



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA – CÂMPUS DE ARARAQUARA**

Maiara Stefanini Borges Caires

**Abordagem verde e multivariada no desenvolvimento de um
método sustentável para monitoramento da
composição química da soja e determinação quantitativa dos
parâmetros de combustão do extrato e de sua biomassa
residual por TG/ DTG-DSC**

Araraquara-SP

2021

MAIARA STEFANINI BORGES CAIRES

Abordagem verde e multivariada no desenvolvimento de um método sustentável para monitoramento da composição química da soja e determinação quantitativa dos parâmetros de combustão do extrato e de sua biomassa residual por TG/ DTG-DSC

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marina Piacenti da Silva

Araraquara-SP

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

- C136a Caires, Maiara Stefanini Borges
Abordagem verde e multivariada no desenvolvimento de um método sustentável para monitoramento da composição química da soja e determinação quantitativa dos parâmetros de combustão do extrato e de sua biomassa residual por TG/DTG-DSC / Maiara Stefanini Borges Caires. – Araraquara-SP : [s.n.], 2021
128 f. : il.
- Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Daniel Rinaldo
Coorientador: Marina Piacenti da Silva
1. Plantas medicinais. 2. Planejamento experimental. 3. Química verde. 4. Sustentabilidade. 5. Análise térmica. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Abordagem verde e multivariada no desenvolvimento de um método sustentável para monitoramento da composição química da soja e determinação quantitativa dos parâmetros de combustão do extrato e de sua biomassa residual por TG/ DTG-DSC.

AUTORA: MAIARA STEFANINI BORGES CAIRES

ORIENTADOR: DANIEL RINALDO

COORIENTADORA: MARINA PIACENTI DA SILVA

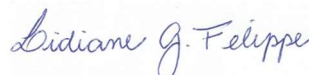
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



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



Prof. Dr. JOSÉ AUGUSTO TEIXEIRA (Participação Virtual)
Núcleo de Base Nacional Comum/ Química / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná - IFPR - Paranavaí



Profa. Dra. LIDIANE GASPARETO FELIPPE (Participação Virtual) Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof.^a Dr.^a LOURDES CAMPANER DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. TIAGO ANDRÉ DENCK COLMAN (Participação Virtual)
Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas / Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD - Dourados

Araraquara, 22 de abril de 2021

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Maiara Stefanini Borges Caires

Filiação: Iracidio Stefanini Borges e Silvia Regina de Oliveira Stefanini Borges

Nascimento: 26/12/1985 – Araraquara/SP-Brasil.

Endereço Profissional

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências de Bauru.
Avenida Engenheiro Luiz Edmundo Carrijo Coube, 14-01 Vargem Limpa
17033360 - Bauru, SP - Brasil

Endereço eletrônico: borges.maiara26@gmail.com

Atuação Profissional

Professor de Educação Básica- PEB II

DE Bauru- Secretária da Educação do Estado de São Paulo

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2016 – 2020

Doutorado em Química

Doutorado: Química, Área de Concentração - Química Orgânica

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” - UNESP- Instituto de Química de Araraquara- SP.

Tese: Abordagem verde e multivariada no desenvolvimento de um método sustentável para monitoramento da composição química da soja e determinação quantitativa dos parâmetros de combustão do extrato e de sua biomassa residual por TG/ DTG-DSC

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo

Bolsa CAPES

2014-2016

Mestrado em Química

Mestrado: Química, Área de Concentração - Química Orgânica

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” - UNESP- Instituto de Química de Araraquara- SP.

Dissertação: Bioprospecção de ciclohexanóis oxigenados em *Saccharicola* sp. um fungo endofítico de *Eugenia jambolana*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araujo / Bolsa: CAPES

2009-2013

Graduação em Licenciatura em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara-SP.

FORMAÇÃO ACADÊMICA COMPLEMENTAR

Iniciação Científica

2012 – 2013

Bolsista FAPESP Projeto: Estudo da cinética de oxidação de sulfeto e tiosulfato por micro-organismos isolados de lodo anaeróbico e diferentes linhagens de *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Acidithiobacillus thiooxidans*. Iniciação Científica, Carga horária: 12, Regime: Dedicção exclusiva, no período de 2012 até 31 de agosto de 2013.

2009 – 2012

Bolsista CNPq - PIBIT Projeto: Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas - *Astronium urundeuva*. Iniciação Científica, Carga horária: 12, Regime: Dedicção exclusiva, no período de 2009 até 31 de agosto de 2012.

2009

Bolsista Estágio Técnico, Enquadramento Funcional: Estágio de treinamento técnico na disciplina Biologia Molecular. Realizado no laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Campus Araraquara. No período de 23 de março de 2009 a 31 de agosto de 2009 num total de 400 horas.

2015 – 2018

Estágio Docência

Estágio docência: Disciplina – Instrumentação para ensino de Química- turma 5º ano do curso de Licenciatura em Química. Realizado no 1º Semestre de 2018– Instituto de Química - Unesp/Araraquara.

Estágio Supervisionado em Docência: Disciplina- Química I. Turma 1º ano do Curso de

Biologia. Realizado no 2º Semestre de 2017 – na Faculdade de Ciências- Unesp na Cidade de Bauru- SP. 60 horas

Estágio Docência: Disciplina - Química I- Turma Engenharia Química. Realizado no período de 02/03/2015 a 04/07/2015 - no Instituto de Química de Araraquara-SP.

2019-2020

Supervisão Científica

Aluna: Maria Eduarda de Oliveira (Iniciação Científica). Título do projeto Desenvolvimento de métodos analíticos visando atender aos princípios da química verde para identificação dos princípios ativos de *Bauhinia forficata* Link por HPLC-PDA aplicando ferramentas quimiométricas - Faculdade de Ciências - UNESP Bauru. Bolsista: CNPQ.

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. PELISSARI, JOÃO HENRIQUE; BRAGAGNOLO, FELIPE SANCHEZ; PEREIRA, FABÍOLA MANHAS VERBI; BORGES, MAIARA STEFANINI; DE FUNARI, CRISTIANO SOLEO; RINALDO, DANIEL. Green and Multivariate Approach to Obtain a Fingerprint of Red Wines by HPLC-PAD. Food Analytical Methods, v. 2021, p. 1-12, 2021.

2. BORGES, MAIARA S.; ZANATTA, ANA C. ; SOUZA, OTÁVIO A. ; PELISSARI, JOÃO H. CAMARGO, JÚLIO G.S. ; CARNEIRO, RENATO L. ; FUNARI, CRISTIANO S.; BOLZANI, VANDERLAN S. ; RINALDO, DANIEL. A green and sustainable method for monitoring the chemical composition of soybean: an alternative for quality control. Phytochemical Analysis, v. X, p. 1-13, 2020.

3. CARNEIRO, ARIADNE MAGALHÃES; MOREIRA, EDUARDA ANTUNES; BRAGAGNOLO, FELIPE SANCHEZ; BORGES, MAIARA STEFANINI; PILON, ALAN CESAR; RINALDO, DANIEL; FUNARI, CRISTIANO SOLEO. Soya agricultural waste as a rich source of isoflavones. FOOD RESEARCH INTERNATIONAL, v. 130, p. 108949, 2020.

ARTIGOS EM ANDAMENTO

BORGES, M.S; EKAWA, B.; NUNES, W. D.G; CAIRES, F.J.; RINALDO, D. Quantitative evaluation of the combustion parameters of three medicinal plants and their residual biomass by TG-DSC.

CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS

MATEUS, PAOLA G.; WOLF, VANESSA G.; BORGES, MAIARA S.; XIMENES, VALDECIR F. Quercetin: Prooxidant Effect and Apoptosis in Cancer. Studies in Natural Products Chemistry. 58ed.: Elsevier, 2018, v., p. 265-288.

APRESENTAÇÕES DE TRABALHOS

1. SILVA, A. C; BORGES, M. S.; RINALDO, D.; VILEGAS, W. HPLC-PDA green chromatographic method for the standardization of *Serjania marginata* extracts. In: 27th Congress of the Italo-latinamerican Asian & African Society of Ethnomedicine (SILAE), 2018, milazzo, sicily. 27th Congress of the Italo-latinamerican Asian & African Society of Ethnomedicine (SILAE), 2018.
2. CARNEIRO, A. M.; BORGES, M. S.; PILON, A.; RINALDO, D.; FUNARI, C. S. Ocorrência de isoflavonas em resíduos da cultura de soja. In: XIII Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu: Em busca de produtos naturais bioativos, 2018, Botucatu-SP. XIII Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu: Em busca de produtos naturais bioativos, 2018.
3. SOUZA, O. A.; BORGES, M. S.; FUNARI, C. S.; CARNEIRO, R. L.; RINALDO, D. Green extraction and chromatographic fingerprint optimization towards the CLAE-PAD analysis of *Cynara scolymus* L. by means of a multivariate approach. In: The 70th Southeastern Regional Meeting of the American Chemical Society - SERMACS, 2018, Augusta, GA. SERMACS, 2018.
4. BORGES, M. S.; SILVA, L. H. M. G.; CARNEIRO, R. L.; FUNARI, C. S.; RINALDO, D. Important chromatographic parameters for obtain the green chromatographic *fingerprinting* of pomegranate by HPLC-PAD. In: 6nd Brazilian Conference on Natural

Products (6nd BCNP)., 2017, Vitória-ES. 6nd Brazilian Conference on Natural Products (6nd BCNP), 2017.

5. CAMARGO, J. G. S.; BORGES, M. S.; CARNEIRO, R. L.; FUNARI, C. S.; RINALDO, D. Quality by design determination of chromatographic parameters for separation of secondary metabolites of *Glycine max* Merr (L.) ('soybean') by HPLC-PAD using the concepts of green chemistry. In: 6nd Brazilian Conference on Natural Products 6nd BCNP), 2017, Vitória-ES. 6nd Brazilian Conference on Natural Products 6nd BCNP), 2017.

6. BORGES, M. S.; CHAPLA, V. M.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R.; YOUNG, M. C. Prospecting secondary metabolites in *Saccharicola* sp. an endophytic fungus from *Eugenia jambolana*. In: 5nd Brazilian Conference on Natural Products (5nd BCNP), 2015, Atibaia, SP. 5nd Brazilian Conference on Natural Products (5nd BCNP), 2015.

7. BORGES, M. S.; SOLCIA, R. B.; BEVILAQUA, D. Thiosulphate oxidation by strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. In: 20th International Biohydrometallurgy Symposium, 2013, Antofagasta-CL. Proceedings of 20th International Biohydrometallurgy Symposium, 2013.

8. BORGES, M. S.; BRAHIM, G. T.; SOUZA, L. P.; SILVA, V. C.; VILEGAS, W. Isolamento e identificação de substâncias polares das folhas de *Astronium graveolens* (Anacardiaceae). In: 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química., 2011, Florianópolis. 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Ano Internacional da Química- Química para um mundo melhor, 2011.

9. SOUZA, L. P.; BORGES, M. S.; SILVA, V. C.; VILEGAS, W. Validation of HPLC-DAD Method for the Determination of Phenolic Compounds in *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). In: 3rd Brazilian Conference on Natural Products (3rd BCNP)., 2011, Ouro Preto. the XXIX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXIX RESEM), 2011.

10. BORGES, M. S.; SOUZA, L. P.; SILVA, V. C.; VILEGAS, W. Fitoterápicos padronizados para o Tratamento de Doenças Crônicas: *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). In: XIX Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM, 2011, Ciudad del Este- Paraguay. XIX Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM- Ciencia en el Bicentenario de los pueblos latinoamericanos, 2011.

