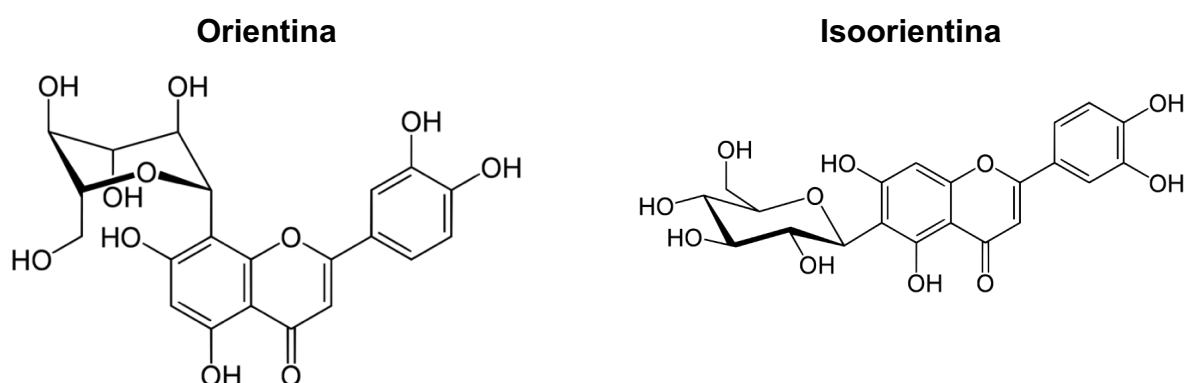
Compostos de grande interesse industrial também foram identificados nas frações n-heptânicas dos três subprodutos investigados, especialmente em torta de filtro. É possível citar o ácido hexadecanóico, 1-octacosanol, octacosanal, triacontanal e dotriacontanal (Tabela 3). O ácido hexadecanóico (também conhecido como ácido palmítico) é crucial em várias atividades fisiológicas, sendo o ácido graxo saturado mais comum encontrado no corpo humano. Pode ser fornecido a partir da dieta ou sintetizado endogenamente a partir de outros ácidos graxos, carboidratos e aminoácidos.¹³² Além disso, apresenta propriedades anti-inflamatórias,¹³³ provou ser eficiente no combate à desnutrição infantil¹³⁴ e pode ser adicionada a uma matriz gelatinosa para uso como esqueleto de cartilagem e tecido ósseo, investigado na área de bioengenharia.¹³⁵ Na engenharia, foi testado como anticorrosivo do aço¹³⁶ e utilizado na síntese de surfactantes para aplicações petrolíferas,¹³⁷ entre outros.

Estudos indicam que o 1-octacosanol desempenha um papel positivo em muitas funções fisiológicas, incluindo resistência à fadiga,¹³⁸ função cardiovascular reguladora,¹³⁹ atividade antitumoral,¹⁴⁰ auxiliar na redução de açúcar e lipídios no sangue,¹⁴¹ efeitos anti-inflamatórios,¹⁴² atividade anti-estresse e indutor de sono.¹⁴³ Comprovadamente seguro, este composto pode ser ingerido em formulações de medicamentos ou alimentos.¹⁴²

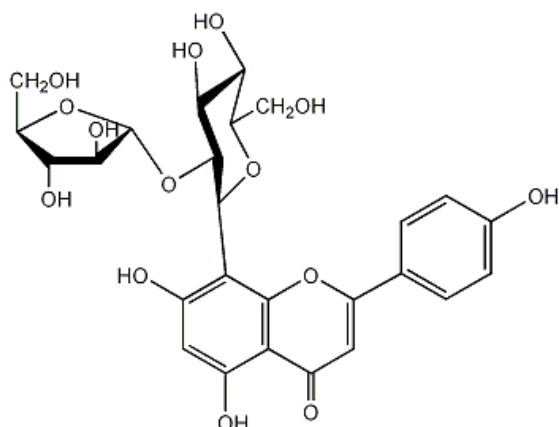
Os aldeídos de cadeia longa octacosanal, triacontanal e dotricontanal figuraram entre os compostos com maiores áreas relativas dos cromatogramas GC-MS para todas as matrizes estudadas. Foi demonstrado que o primeiro ajuda a prevenir e tratar a osteoporose e pode ser administrado com segurança e eficácia em alimentos e bebidas.¹⁴⁴ Foi relatado que o triacontanal estimula o crescimento em diferentes plantas, promovendo o aumento do peso seco, área foliar e níveis de açúcares redutores, aminoácidos e proteínas solúveis.^{145,146}

As misturas de compostos encontradas nesses subprodutos também podem agregar valor a esses subprodutos. Isso significa que muitas operações unitárias envolvidas no isolamento de compostos podem não ser obrigatórias para obter um produto bioativo. Por exemplo, álcoois graxos de cadeia longa (C16-C34) além de 1-octocosanol foram identificados nos três subprodutos investigados, levando a picos mais intensos no extrato de torta de filtro (Figura 4). Os chamados n-policosanóis melhoram o estado de humor, o que também parece influenciar a eficácia do processamento central, melhorando a reatividade e reduzindo o tempo de reação em testes de atenção.¹⁴⁷ Eles também são usados em nutracêuticos¹⁴⁸ e cosméticos.¹⁴⁹ Uma mistura de ácidos graxos de cadeia longa (D-003) também demonstraram efeito redutor de colesterol em humanos.¹⁵⁰ Portanto, a mistura de ácidos graxos encontrada em extratos n-heptânicos de bagaço, palha e torta de filtro (Tabela 3) também poderiam ter aplicação na área da saúde.

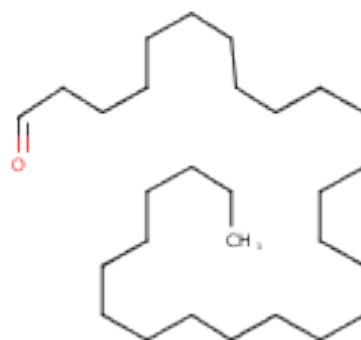
Figura 7 - Estrutura de metabólitos identificados nos resíduos sólidos de cana-de-açúcar com potenciais diversos de aplicação.



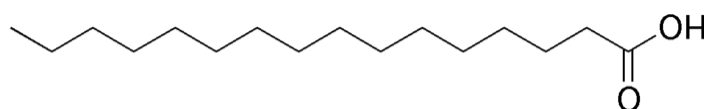
Apigenina-8-C-glucosil-arabinosídeo



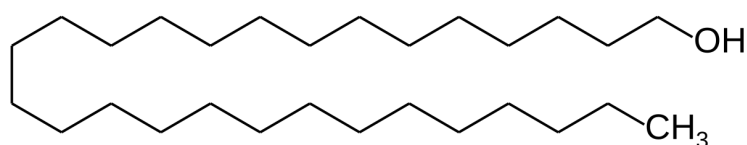
Octacosanal



Ácido hexadecanóico



1-Octacosanol



5. CONCLUSÃO

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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