11. BORGES, M. S.; SILVA, V. C.; VILEGAS, W. Taninos condensados de *Astronium fraxinifolium*. In: Jornada Farmacêutica da UNESP, 2010, Araraquara-SP. 57 Jornada Farmacêutica da UNESP, 2010.

12. SILVA, A.C; BORGES, M. S.; NASSER, A.L.M.; VILEGAS, W. Isolamento e identificação de flavonóides em *Pouteria torta*. In: Congresso de Iniciação Científica-CIC, 2009, São Jose do Rio Preto. (Apresentação de Trabalho/Congresso), 2009.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE TRABALHOS DE CONCLUSÃO

1.XIMENES, F. V.; BORGES, S. M.; BANNACH, G. Participação em banca de Vinícius Ribeiro Santana. Síntese de Análise do Dímero da Apocinina: Diapocininal. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura Em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

2. RINALDO, D; BORGES, S. M.; SANTOS, G. C; Participação em banca de Vanessa Svizzero Fakhoury. Desenvolvimento de metodologias verdes para análises do perfil químico das folhas de espécies do gênero *Davilla* por cromatografia líquida de alta eficiência. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura Em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

3. RINALDO, D.; BORGES, S. M.; SANTOS, G. C. Participação em banca de João Henrique Pelissari. Alternativa verde para análise de *Phyllanthus niruri*. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura Em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

4. RINALDO, D.; BORGES, S. M.; SILVA, B. H. S. T. Participação em banca de Júlio Gabriel Sanches de Camargo. Desenvolvimento de método de preparo de amostra e determinação de variáveis com efeitos importantes na separação de metabólitos secundários de *Glycine max* (“soja”) por CLAE-DAD, utilizando conceitos de química verde. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura Em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

5. RINALDO, D; BORGES, S. M.; FERREIRA, L. T. Participação em banca de Otávio Aguiar de Souza. Desenvolvimento do Método Analítico para *Fingerprinting* Metabólico das Folhas de Alcachofra por CLAE-DAD com Aplicação dos Princípios da Química Analítica Verde”. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura Em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

6. RINALDO, D; BORGES, S. M.; CAIRES, F. J. Participação em banca de Aline Fabíola Baratelli. Estágio em Indústria, realizado na empresa “Santisa Laboratório Farmacêutico”. Integrando a Sessão Pública de Defesas de Trabalhos de Conclusão de Curso dos cursos de Licenciatura em Química e Bacharelado em Química Ambiental Tecnológica no ano letivo

de 2017. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

7. FERNANDES, J. R.; BORGES, S. M.; RISSATO, S. R. Participação em banca de Bárbara Luizetto Gonçalves Bueno. Estágio em Indústria, realizado na empresa “Departamento de Água e Esgoto de Bauru”. Integrando a Sessão Pública de Defesas de Trabalhos de Conclusão de Curso dos cursos de Licenciatura em Química e Bacharelado em Química Ambiental Tecnológica no ano letivo de 2017. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

8. XIMENES, F. V.; BORGES, S. M.; LEGENDRE, O.A. Participação em banca de Maria Eduarda de Oliveira. Estágio em Indústria, realizado na empresa “Zilor Energia e Alimentos”. Integrando a Sessão Pública de Defesas de Trabalhos de Conclusão de Curso dos cursos de Licenciatura em Química e Bacharelado em Química Ambiental Tecnológica no ano letivo de 2020. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS

1. First Brazilian Workshop on Bioinformatics/Chemometrics for Metabolomics. First Brazilian Workshop on Bioinformatics/Chemometrics for Metabolomics. 2015. (Encontro).

2. 1st UNESP NMR Symposium. Recent Advances in NMR Spectroscopy: A Powerful Tool for Fundamental and Applied Research. 2014. (Simpósio).

3. 57º Jornada Farmacêutica da UNESP. Taninos condensados de *Astronium fraxinifolium*. 2010. (Congresso).

4. XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP (1ª etapa). Determinação do perfil químico do extrato aquoso das folhas de *Astronium graveolens* (Anacardiaceae). 2010. (Congresso).

5. VII Evento de Educação em Química. Materiais Didáticos: Suas Aplicações. 2009. (Outra).

ORGANIZAÇÕES DE EVENTOS

Participação da comissão organizadora da XXXIX Semana da Química, tema: “Tendências e Aplicações de uma Ciência Multifacetada.” no período de 19 a 23 de outubro de 2009, no Instituto de Química, Campus de Araraquara-SP.

Participação da comissão organizadora do VIII Evento de Educação em Química, tema: “Os Instrumentos de Avaliação no Ensino de Química”, no período de 25 a 27 de agosto de 2010, no Instituto de Química, Campus de Araraquara-SP.

Participação da comissão organizadora do IX Evento de Educação em Química; tema: “Linguagem no Ensino de Química”, no período de 31 de agosto a 02 de setembro de 2011, no Instituto de Química, Campus de Araraquara-SP.

Participação da comissão organizadora do X Evento de Educação em Química; tema: “Química como ferramenta interdisciplinar” a ser realizado no dia 29 a 31 de agosto de 2012, no Instituto de Química, Campus de Araraquara-SP.

*Aos meus queridos pais, Iracidio e Silvia, irmão Mateus e avó Maria
Luisa*

*Seus exemplos de honestidade, respeito, solidariedade, perseverança e amor que
servem de guia para a minha vida. Se hoje escrevo esta Tese de Doutorado, é que em
todos os momentos da minha vida, recebi o apoio e o incentivo para que me tornasse
uma
pessoa com qualidades e habilidades tanto profissional quanto pessoal.*

Ao meu querido marido Flávio.

*Pelo amor, incentivo, companheirismo e paciência. Obrigada pelo imenso apoio
durante a execução desse trabalho, e por estar sempre presente nos momentos bons e
ruins
da minha vida. Obrigada por tudo.*

A minha querida Filha Giovanna.

*A minha pequena Gigi, minha filha, por me dar o incentivo de ser sempre melhor. Você é
o apoio que me sustenta todos os dias. Os filhos são os que nos dão força para continuar,
não importa como. Que você tenha orgulho da sua mãe e se inspire a ser sempre
resiliente e determinada*

AGRADECIMENTOS

Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades. Principalmente em tempos de pandemia no qual nos encontramos neste momento.

Aos meus pais, pelo amor, apoio, paciência, sacrifício e inúmeras renúncias que vocês tiveram que fazer para me proporcionar uma educação melhor e de qualidade. Mais do que a educação formal que vocês me ofereceram e que sempre se esforçaram para que fosse a melhor, a formação humana foi o que de mais importante vocês fizeram por mim. Eu só posso retribuir tentando ser o melhor filha que pais como vocês merecem ter. Sou e serei eternamente grata por tudo que dedicaram a mim. Eu tenho muito orgulho de ser filha de vocês e muita admiração pelos pais que tenho.

A minha falecida avó que não estará presente nesse dia importante da minha vida. Mas que em espírito estará como sempre torcendo pelas minhas conquistas.

Ao meu marido Flávio, pelo amor, carinho, incentivo, companheirismo e paciência em todos os momentos.

A minha pequena Gigi, minha filha, por me dar o incentivo de ser sempre melhor. Pelos momentos de pura alegria e amor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Rinaldo pela paciência, pela amizade, pelas conversas e ensinamentos. Obrigada pela oportunidade em participar do grupo de Química verde (GreenBiotech Network).

A minha co-orientadora Profa. Dra. Marina Piacentini e a aluna Marcela pelas conversas, amizade e ensinamentos.

A Ana C. Zanatta, Otávio Aguiar, Laura Helena Miranda Gomide Silva, Maria Eduarda Oliveira, Prof. Dr. Cristiano Funari, Bruno Ekawa, por toda ajuda na execução do trabalho e colaboração nos artigos científicos. Serei eternamente grata.

Aos alunos do grupo LSOP e LATIG pela amizade, ajuda e momentos de descontração.

Aos amigos da Faculdade e da vida em especial minhas amigas: Aninha, Natalia e Leonice pela amizade, pelo apoio e pelas inúmeras conversas e risadas durante esta trajetória. Admiro vocês. Queria estar sempre perto de vocês.

Ao Prof. Valdecir Farias Ximenes por permitir a utilização do instrumento HPLC-PDA e pelos ensinamentos.

A todos os funcionários do Instituto de Química de Araraquara e Faculdade de Ciências de Bauru em especial a Wennia (secretária da pós graduação do IQ) e o Wagner (secretário do departamento de química-Fc/Bauru), por toda ajuda.

A CAPES pelas bolsas concedidas e a FAPESP pelos financiamentos.

*“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

Madre Teresa de Calcutá

*Uma das lições com as quais eu cresci foi a de sempre permanecer verdadeiro consigo
mesmo e nunca deixar que as palavras de alguém distraia você dos seus objetivos.*

Michelle Obama

*Tudo que você precisa fazer é mover as pessoas só um pouquinho para mudanças
acontecerem. Não precisa ser algo enorme.*

Viola Davis

*“A grandeza da vida não consiste em não cair nunca, mas em nos levantarmos cada vez
que caímos”.*

Nelson Mandela

*A mudança não chegará se esperamos outra pessoa ou outro tempo. Somos nós mesmos
os que estávamos esperando. Somos a mudança que buscamos”*

Barack Obama

RESUMO

A soja, *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae), é uma das culturas mais importantes do mundo, por ser responsável pela produção de biodiesel, leite, tofu e etanol, fonte de óleo, proteína e principalmente de metabólitos secundários como as isoflavonas, que desempenham um papel importante na prevenção de doenças crônicas. A análise quimiométrica de dados multivariados associados à cromatografia líquida de alta eficiência é cada vez mais usado para desenvolver métodos de eluição abrangentes para o controle de qualidade de plantas como a soja. Este trabalho visou estabelecer um método de análise não poluente, seguro e sustentável para análise de sementes de soja. Um planejamento fatorial fracionário foi desenvolvido para o extrato hidroetanólico 70% de *G. max* para o desenvolvimento de um método cromatográfico verde, sendo que as variáveis determinadas como mais significativas foram % inicial de etanol na fase móvel e temperatura da análise em °C. Para as variáveis mais significativas, foi utilizado o modelo robusto chamado Doehlert para a otimização dos níveis e resposta do método cromatográfico. Sendo facilmente aplicado para otimizar variáveis exigindo menos experimentos, além desta metodologia ser mais ecologicamente correta devido à menor geração de resíduos químicos. Fornecendo uma condição ótima para se obter o *fingerprinting* das sementes de soja. As condições cromatográficas do método otimizado foram: coluna C18 XSelect (150 x 4.6 mm d.i.; 5 µm), com pré-coluna (4 x 3 mm, 5 µm), equipamento HPLC (Jasco®), Fase móvel: H₂O + 0,5% de ácido acético (A) e EtOH (B) no seguinte gradiente: 5-55% de B em 30 min. Vazão: 1 mL min⁻¹. Temperatura de análise: 35 °C; volume de injeção: 20 µL, comprimento de onda 260 nm. O impacto ambiental do método desenvolvido para análise de isoflavonas de soja em comparação a métodos de referência foi avaliado pelas métricas *HPLC-Environmental Assessment Tool* e *AGREE- Analytical GREenEss Calculator* demonstrando que a metodologia desenvolvida é mais ambientalmente amigável e está de acordo com os princípios de química verde. A boa seletividade do método permitiu identificar por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas, as principais isoflavonas presentes e provou ser aplicável no controle de qualidade desses metabólitos interessantes, sendo uma alternativa viável na autenticação de seis amostras comerciais de soja de diferentes localidades. Não gerando resíduos tóxicos e sendo seguro para o analista, além de ser um método de custo reduzido. Outro viés pouco explorado é o comportamento térmico de extratos vegetais e biomassa residual de plantas medicinais e aromáticas. A Análise térmica permitiu determinar quantitativamente as características da decomposição térmica e termo-oxidativa e além de determinar os parâmetros de combustão para soja, extrato e sua biomassa residual. O efeito da extração sobre os parâmetros de combustão da biomassa residual e a estabilidade térmica dessa amostra foram afetados pela extração. Portanto esse trabalho mostra a aplicabilidade na utilização da cromatografia líquida de alta eficiência associada a abordagem multivariada, na obtenção de um método robusto, eficiente, de acordo com os princípios de química verde e ambientalmente amigável na análise de soja. Como também nessa perspectiva explorou a utilização da biomassa residual e sua aplicabilidade no setor de bioenergia.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Planejamento experimental. Química verde. Sustentabilidade. Análise térmica.

ABSTRACT

Soybean, *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae), is one of the most important crops in the world, as it is responsible for the production of biodiesel, milk, tofu and ethanol, a source of oil, protein and mainly of secondary metabolites such as isoflavones, which play an important role in the prevention of diseases chronic. The chemometric analysis of multivariate data associated with high-performance liquid chromatography is increasingly used to develop comprehensive elution methods for the quality control of plants such as soybeans. This work aimed to establish a non-polluting, safe and sustainable analysis method for analyzing soybean seeds. A fractional factorial design was developed for the hydroethanolic extract 70% of *G. max* for the development of a green chromatographic method, and the variables determined as the most significant were the initial % of ethanol in the mobile phase and the temperature of the analysis in ° C. For the most significant variables, the robust model called Doehlert was used to optimize the levels and response of the chromatographic method. Being easily applied to optimize variables requiring less experiments, in addition to this methodology being more environmentally friendly due to the lower generation of chemical residues. Providing an optimal condition for obtaining the fingerprinting of soybean seeds. The chromatographic conditions of the optimized method were: C18 XSelect column (150 x 4.6 mm di; 5 µm), with pre-column (4 x 3 mm, 5µm), HPLC equipment (Jasco®), Mobile phase: H₂O + 0.5 % acetic acid (A) and EtOH (B) in the following gradient: 5-55% B in 30 min. Flow rate: 1 mL min⁻¹. Analysis temperature: 35 °C; injection volume: 20 µL, wavelength 260 nm. The environmental impact of the method developed for the analysis of soy isoflavones in comparison to reference methods was evaluated by the metrics HPLC-Environmental Assessment Tool and AGREE-Analytical GREenEss Calculator demonstrating that the methodology developed is more environmentally friendly and is in accordance with the principles of green chemistry. The good selectivity of the method allowed to identify by HPLC and mass spectrometry, the main isoflavones present and proved to be applicable in the quality control of these interesting metabolites, being a viable alternative in the authentication of six commercial samples of soy from different locations. It does not generate toxic waste and is safe for the analyst, in addition to being a low cost method. Another little explored bias is the thermal behavior of plant extracts and residual biomass of medicinal and aromatic plants. The thermal analysis allowed to determine quantitatively the characteristics of the thermal and thermo-oxidative decomposition and in addition to determining the combustion parameters for soybean, extract and its residual biomass. The effect of the extraction on the combustion parameters of the residual biomass and the thermal stability of this sample were affected by the extraction. Therefore, this work shows the applicability in the use of high performance liquid chromatography associated with the multivariate approach, in obtaining a robust, efficient method, according to the principles of green and environmentally friendly chemistry in soybean analysis. In this perspective, he also explored the use of residual biomass and its applicability in the bioenergy sector.

Keywords: Medicinal plants. Experimental planning. Green chemistry. Sustainability. Thermal analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de artigos publicados por cientistas brasileiros sobre plantas nos últimos 33 anos.....	26
Figura 2 - Sojas comerciais e Estruturas das isoflavonas agliconas e glucosídicas presentes nas sementes de soja.....	29
Figura 3 - Etapas de extração em fase sólida com cartuchos de fase reversa.	44
Figura 4 - Cromatogramas referentes às etapas de pré-tratamento do extrato hidroetanólico 70% de <i>G. max</i> . metodologia 1 . Eluição 1: EtOH/H ₂ O (1:9, v/v). Sistema de eluição gradiente: 5-100% EtOH em 60 min, coluna C18 XBridge (150 x 4.6 mm d.i.; 5 µm), com pré-coluna (4 x 3 mm, 5µm), HPLC (Jasco®), vazão 1,0 mL min ⁻¹ , λ = 260 nm.....	54
Figura 5 . Cromatogramas referentes às etapas de pré-tratamento do extrato hidroetanólico 70% de <i>G. max</i> . metodologia 1 . Eluição 2: EtOH/H ₂ O (1:1, v/v). Sistema de eluição gradiente: 5-100% EtOH em 60 min, coluna C18 XBridge (150 x 4.6 mm d.i.; 5 µm), com pré-coluna (4 x 3 mm, 5µm), HPLC (Jasco®), vazão 1,0 mL min ⁻¹ , λ = 260 nm.....	55
Figura 6 . Cromatogramas referentes às etapas de pré-tratamento do extrato hidroetanólico 70% de <i>G. max</i> . metodologia 1 . Eluição 3: 100% EtOH. Sistema de eluição gradiente: 5-100% EtOH em 60 min, coluna C18 XBridge (150 x 4.6 mm d.i.; 5 µm), com pré-coluna (4 x 3 mm, 5µm), HPLC (Jasco®), vazão 1,0 mL min ⁻¹ , λ = 260 nm.....	55
Figura 7 . romatogramas referentes às etapas de pré-tratamento do extrato hidroetanólico 70% de <i>G. max</i> . metodologia 2 . EtOH/H ₂ O (7:3, v/v). Sistema de eluição gradiente: 5-100% EtOH em 60 min, coluna C18 XBridge (150 x 4.6 mm d.i.; 5 µm), com pré-coluna (4 x 3 mm, 5µm), HPLC (Jasco®), vazão 1,0 mL min ⁻¹ , λ = 260 nm.....	56
Figura 8 - Gráfico de probabilidade normal para contrastes relacionados a resposta do número de bandas (n)	59
Figura 9 - Cromatogramas Planejamento Doehlert <i>G. max</i>	64
Figura 10 – (A) Gráfico de superfície de resposta para o número de bandas cromatográficas (n) de resposta no projeto Doehlert e (B) Fingerprint de <i>Glycine max</i> . Condições cromatográficas: C18 XSelect (150 x 4.6 mm d.i.; 5 µm), com pré-coluna (4 x 3 mm, 5µm), HPLC (Jasco®), Fase móvel: H ₂ O + 0,5% de ácido acético (A) e EtOH (B) no seguinte gradiente: 5-55% de B em 30 min. Vazão: 1 mL min ⁻¹ . Temperatura de análise: 35 °C; volume de injeção: 20 µL, λ = 260 nm. bandas: 3, daidzina; 4, glicitina; 5, genistina; 6, acetilgenistina; 7, daidzeína; 8, genisteína	70
Figura 11 . Espectros na região do UV para os picos de 3-8 referentes as isoflavonas da soja.....	71
Figura 12 - Gráfico de número de bandas cromatográficas (n) previsto vs. experimental	72
Figura 13 .- Pictogramas contendo os escores apresentados na métrica AGREE para (A) o método com bioetanol desenvolvido no presente trabalho e (B) o método de Kao e Chen (2002) e (C) Kim et al. (2014).....	81
Figura 14 - Cromatogramas de amostras comerciais de soja. Condições cromatográficas: C18 XSelect (150 x 4.6 mm d.i.; 5 µm), com pré-coluna (4 x 3 mm, 5µm), HPLC (Jasco®), Fase móvel: H ₂ O + 0,5% de ácido acético (A) e EtOH (B) no seguinte gradiente: 5-55% de B em 30 min. Vazão: 1 mL min ⁻¹ . Temperatura de análise: 35 °C; volume de injeção: 20 µL, λ = 260 nm. (A) Amostra de Neves Paulista, SP; (B) amostra de São José do Rio Preto,	

SP; (C) amostra de São João da Boa Vista, SP; (D) amostra de São Paulo, SP; (E) amostra de Hortolândia, SP; (F) amostra de Camaquã, RS. Bandas: 3, daidzina; 4, glicitina; 5, genistina; 6, acetilgenistina; 7, daidzeína; 8, genisteína.....	85
Figura 15 - a) TG/DTG-DSC e b) Mapa de contorno colorido 2D da soja em base seca total. Extrato Hidroetanólico – Soja (HS); Biomassa residual – Extrato hidroetanólico – Soja (RHS); Soja seca (SS)	90
Figura 16 - Determinação da temperatura de ignição (Ti) pelo método da tangente por TG.	93
Figura 17 - Curva DTG	93
Figura 18 - Cálculo dos efeitos da retirada de compostos da matriz soja- curva DTG....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das isoflavonas de soja.	29
Tabela 2 - Fatores (variáveis) e níveis estabelecidos na triagem para desenvolvimento do método de eluição verde por HPLC-PDA de <i>G. max</i>	46
Tabela 3 - Planejamento fatorial fracionário com 2 níveis e 7 fatores (2_{IV}^{7-2}) para avaliação dos efeitos dos parâmetros cromatográficos das análises de <i>G. max</i> por HPLC-PDA.	47
Tabela 4 – Valores atribuídos às variáveis menos significativas do Planejamento Fatorial Fracionário.....	62
Tabela 5 - Variáveis e níveis investigados no design Doehlert.....	63
Tabela 6 - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo recalculado representando o número de bandas cromatográficas (n) em função da Temperatura (X3) e % Inicial de etanol (X1).	69
Tabela 7 - Compostos presentes no EHA das sementes de soja propostos por LC-MS e os correspondentes dados de UV e MS/MS.....	73
Tabela 8 - Comparação do desempenho do método proposto neste trabalho com dois métodos previamente relatados na literatura para a fingerprint de isoflavonas em soja por HPLC-PDA/UV.....	76
Tabela 9 - Parâmetros de entrada no software da métrica AGREE para cálculo do escore referente ao método cromatográfico verde desenvolvido neste trabalho para <i>G. max</i>	79
Tabela 10 - Parâmetros de entrada no software da métrica AGREE para cálculo do escore referente ao método de Kao e Chen (2002).	80
Tabela 11 - Parâmetros de entrada no software da métrica AGREE para cálculo do score referente ao método cromatográfico desenvolvido, método de Kim et al. (2014).	81
Tabela 12 . Metabólitos secundários de <i>G. max</i>	86
Tabela 13 - Teores de umidade e cinzas das amostras analisadas.	87
Tabela 14 - Soja: Faixas de temperatura (θ), perdas de massa (Δm) e temperatura de pico (T_p) para cada etapa das curvas TG-DSC em atmosfera de ar seco.....	91
Tabela 15 - Parâmetros de combustão das amostras, resíduo e extrato <i>G. max</i>	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
AGREE	<i>Analytical GREenEss Metric</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C18	Fase estacionária de fase reversa do tipo Octadecilsilano
C_b	Índice de burnout
CID	<i>Collision induced dissociation</i>
C_i	Índice de ignição
CoA	Coenzima A
D_v	Índice de matéria volátil liberada
DoE	<i>Design of Experiments</i>
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Termogravimetria derivada
EAT	<i>Environmental Assessment Tool</i>
EHA	Extrato hidroetanólico
EtOH	Etanol
ESI	<i>Electrospray ionization (Ionização por electrospray)</i>
FITR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> (Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier)
GAC	<i>Green Analytical Chemistry</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HPLC-EAT	<i>HPLC Environmental Assessment Tool</i>
HPLC-ESI-IT-MS	<i>High performance liquid chromatography coupled mass spectrometry electrospray and ion trap</i>
HPLC-PDA	<i>High Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array Detector</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos)
HS	Extrato hidroetanólico – Soja
ICH	<i>International Conference for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IEA	<i>International Energy Agency</i> (Agência Internacional de Energia)

IREA	<i>International Renewable Energy Agency</i> (Agência Internacional de Energia Renovável)
m/z	Razão massa carga
MAPs	Plantas medicinais e aromáticas
MeOH	Metanol
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNs	Produtos Naturais
RHS	Biomassa residual – Extrato hidroetanólico – Soja
R_p	Taxa máxima de perda de massa em % min ⁻¹
R_v	Taxa média de perda de massa em % min ⁻¹
DPR	Desvio padrão relativo
S	Índice de combustibilidade
SHE	<i>Safety, Heath and Environment</i>
SS	Soja seca
SUS	Sistema Único de Saúde
T_v	Temperatura inicial de volatilização
TG-DSC	<i>Termogravimetria simultânea-calorimetria de varredura diferencial</i>
Tb	Temperatura de Burnout (queima)
t_i	Temperatura de ignição
TG	Análise Termogravimétrica
T_p	Temperatura de máxima perda de massa
tR	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

ABSTRACT	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xx
1 INTRODUÇÃO.....	24
1.1 Produtos naturais (PNs): uma visão geral.....	24
1.2 Plantas Medicinais (Fitoterápicos) no tratamento de doenças crônicas	25
1.3 <i>Glycine max</i> (L.) Merr. (Fabaceae).....	28
1.4 Cromatografia verde	29
1.5 Cromatografia líquida de alta eficiência e análise multivariada.....	32
1.6 Métricas de monitoramento do impacto ambiental.....	33
1.7 Estudo térmico de plantas medicinais por termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial simultânea (TG-DSC).....	34
1.8 Estudo térmico de biomassa residual de extratos de plantas por TG-DSC	35
2 OBJETIVO	39
3 PARTE EXPERIMENTAL	41
3.1 Materiais, Reagentes e Soluções.....	41
3.2 Procedimentos gerais e instrumentação	41
3.2.1 Cromatografia analítica	41
3.2.2 HPLC-ESI-IT-MS	41
3.2.3 TG-DSC	42
3.2.4 Demais equipamentos utilizados.....	42
3.3 Metodologia	43
3.3.1 Etapa Botânica.....	43
3.3.2 Preparação do extrato hidroetanólico de <i>Glycine max</i>	43
3.3.3 Preparo de amostra (clean-up) do extrato hidroalcolico para análises por HPLC.....	44
3.3.4 Condições cromatográficas	45
3.3.5 Desenvolvimento e otimização do método cromatográfico verde.....	45
3.3.6 Quimiometria e análise de dados	48

3.3.7 Métrica para o método cromatográfico verde otimizado	48
3.3.8 Avaliação do impacto ambiental: AGREE – Analytical GREEness.....	49
3.3.9 Validação do método cromatográfico verde	49
3.4 Análise TG-DSC.....	50
3.4.1 Avaliação dos parâmetros de combustão	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
4.1 Desenvolvimento do método cromatográfico verde para a análise de <i>G. max</i>	53
4.1.1 Avaliação do preparo de amostras (clean-up) por HPLC-PDA	53
4.1.2 Aplicação de avaliação do planejamento fatorial fracionário (2_{IV}^{7-2}).....	56
4.1.3 Otimização da condição de eluição cromatográfica de <i>G. max</i>	62
4.2 Identificação dos compostos por LC-ESI-MS/MS	73
4.3 Desempenho do método desenvolvido: comparação com métodos de referência	74
4.3.1 Métrica HPLC-EAT	74
4.3.2 Avaliação do impacto ambiental: AGREE – Analytical GREEness.....	78
4.4 Validação do método otimizado	83
4.4.1 Repetibilidade.....	83
4.4.2 Precisão intermediária	83
4.5 Aplicação da metodologia otimizada para analisar soja comercial	83
4.6 Análise térmica por TG-DSC	86
4.6.1 Termogravimetria simultânea - calorimetria de varredura diferencial (TG-DSC).....	86
4.6.2 Umidade e cinzas	87
4.6.3 Comportamento térmico e estabilidade.....	88
4.7 Análise de gás evoluído	91
4.8 Desempenho de Combustão.....	92
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
REFERÊNCIAS	99
APÊNDICE	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais (PNs): uma visão geral

Produtos naturais (PNs) são metabólitos primários e secundários produzidos e usados por organismos que na maioria dos casos são sintetizados como mecanismo de adaptação ou defesa contra uma diversidade de micro-organismos, herbívoros, insetos e plantas concorrentes (ZHU et al 2013; MAJEED et al., 2012).

Os metabólitos secundários derivados de PNs são produzidos a partir de intermediários biossintéticos (como acetil coenzima A (acetil-CoA), ácido chiquímico, ácido mevalônico) dos processos celulares básicos, como fotossíntese, glicólise e o ciclo de Krebs, após a modificação através de vários mecanismos e reações como alquilação, descarboxilação, formação de aldol, Claisen e base Schiff) (DEWICK, 2009). Dentre esses grupos de metabólitos estão alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos (WINK, 2015) apresentando efeitos biológicos, como anti inflamatório (BERNSTEIN et al., 2018) anticâncer (SECA; PINTO, 2018) e propriedades antioxidantes (LI et al., 2018).

Estas moléculas provenientes de produtos naturais foram selecionadas naturalmente durante milhares de anos para melhorar a especificidade e abranger um leque muito amplo de funções, dependendo da origem, do habitat e da atividade específica desenvolvida no organismo de origem. Devido a essas características intrínsecas, os PNs têm sido usados como agentes de cura para fins terapêuticos há milhares de anos por uma fração significativa da população e ainda hoje continuam a ser a fonte mais importante de novas preparações terapêuticas potenciais (MAJEED et al., 2012; BERNARDINI et al., 2018).

A natureza foi e continua sendo capaz de fornecer diversos metabólitos secundários de caráter terapêutico isolados de diversas fontes. Um marco muito importante para a descoberta racional de drogas a partir de plantas foi o isolamento do analgésico e dos agentes indutores do sono como a morfina, do ópio por volta de 1804 (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012) pelo alemão Friedrich Sertürner, que descobriu uma nova classe de drogas, os alcalóides. Após o isolamento da morfina iniciou-se uma intensa investigação de outras ervas medicinais durante o século XIX, uma ampla gama de compostos vegetais, principalmente alcalóides como, cafeína, nicotina, cocaína, codeína e colchicina que foram isolados e purificadas de suas fontes naturais (BERNARDINI et al., 2018). Outro exemplo é a papaverina de *Papaver somniferum* esta planta é conhecida por ser a fonte de analgésicos como a morfina e a codeína (CRAGG; NEWMAN, 2013). Na década de 1970 duas novas moléculas, compactina e mevinolina, foram

capazes de inibir a biossíntese do colesterol, abrindo um novo importante campo de pesquisa baseado na produção de estatinas, conhecidos como 'medicamento de uso diário' (VERPOORTE; CHOI; KIM, 2005) que ainda hoje é uma aplicação médica de sucesso, importante no setor farmacêutico (BAKER et al., 2007). Um dos melhores exemplos do papel da etnomedicina na orientação da descoberta e do desenvolvimento de medicamentos é o dos medicamentos antimaláricos, exemplo o quinino isolado da casca da espécie *Cinchona officinalis* (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Outros exemplos importantes de compostos ativos isolados de plantas medicinais incluem atropina (antagonista muscarínico) que age nas terminações nervosas parassimpáticas, inibindo-as isolado de *Atropa belladonna* em 1831; digoxina (tratamento da insuficiência cardíaca) isolado em 1869 de *Digitalis lanata*; e curare (relaxante muscular) isolado em 1943 de *Chondrodendron tomentosum* (DUTRA et al., 2016). Portanto é inquestionável que o estudo de produtos naturais representa um dos mais importantes campos da ciência e conhecimento tradicional sobre as plantas representam importantes fontes para o desenvolvimento de produtos terapêuticos para o tratamento de diversas doenças crônicas (NEWMAN; CRAGG, 2012)

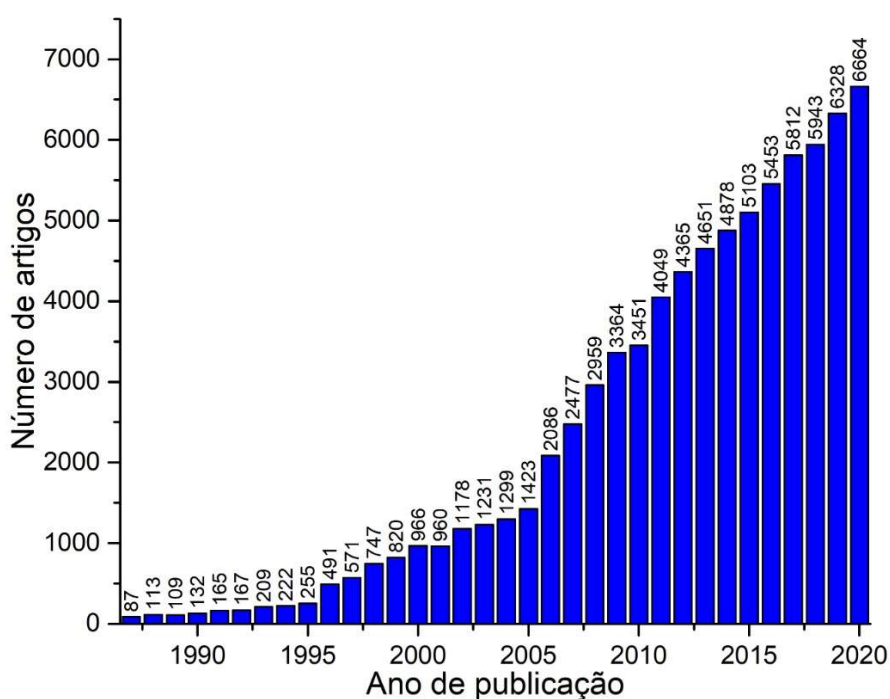
Sob esta ótica, sistemas à base de plantas continuam a desempenhar um papel fundamental na área da saúde, e na produção de medicamentos e seu uso por diferentes culturas tem sido documentado. A Organização Mundial da Saúde (OMS) incentiva os países a gerar políticas e estratégias baseados em evidências para o uso de plantas medicinais. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 65-80% da população dos países em desenvolvimento depende de plantas medicinais como a única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde primários, fazendo uso de fitoterápicos a base de plantas (ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011). Uma pesquisa realizada sobre substâncias puras derivadas de plantas utilizadas como medicamentos em países de hospedagem tradicional pela OMS e Centros de Medicina indicou que, de 122 substâncias identificadas, 80% foram utilizados para os mesmos fins ou relacionados etnomédicos e foram derivados de pelo menos 94 espécies de plantas (CRAGG; NEWMAN, 2013).

1.2 Plantas Medicinais (Fitoterápicos) no tratamento de doenças crônicas

Fitoterápicos derivados de plantas foram e são usados como medicamentos tradicionais, remédios, infusões e óleos sem nenhum conhecimento a respeito dos compostos bioativos contidos em seu interior, mas apenas considerando os resultados de centenas de séculos de experiências humanas (KINGHORN et al., 2011).

No Brasil, existem várias plantas medicinais que são utilizadas como fitoterápicos pelas populações rurais e urbanas para o tratamento de diversas doenças crônicas (DUTRA et al., 2016; PIO et al., 2019). Tal constatação fica evidente pelo grande número de artigos publicados em revistas científicas utilizando a palavra-chave: plantas, como mostra a Figura 1. Cientistas brasileiros publicaram uma grande quantidade de artigos sobre plantas nos últimos 33 anos (entre os anos de 1987 e 2020)

Figura 1 - Número de artigos publicados por cientistas brasileiros sobre plantas nos últimos 33 anos.



Fonte: próprio autor

As palavras-chave utilizadas para a pesquisa foram: plantas. Na área de Ciências da Vida ou Ciências da Saúde (Área temática). Tipo de documento - artigo original ou revisão. Data: 27 de março de 2021. Fonte: Scopus.

Plantas brasileiras tituladas como medicinais ou fitoterápicos são vendidas em muitos estabelecimentos como farmácias, drogarias, lojas de cultivos, entre outros. Tendo em vista o grande aumento no uso, muitas vezes indiscriminado, de plantas medicinais, tem-se observado maior interesse por parte de cientistas e empresas farmacêuticas, no sentido de entender melhor a composição química dessas plantas, e assegurar não só a eficácia, mas também a segurança

do seu uso (AMEH et al., 2010). Sendo que muitas espécies vegetais utilizadas pela população apresentam alta toxicidade, não possui ação farmacológica comprovada, nem composição química definida se tornando indispensável a normatização e a regulamentação desses medicamentos exigidas pelo mercado mundial e pelas autoridades governamentais (HUSAIN et al., 2017). Ficando evidente que o controle de qualidade é uma etapa essencial para que uma planta possa ser utilizada como fitoterápico (LI; ZHAO; YANG, 2011).

Fingerprint adequada é sugerida por agências como a *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA e a Organização Mundial da Saúde (OMS). Um fingerprint cromatográfico pode ser definida como um perfil químico obtido por análise cromatográfica, que fornece uma quantidade considerável de informações e pode ser empregada como um parâmetro de qualidade (por exemplo, extratos de plantas). Além disso, métodos de fingerprint podem ser usados para determinar os metabólitos presentes nos extratos de plantas (TISTAERT; DEJAEGHER; HEYDEN, 2011; SOUZA et al., 2018). Esgotando-se portanto os estudos laboratoriais e comprovando a eficácia de uma planta medicinal, a mesma pode ser comercializada como um medicamento denominado fitoterápico.

O Ministério da Saúde divulgou, em 2009, uma lista contendo 71 plantas medicinais, denominada Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (Rennisus). A Rennisus contem plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS. A finalidade da lista é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Tendo em vista a importância da implementação de produtos naturais como alternativa terapêutica para diversas doenças, por serem de baixo custo os medicamentos fitoterápicos são utilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e aprovados pela Agência de Vigilância Sanitária (Anvisa). Por isso, são considerados seguros e eficazes para a população.

Glycine max (L.) Merr. (Fabaceae), popularmente conhecida como soja, espécie da Rennisus, foi selecionado segundo os critérios exigidos pelo Ministério da Saúde: ampla distribuição geográfica, facilidade de cultivo, produtividade, disponibilidade atual, baixa toxicidade, baixa incidência de efeitos colaterais, caracterização química qualitativa e quantitativa e propriedades terapêuticas cientificamente avaliadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

1.3 *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae)

A soja (*G. max*) é uma das mais importantes culturas em todo o mundo, não apenas por ser uma importante fonte de óleo e proteína, mas também de metabólitos secundários (KIM et al., 2014) sendo também utilizada para a produção de biodiesel, leite de soja e tofu. Também é utilizado para a produção de etanol, pois sua casca contém grande teor de carboidratos (MIELENZ; BARDSLEY; WYMAN, 2009).

O Brasil e os Estados Unidos são os maiores produtores de soja do mundo. A produção para a safra de sementes 2020/2021 é estimada em 133,7 milhões de toneladas (USDA, 2020).

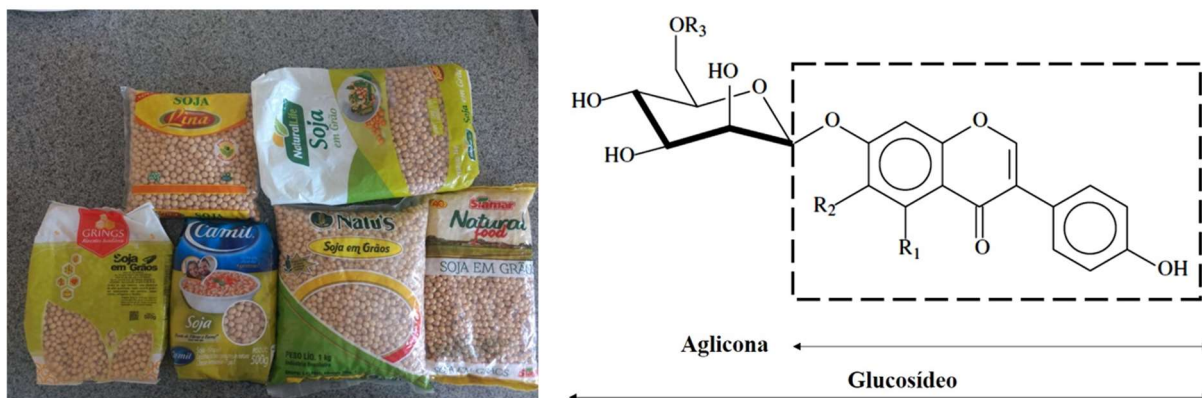
A soja foi amplamente utilizada como material alimentar nutritivo por muitas décadas devido suas propriedades benéficas à saúde, incluindo capacidades anticarcinogênicas, antioxidantes, antimetastáticas e antiestrogênicas. Tais propriedades deve-se ao alto teor proteico e óleo, bem como vários metabólitos secundários (fenólicos, isoflavonas, triterpenóides, saponinas, vitaminas, tocoferóis e aminoácidos) (LEE et al., 2018).

Dentre seus metabólitos secundários em destaque estão as isoflavonas presentes em doze compostos: daidzina, genistina, glicitina, 6-*O*-acetildaidzina, 6-*O*-acetilgenistina, 6-*O*-acetilglicitina, 6-*O*-malonildaidzina, 6-*O*-malonilgenistina, 6-*O*-malonilglicitina, daidzeína, genisteína e gliciteína (NIAMNUY et al., 2011; LEE et al., 2008) (Figura 2, Tabela 1).

Elas desempenham um papel importante na prevenção de doenças crônicas, apresentando efeito anticancerígeno e atividade antioxidante. Estes componentes podem trazer benefícios no controle e prevenção de doenças como câncer (ovário, pulmão, próstata e cólon) (CHEN et al., 2014; LEE et al., 2015) diabetes mellitus, osteoporose e doenças cardiovasculares devido a mecanismos como diminuição nos níveis de colesterol total decorrente do aumento na atividade de receptores das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (ZAFRA-GÓMEZ et al., 2010). Sendo benéficas para redução do peso corporal e a glicose no sangue e a perda do controle da insulina após a menopausa, como também são úteis no aumento da densidade mineral óssea em mulheres (LIU et al., 2009; SONG; PAIK; JOUNG, 2008).

As isoflavonas são responsáveis também pela defesa natural das plantas como a fitoalexina contra fungos patogênicos e alimentação de insetos (SVETAZ et al., 2004). Portanto são categorizadas como os grupos mais cruciais para os aspectos farmacêuticos e funcionais (QJAO et al., 2014). E são de grande interesse pelos pesquisadores para o desenvolvimento de alimentos funcionais e suplementos dietéticos de soja.

Figura 2 - Sojas comerciais e Estruturas das isoflavonas agliconas e glucosídicas presentes nas sementes de soja.



Fonte: próprio autor

Tabela 1 - Classificação das isoflavonas de soja.

Nome	Abrev.	R1	R2	R3
Genisteína	Ge	OH	H	
Gliciteína	Gli	H	OCH ₃	
Daidzina	Din	H	H	H
Genistina	Gin	OH	H	H
Glicitina	Glin	H	OCH ₃	H
6''- O-acetildaidzina	Adin	H	H	COCH ₃
6''- O-acetilgenistina	Agin	OH	H	COCH ₃
6''- O-acetilglicitina	Aglin	H	OCH ₃	COCH ₃
6''- O-Malonildaidzina	Mdin	H	H	COCH ₂ COOH
6''- O-Malonilgenistina	Mgin	OH	H	COCH ₂ COOH
6''- O-Malonilglicitina	Mglin	H	OCH ₃	COCH ₂ COOH

1.4 Cromatografia verde

A maioria dos estudos de plantas medicinais tem como principais objetivos a comprovação (ou não) científica dos relatos etnofarmacológicos e, com isso, pode proporcionar alternativas naturais (de baixo custo e sustentáveis) para o tratamento das enfermidades. Nesse sentido, percebe-se uma contradição de termos: estudos que visam alternativas naturais utilizarem solventes/reagentes tóxicos que prejudicam a natureza.

Essa contradição ou preocupação tem levado pesquisadores a desenvolver novas estratégias para os estudos na área de química de um modo geral, como relata LENARDÃO et al., 2003.

Chamada de “química limpa”, a química verde é uma filosofia elaborada por ANASTAS E WARNER (1998) que, baseada em 12 princípios básicos, tem a preocupação de desenvolver meios capazes de diminuir os impactos causados ao meio ambiente, reduzindo ou eliminando

substâncias tóxicas geradas pelas indústrias ou até mesmo por meios comerciais. Tais princípios são:

1. Prevenir a formação de subprodutos;
2. Economia de átomos;
3. Sínteses com compostos de menor toxicidade;
4. Desenvolvimento de compostos seguros;
5. Evitar o uso de solventes e auxiliares;
6. Diminuir a energia gasta durante um processo químico;
7. Utilização de substâncias recicladas;
8. Diminuição de derivativos;
9. Uso de catalisadores;
10. Desenvolvimento de compostos para degradação;
11. Controlar a formação de compostos tóxicos para a prevenção da poluição;
12. Uso de substâncias seguras para evitar acidentes tais com explosões e incêndios;

As abordagens abaixo supracitadas são contempladas pela aplicação dos princípios da Química Analítica Verde (*Green Analytical Chemistry*, ou GAC; GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013) que elaboraram 12 princípios, baseados nos da Química Verde, para abranger melhor as análises químicas que são:

- 1) Técnicas analíticas diretas devem ser empregadas para evitar tratamento de amostra;
- 2) As dimensões e quantidade das amostras devem ser minimizadas;
- 3) Medições in situ são prioritárias;
- 4) Deve ocorrer a integração entre processos e operações analíticas;
- 5) Métodos automatizados e miniaturizados têm preferência;
- 6) Deve-se evitar derivação;
- 7) Geração de resíduos deve ser muito reduzida e um manejo adequado dos mesmos deve ocorrer;
- 8) Métodos multianálito ou multiparamétricos são prioritários;
- 9) O gasto de energia deve ser o mínimo possível;
- 10) O uso de reagentes oriundos de fontes renováveis tem prioridade;
- 11) Reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos;
- 12) A segurança do analista deve ser maior.

Os estudos de plantas medicinais, de um modo geral envolve vários procedimentos tais como: coleta do material vegetal, preparação dos extratos, fracionamento dos extratos e identificação dos metabólitos secundários. Desses procedimentos citados, a extração e fracionamento são os que utilizam maior quantidade de solventes orgânicos como fase móvel (HYÖTYLÄINEN, 2009). Os solventes de fato representam um grande desafio na área de Química Verde por estarem relacionados diretamente a grande parte dos processos analíticos e estão relacionados a desperdício de massa, poluição ambiental e risco a saúde dos analistas (ANASTAS; EGHBALI, 2010).

Os solventes acetonitrila e metanol são de longe os solventes mais utilizado em HPLC devido suas características únicas (KAO; CHEN, 2002; HSIEH; KAO; CHEN, 2004; PEÑALVO; NURMI; ADLERCREUTZ, 2004; SUN et al., 2011; KIM et al., 2014; SHIM et al., 2015; LANTE et al., 2018; LI et al., 2018), como dissolução de uma ampla gama de solutos, baixa acidez, reatividade química mínima, baixa absorbância na região do ultravioleta e compatibilidade com a espectrometria de massas. Entretanto geram grande quantidade de resíduos e são potencialmente tóxicos (WELCH et al., 2010; PRAT; HAYLER; WELLS, 2014; PRAT et al., 2015).

Portanto, para auxiliar pesquisadores e indústrias a substituir solventes não-verdes ou implementar novos métodos verdes de análises, foram gerados guias de seleção de solventes verdes, que pudessem orientar no desenvolvimento de novos produtos e processos utilizando solventes ambientalmente amigáveis (PRAT et al., 2015; TOBISZEWSKI; NAMIEŚNIK; PENA-PEREIRA, 2017).

O emprego de solventes mais ecológicos como alternativas aos solventes tóxicos tradicionais, é uma importante estratégia para diminuir a geração de resíduos. Entre possíveis candidatos estão o etanol e acetona, mas o último nem sempre é adequado quando um detector baseado em absorção na região do ultravioleta (UV) é empregado, porque seu limite de UV se estende a 330 nm, então a acetona é aplicável apenas a analitos que absorvem em alta comprimentos de onda (FUNARI et al., 2014). Portanto, o etanol se torna a primeira opção, porque em comparação com solventes de acetonitrila e metanol, é considerado o mais verde, menos tóxico, tem baixa volatilidade, miscibilidade de água, viscosidade relativamente aceitável, absorção UV em 210 nm, biodegradabilidade e pode ser obtido por fermentação de fontes renováveis como a partir de cereais e cana de açúcar e é biodegradável, o que são características desejáveis para um solvente considerado verde (WELCH et al., 2010; FUNARI et al., 2014; OLIVES; GONZÁLEZ-RUIZ; MARTÍN, 2017).

É um desafio substituir o acetonitrila (o solvente mais amplamente usado em cromatografia líquida) por etanol, considerando que ambos os solventes pertencem a diferentes grupos de seletividade. No entanto, em relação cromatografia líquida de fase reversa, a seletividade, retenção e eficiência geral podem ser influenciadas pela temperatura uma vez que essa é capaz de alterar o pH e a constante dielétrica da fase móvel, bem como pKa e difusão de analitos e arranjo de ligantes de fase estacionária (GRITTI; GUIOCHON, 2006; HEINISCH; ROCCA, 2009; FUNARI et al., 2014).

Uma vez que a temperatura é intimamente relacionada à cinética e termodinâmica da separação cromatográfica esta variável pode ser racionalmente empregada para substituir um solvente perigoso por uma alternativa mais verde que eventualmente pertence a um grupo diferente de seletividade. Embora o aumento das temperaturas possa reduzir o viscosidade apenas em algumas circunstâncias (DOLAN, 2003; VANHOENACKER; SANDRA, 2006; HEINISCH; ROCCA, 2009) e pode não funcionar universalmente, é sabido que esta estratégia pode melhorar a seletividade e desempenho de separação usando um solvente menos tóxico e ainda levar a um método de eluição globalmente mais ecológico (WELCH et al., 2010; FUNARI et al., 2014).

1.5 Cromatografia líquida de alta eficiência e análise multivariada

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando HPLC tornou-se uma técnica determinante em análises agrícolas, farmacêuticas de plantas herbáceas e medicinais para controle de qualidade dos mais diversos produtos. Mas é um processo trabalhoso, exigindo extensa pesquisa literária em química para entender a complexidade das matrizes, e subsequentemente desenvolver um método analítico baseado na abordagem de diversos parâmetros que podem interferir na separação dos constituintes químicos e que são comumente avaliados uma de cada vez. Com isso, o processo se torna demorado e requer um grande número de execuções experimentais (GANORKAR; SHIRKHEDKAR, 2017).

No entanto, a HPLC, associada a experimentos multivariados, está se tornando cada vez mais utilizada para desenvolver métodos de eluição para matrizes complexas, como plantas.

Estudos recentes demonstraram o desenvolvimento de métodos de HPLC associados a análise quimiométrica de dados multivariados, altamente robustos e em consoante com os princípios de química analítica verde, e portanto ecologicamente corretos. Utilizando de solventes verdes como etanol ou bioetanol (grau alimentício) cumprindo com a boa seletividade e separação dos produtos naturais. (PELISSARI et al., 2021; FUNARI et al., 2014; SOUZA et al., 2018; BORGES et al., 2020)

Esta abordagem envolve o estudo simultâneo de diversas variáveis e gera resultados mais confiáveis e robustos, extraindo o máximo de informações úteis dos dados, identificando interações entre as variáveis estudadas e reduzindo o número de experimentos, reagentes (solventes orgânicos) e energia gasto (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; FERREIRA et al., 2004). Portanto tem sido usada como uma abordagem mais simples e eficiente para examinar o efeito de todas as variáveis na resposta de interesse, ajudando a determinar as variáveis mais importantes (BELAZ, 2013).

Para o design do desenvolvimento do método, triagem de experimentos, como o planejamento fatorial completo e modelo fatorial fracionário, e metodologia de superfície de resposta são as maneiras mais populares utilizadas para obtenção de *fingerprints* cromatográficos de plantas. O planejamento experimental Doehlert é facilmente aplicado para otimizar variáveis e oferece vantagens sobre os planejamentos composto central e Box-Behnken. O benefício deste experimento é que exige menos experimentos, que são mais eficientes devido à diminuição do número de experimentos, além desta metodologia ser mais ecologicamente correta devido à menor geração de resíduos químicos (Ferreira et al., 2004). Esta estratégia tem várias vantagens, pois permite a análise comparativa de um grande número de amostras.

Até onde sabemos, as fases estacionárias de fenil-hexil, etanol, e planejamento de experimento e métricas para o monitoramento de sustentabilidade de um método no que diz respeito ao quanto um método é verde, nunca foram simultaneamente empregados no desenvolvimento de métodos cromatográficos de HPLC para soja.

1.6 Métricas de monitoramento do impacto ambiental

Na literatura, várias métricas têm sido descritas para avaliar o impacto ambiental de um método analítico; cada uma tem vantagens e desvantagens (FUNARI et al., 2014; SANDRA et al., 2010). No caso de métodos para HPLC, a HPLC-EAT (HPLC-Environmental Assessment Tool) foi considerado o mais adequado, porque permite a diferenciação precisa e classificação de métodos para HPLC (FUNARI et al., 2014, GABER et al., 2011).

HPLC-EAT foi utilizada para avaliar o grau de impacto ambiental do método analítico desenvolvido para *G. max* e estimar o impacto ambiental do método em comparação com outros métodos descritos na literatura para propósitos similares (KAO; CHEN, 2002; KIM et al., 2012).

A abordagem HPLC-EAT determina uma pontuação relacionada às características dos solventes empregados, como afetam o meio ambiente e os riscos que podem representar para a saúde e segurança do operador. Quanto menor a pontuação, menor o impacto ambiental do método e, conseqüentemente, mais verde é considerado o método (GABER et al., 2011).

A métrica *AGREE* (*Analytical GREenEss Metric*, PENA-PEREIRA; WOJNOWSKI; TOBISZEWSKI, 2020) foi utilizada como alternativa a métrica HPLC-EAT por se tratar também de uma abordagem de avaliação abrangente, flexível e direta para avaliar os impactos ambientais e ocupacionais de um procedimento analítico baseado nos 12 princípios da Química Analítica Verde (GAŁUSZKA, MIGASZEWSKI, NAMIEŚNIK, 2013).

1.7 Estudo térmico de plantas medicinais por termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial simultânea (TG-DSC)

Outro viés pouco explorado é o comportamento térmico de extratos vegetais e biomassa residual de plantas medicinais e aromáticas (MAPs) como a soja.

A análise térmica se trata de um conjunto de técnicas que possibilitam medir as propriedades físicas de uma substância em função da temperatura/tempo. Elas apresentam vantagens, uma vez que fornecem resultados mais rápidos, requerem quantidade mínimas de amostras, menor gastos de tempo e permite a verificação simultânea do teor de umidade e cinzas, fornece todo o perfil termoanalítico da amostra com menor margem de erro estando de acordo com os princípios de química analítica verde (FERNANDES et al., 2013; GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013).

Dentre as técnicas termoanalíticas utilizadas na área farmacêutica estão: Termogravimetria (TG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014).

A termogravimetria (TG) é uma técnica utilizada para determinar a variação de massa de uma amostra em função da temperatura ou tempo e expressa os resultados na forma de um gráfico denominado curva TG. Essa curva fornece informações sobre a estabilidade térmica e composição da amostra (IONASHIRO; GIGANTE; CAIRES, 2012). A partir da primeira derivada da curva TG obtém-se a curva termogravimétrica derivada ou DTG. Na qual a derivada da curva de variação de massa em relação ao tempo ou temperatura, dm/dt ou dm/dT , respectivamente, é registrada em função do tempo ou temperatura (DE SOUZA ARAÚJO et al., 2006). Estes picos apresentam área proporcional à alteração de massa na amostra,

permitindo observar a intensidade do processo de perda de massa (IONASHIRO; GIGANTE; CAIRES, 2012).

A partir da curva DSC é possível medir a razão do fluxo de energia (calor) fornecida à substância e a um material de referência em função da temperatura, tanto em condições de aquecimento quanto de resfriamento. O instrumento fornece um gráfico de temperatura em função do fluxo de calor. Consequentemente, a temperatura e a energia associada aos eventos, tais como: fusão, calor específico, transição vítrea, cristalização, sublimação, decomposição e transições cristal líquido, podem ser avaliadas (DE SOUZA ARAÚJO et al., 2006; DENARI et al., 2012).

A análise térmica tem sido considerada uma ferramenta importante no desenvolvimento de métodos analíticos, na caracterização de compostos de fitoterápicos, seus produtos e extratos. Segundo a farmacopeia brasileira 6ª edição (2010) a análise térmica pode ser utilizada para avaliação do comportamento térmico, determinação da temperatura de ebulição e sublimação, teor de umidade e/ou solventes, determinação do teor de cinzas através da termogravimetria (IONASHIRO; CAIRES; GOMES, 2014).

No contexto da fitoterapia, extratos vegetais são submetidos a diversas variações térmicas, seja pelos processos de extração dos fitoterápicos, ou por variações ambientais no armazenamento das amostras. Seguem-se, ainda, fenômenos térmicos decorrentes das reações orgânicas inerentes ao processo terapêutico intermediado pelos agentes químicos presentes no fitofármaco (DE OLIVEIRA; YOSHIDA; DE LIMA GOMES, 2011; FLORES; SINGH; KONG, 2014).

Vários autores demonstram a aplicação de diferentes técnicas de análise térmica no setor farmacêutico, que são muito importantes nas etapas de desenvolvimento dos fármacos, padronização e caracterização de extratos secos de plantas medicinais garantindo maior segurança e eficácia no uso (WESOŁOWSKI; KONIECZYŃSKI, 2003; FERREIRA et al., 2017).

1.8 Estudo térmico de biomassa residual de extratos de plantas por TG-DSC

A produção e o consumo de energia estão impactando o meio ambiente em todo o mundo. Como resultado, a conscientização relacionada à segurança energética, mudanças climáticas e uma abordagem ambientalmente correta tem sido o foco de ações (HASSAN; LIM; HAMEED, 2016; CHEN et al., 2017). Conforme apontado pela ONU sobre mudanças climáticas e agências como a *International Energy* (IEA) e *International Renewable Energy*

(IREA), aumentar a produção de energia não fóssil no consumo total de energia é de extrema importância para controlar as mudanças climáticas (KRAVANJA; VARBANOV; KLEMEŠ, 2015; BHATTACHARYA et al., 2016). Dentre esses recursos energéticos renováveis, a biomassa se destaca.

Biomassa é qualquer recurso renovável de matéria orgânica (de origem animal ou vegetal) que pode ser utilizado na produção de energia. A fração orgânica contida nos produtos de resíduos agrícolas de plantas e animais, florestais, indústrias e a fração biodegradável de outros resíduos como os municipais são exemplos de biomassa (MOUSTAKAS; PARMAXIDOU; VAKALIS, 2020). O uso da biomassa, seja por conversão termoquímica ou por processos biológicos, é considerado um caminho para a produção de energia renovável e pode ser uma fração significativa da matriz energética, abrindo caminho para uma rede energética mais sustentável. A biomassa é uma alternativa para a dependência de combustíveis fósseis na geração de energia e uma abordagem para reduzir as emissões de gases de efeito estufa e a poluição atmosférica (CHEN et al., 2017).

A biomassa residual gera grandes quantidades de resíduos sólidos. É um subproduto que pode ou não ser um resíduo (OLOFSSON; BÖRJESSON, 2018) de processos agroindustriais nos setores de fitoterápicos, perfumaria e cosméticos utilizando plantas medicinais e aromáticas (MAPs). Eles são gerados a partir de processos de destilação a vapor de plantas medicinais e são originados da parte não utilizada da planta após a extração do óleo essencial. Apenas 5% de toda a planta é extraída, o que gera uma grande quantidade de resíduos sólidos. Cerca de 200.000 toneladas de resíduos são geradas em todo o mundo durante os processos de extração de plantas aromáticas e podem ser reciclados e convertidos aplicando processos de extração, hidrólise, pirólise, entre outros. Embora essa biomassa seja neutra em carbono e não afete a atmosfera com a emissão de poluentes como o CO₂, essa biomassa residual torna-se um resíduo e requer um processo adequado de reciclagem para evitar consequências ambientais (ZHU et al., 2012; SAYED-AHMAD et al., 2017). A biomassa residual das plantas medicinais é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (ROUT et al., 2015). É rico em compostos polifenólicos e diversos compostos bioativos que podem ser usados na produção de biogás (WANG et al., 2013) produtos de valor agregado como biossorventes no tratamento do solo (BASAK, 2017), biocombustível lignocelulósico (ZHELJAZKOV et al., 2018), biopesticidas (TRAKA et al., 2018).

A soja (*Glycine max* L.) é um exemplo de planta medicinal amplamente utilizada no setor industrial por ser utilizada como alimento com diversas aplicações, além de possuir propriedades fitoterápicas. A maior parte do resíduo de soja não é totalmente aproveitada. É

descartado como resíduo industrial, causando grandes problemas ambientais devido às grandes quantidades de água e nutrientes presentes, que promovem o crescimento de microrganismos (CHEN et al., 2014).

Nosso grupo demonstrou extrações eficientes de compostos de alto valor agregado presentes no resíduo da soja no campo, utilizando solventes verdes como etanol e acetona (CARNEIRO et al., 2020). Esse estudo combinado a uma abordagem termoanalítica auxiliam em tomadas de decisões que levem em consideração a relação custo/benefício dos processos.

O desenvolvimento e a otimização de técnicas termogravimétricas (TG) têm sido consideradas uma importante ferramenta termoanalítica na análise da combustão de resíduos vegetais agrícolas. É simples, eficiente, de baixo custo e promove a redução do fluxo de resíduos, geração e reaproveitamento de energia. Como a combustão é responsável por 97% da produção mundial de bioenergia, segundo Chen e coautores (CHEN et al., 2017) o estudo de fontes alternativas de energia para a combustão é de extrema importância. O estudo do comportamento térmico e dos parâmetros térmicos da biomassa sob combustão pode contribuir para o melhor entendimento e otimização da geração de energia por conversão de biomassa.

Existem poucos estudos termoanalíticos relacionados a resíduos vegetais de plantas medicinais. Portanto, a investigação do comportamento térmico desses materiais pode certamente contribuir para esta área, proporcionando conhecimentos termodinâmicos e de combustão sobre resíduos agrícolas, principalmente aqueles provenientes de plantas medicinais e aromáticas (MAPs).

Objetivos

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver alternativas para reduzir o impacto ambiental em análises de soja, podendo ser aplicadas no controle de qualidade de produtos à base de soja.

2.1 Etapas planejadas para atingir o objetivo proposto

- ✓ Determinar o modelo matemático e as condições ótimas de análise do extrato de *G. max* por HPLC fazendo uso de uma abordagem multivariada (Planejamentos fatoriais e Doehlert), utilizando água e etanol como fase móvel.
- ✓ Validar o método cromatográfico desenvolvido e identificar as bandas cromatográficas das principais isoflavonas presente na soja, seguindo as orientações internacionais (ICH).
- ✓ Mensurar o impacto ambiental do método desenvolvido e comparar com métodos consolidados da literatura em termos de performance cromatográfica e impacto ambiental aplicando métricas apropriadas (HPLC-EAT e AGREE).
- ✓ Aplicar o método desenvolvido em amostras comerciais de soja.
- ✓ Traçar o perfil térmico de *G. max* por termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial simultânea (TG-DSC).
- ✓ Determinar os parâmetros de combustão e comparar com os parâmetros obtidos para *G. max*.
- ✓ Avaliar quantitativamente por TG-DSC, os parâmetros de combustão *G. max* e sua biomassa residual.

Parte experimental

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais, Reagentes e Soluções

Os procedimentos experimentais foram realizados utilizando Ácido acético glacial (grau analítico, Synth, Diadema, SP, Brasil); para as análises em HPLC foram utilizados solventes grau HPLC: etanol (Tedia, Fairfield, OH, EUA), bioetanol 95 GL (grau alimentício, Quimisul SC, Joinville, SC, Brasil), água purificada em sistema Milli-Q (Millipore®); para as análises de espectrometria de massas foram utilizados solventes grau LC/MS: metanol e ácido fórmico (Merck) e água purificada em sistema Milli-Q (Millipore®)..

Cartuchos de extração em fase sólida (SPE) de fase reversa a base de octadecilsilano (C18) com 500 mg mL⁻¹ (33 µm, Phenomenex®) foram usados na etapa de *clean-up* dos extratos, sendo as soluções resultantes filtradas em membranas de PTFE (politetrafluoroetileno, *teflon*®, Phenomenex®) com poro de 0,45 µm.

3.2 Procedimentos gerais e instrumentação

3.2.1 Cromatografia analítica

As análises utilizando princípios de química verde para o extrato etanólico 70% das sementes de *G. max* foram realizadas em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (analítico, gradiente quaternário) modelo PU-2089 (Jasco®), acoplado a detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm, modelo MD-2010 Plus (Jasco®) e injetor automático modelo AS – 2055 Plus. As colunas C₁₈ utilizadas foram a XSelect (fase ligada fenil-hexil), e XBridge (C18 polimérica) ambas com 150 × 4,6 mm, d.i. 5 µm (Waters, EUA), Phenomenex Luna (250 x 4.60 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex®, USA) e pré-coluna (4 x 3 mm, 5µm, Phenomenex®, USA). A aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi realizada com o *software ChromNAV* (Cromatec®).

3.2.2 HPLC-ESI-IT-MS

A análise por HPLC-PAD-ESI-IT-MS foi realizada em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Thermo Scientific® (Thermo Accela), consistindo de um amostrador automático Accela AS, uma bomba Accela quaternária acoplada ao espectrômetro de massas de retenção iônica LCQ Fleet iontrap (Thermo LCQ Fleet, San Jose,

CA, EUA) com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) em modo negativo. Utilizou-se tubo capilar de sílica fundida a 275 °C, voltagem de spray de 4,50 kV, voltagem capilar de 11 V e lente tubular de -115 V. A análise de prospecção de íons completa foi registada em intervalo de 50-1000 m/z . Fragmentações de múltiplos estágios (ESI-MSⁿ) foram realizadas usando a dissociação induzida por colisão (CID). O primeiro evento foi um espectro de massa de varredura completa, monitorando a intensidade de todos os íons produzidos naquela faixa de m/z . O segundo evento de prospecção iônica foi uma experiência de MS/MS realizada utilizando uma varredura dependente dos dados das moléculas de interesse em cada amostra com uma energia de colisão de 26% e um tempo de ativação de 30 ms. O software Xcalibur versão 1.3 (Thermo Finigan, San Jose, CA, EUA) foi usado para adquirir e processar dados.

3.2.3 TG-DSC

As análises de termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial simultâneas (TG-DSC) foram realizadas em um Analisador Termogravimétrico Mettler Toledo/ Calorímetro de Varredura Diferencial, modelo TG/DSC 1, usando cadinhos de α -alumina (150 μ L), massa de amostra de cerca de 10 mg, razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, faixa de aquecimento 100-800 °C e atmosfera dinâmica de ar com uma vazão de 50 mL min⁻¹. Os produtos gasosos liberados durante o aquecimento das amostras foram identificados pelo acoplamento do TG-DSC a um espectrômetro de FTIR da Thermo Scientific Nicolet, modelo iS10, com linha de transferência de 120 cm de comprimento, aquecida a 225 °C. O espectrômetro foi equipado com uma célula de gás aquecida (250 °C), com um detector DTGS e janela de ZnSe. Utilizando software STARe.

Os espectros de FTIR foram registrados na faixa de comprimento de onda de 4000-675 cm⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹ e 16 varreduras por espectro. A identificação dos produtos gasosos foi baseada em bibliotecas de espectros de referência disponíveis no software do espectrômetro (OMNIC 8.0).

3.2.4 Demais equipamentos utilizados

Outros equipamentos que foram utilizados no trabalho estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1- Demais equipamentos utilizados para o desenvolvimento do projeto

Equipamentos	Fabricante / Modelo
Triturador Industrial	Vithory®/TR006
Ultrapurificador de água	Millipore/Direct-Q® 3UV
Evaporador rotativo	Buchi®/R 215
Balança semi-analítica	Shimadzu/ATY224

3.3 Metodologia

3.3.1 Etapa Botânica

Sementes autênticas de *Glycine max* (L.) Merr. foram coletados da Fazenda de Ciências Agronômicas, localizada na cidade de Botucatu, SP, Brasil, no início de março de 2017 e foram certificadas pelo Prof. Dr. Edvaldo Aparecido Amaral da Silva. Uma amostra foi depositada no banco de sementes do Laboratório de Sementes da Faculdade de Ciências Agrárias / UNESP, Botucatu, SP, Brasil, sob o código w799. Sementes comerciais de soja foram adquiridas na cidade de Bauru, SP, Brasil, originadas de diferentes locais de produção: cinco no estado de São Paulo (região sudeste) e uma no estado do Rio Grande do Sul (região sul). As amostras foram armazenadas em recipientes hermeticamente fechados a -20 °C e protegidas da luz.

3.3.2 Preparação do extrato hidroetanólico de *Glycine max*

As sementes de soja foram trituradas em triturador industrial (Vithory®/TR006). Em seguida, utilizou-se método de extração adaptado de Kim et al. (2012). Em que 1 g do pó foi imerso em 10 mL de uma mistura extratora de EtOH/H₂O (7:3, v/v) na proporção de 1:10 (material vegetal/mistura extratora). A extração foi realizada por maceração dinâmica (120 rpm, 30 °C e 2 h). Após a extração, os líquidos extratores foram evaporados em evaporador rotativo (Buchi) sob pressão reduzida a 40 °C. O extrato foi congelado, e o material foi colocado em um Liofilizador Alpha 1-2 LDplus (Christ, Osterode, LS, Germany) para remoção completa da água. O EHA foi armazenado em freezer a -20 °C para posteriores análises.

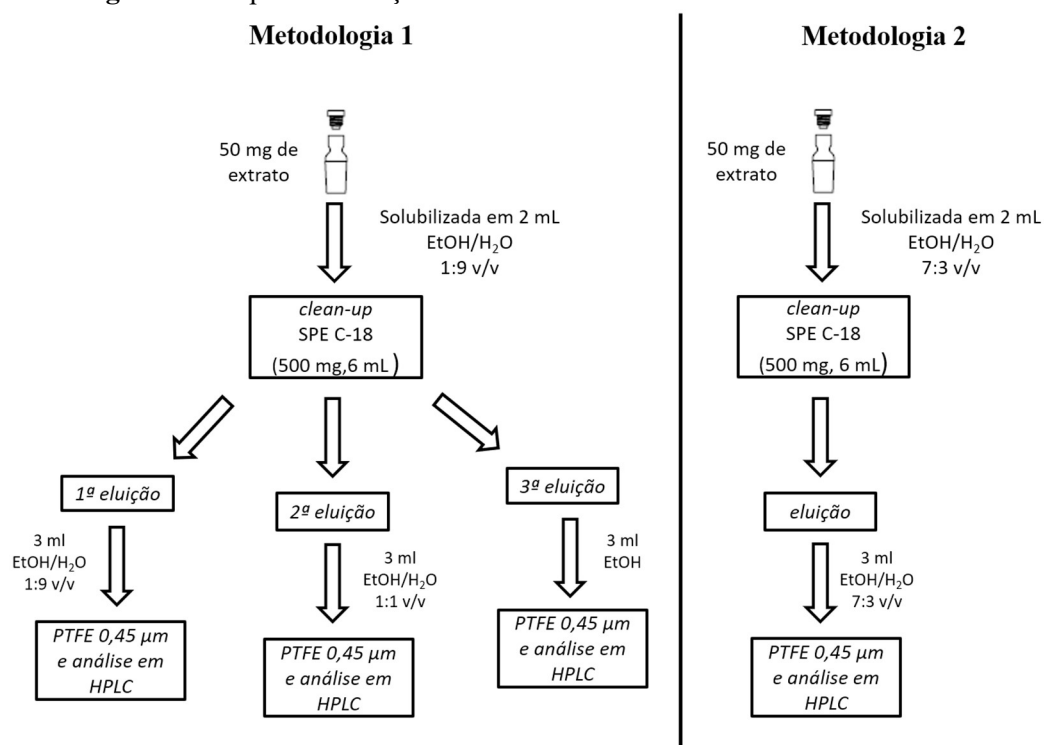
3.3.3 Preparo de amostra (*clean-up*) do extrato hidroalcólico para análises por HPLC

O preparo das amostras pra análise por HPLC foi avaliado empregando duas metodologias diferentes de *clean up* por extração em fase sólida (SPE) em cartuchos de fase reversa C18 (Strata-E, 500 mg, 6 mL, Phenomenex). Para investigar qual fração contempla as as bandas cromatográficas das principais isoflavonas presente na soja. Os cartuchos foram previamente ativados com EtOH (3,0 mL) e equilibrados com H₂O (3,0 mL). Na metodologia 1, o extrato hidroetanólico 70% de *G. max* (50 mg) foi previamente solubilizado em 3 mL da solução EtOH/H₂O (1:9, v/v) carregada no cartucho e eluído sequencialmente com 3 mL de EtOH/H₂O (1:9, v/v), 3 mL de EtOH/H₂O (1:1, v/v) e 3 mL de EtOH 100%. Na metodologia 2, o extrato (50 mg) foi solubilizado em 3 mL da solução EtOH/H₂O (7:3, v/v) e eluído com a mesma proporção de fase móvel (Figura 3).

Após a secagem, 20 mg de cada amostra foram ressuspendidas em 2 mL de uma solução EtOH/H₂O (1:1, v/v) fornecendo uma solução com uma concentração de 10 mg mL⁻¹. Ao fim, as soluções foram filtradas em filtro PTFE Millex[®] com tamanho de poro 0,22 µm e 25 mm de diâmetro.

As amostras pré-tratadas foram então analisadas por HPLC-PDA.

Figura 3 - Etapas de extração em fase sólida com cartuchos de fase reversa.



Fonte: próprio autor

3.3.4 Condições cromatográficas

Nas análises que avaliaram a eficiência dos diferentes preparos de amostra (seção 3.3.3) o modo de eluição utilizado foi gradiente linear com uma fase móvel composta por água acidificada com 0,5% de ácido acético (solvente A) e etanol (solvente B), de 5 a 100% (B) em 60 min. Vazão: 1 mL min⁻¹. Temperatura de análise: 35 °C; volume de injeção: 20 µL.

Para as análises do planejamento experimental, as condições variaram em cada experimento como descrito na seção 3.3.5

Para a identificação dos constituintes e análises das amostras comerciais de soja foi utilizado HPLC-PDA-ESI-MS/MS e HPLC- PDA com coluna analítica XSelect (150 mm × 4,60 mm d.i. × 5 µm., Waters) acoplada a uma pré coluna fenil-hexil (4 × 3 mm, 5 µm; Phenomenex). O método empregou água acidificada com 0,5 % de ácido acético (solvente A) e etanol (solvente B) e bioetanol 95 GL (solvente C) a 1 mL min⁻¹ e 35 °C no seguinte gradiente: 5–55% B (0–30 min; método otimizado), 55–100% B (30–31 min), 100% B (41 min) ou 5,3–57,9% C (0–30 min; método à base de bioetanol correspondente), 57,9–100% C (30–31 min), 100% C (41 min). O equilíbrio da fase estacionária foi realizado com 5% B ou 5,3% C por 30 min. Um pré-aquecedor de 2 µL (Thermo Fischer Scientific) foi acoplado à pré-coluna e posicionado no forno da coluna. O volume de injeção e o tempo de equilíbrio da coluna foram estabelecidos em 20 µL e 30 min, respectivamente.

Foi utilizado com o solvente orgânico EtOH grau HPLC para as análises por HPLC-ESI-MS. Para as análises por HPLC- PDA foi utilizado como solvente orgânico o EtOH grau HPLC e o bioetanol.

3.3.5 Desenvolvimento e otimização do método cromatográfico verde

Para a determinação dos efeitos dos fatores cromatográficos foi aplicado um planejamento fatorial fracionário (2_{IV}^{7-2}) de sete fatores e dois níveis sem repetições do ponto central para avaliar a relevância de algumas variáveis (Tabela 2). Esse planejamento experimental foi selecionado considerando que ele possibilita a triagem de variáveis com um número reduzido de experimentos em comparação com o Planejamento Fatorial Completo (MONTGOMERY, 2017), o que permite a economia de energia, tempo e reagentes e, portanto, de acordo com os princípios 7, 8 e 9 da Química Analítica Verde

O planejamento utilizado foi o planejamento fatorial fracionário, com sete fatores (variáveis) e dois níveis (2_{IV}^{7-2}) que totalizaram 32 experimentos (Tabela 3). Como resposta,

contabilizou-se o número de bandas cromatográficas observados nos cromatogramas em 260 nm.

Tabela 2 - Fatores (variáveis) e níveis estabelecidos na triagem para desenvolvimento do método de eluição verde por HPLC-PDA de *G. max*.

Variáveis	Níveis	
	-1	+1
X1. % inicial de EtOH	5	10
X2. % final de EtOH	55	75
X3. Temperatura das análises (°C)	35	80
X4. % de AcOH	0,1	0,5
X5. Vazão (mL min ⁻¹)	0,5	1,0
X6. Tempo de corrida (min)	30	60
X7. Fase Estacionária	XBridge	XSelect

Tabela 3 - Planejamento fatorial fracionário com 2 níveis e 7 fatores (2_{IV}^{7-2}) para avaliação dos efeitos dos parâmetros cromatográficos das análises de *G. max* por HPLC-PDA.

Experimentos	X1	X2	X3	X4	X5	X6 (1234)	X7 (1245)
1	-1 (5%)	-1 (55%)	-1 (35°C)	-1 (0,1%)	-1 (0,5)	1 (60 min)	1(XSelect)
2	1 (10%)	-1 (55%)	-1 (35°C)	-1 (0,1%)	-1 (0,5)	-1 (30 min)	-1(XBrigde)
3	-1 (5%)	1 (75%)	-1 (35°C)	-1 (0,1%)	-1 (0,5)	-1 (30 min)	-1(XBrigde)
4	1 (10%)	1 (75%)	-1 (35°C)	-1 (0,1%)	-1 (0,5)	1 (60 min)	1(Xselect)
5	-1 (5%)	-1 (55%)	1 (80°C)	-1 (0,1%)	-1 (0,5)	-1 (30 min)	1(XSelect)
6	1 (10%)	-1 (55%)	1 (80°C)	-1 (0,1%)	-1 (0,5)	1 (60 min)	-1(XBrigde)
7	-1 (5%)	1 (75%)	1 (80°C)	-1 (0,1%)	-1 (0,5)	1 (60 min)	-1(XBrigde)
8	1 (10%)	1 (75%)	1 (80°C)	-1 (0,1%)	-1 (0,5)	-1 (30 min)	1(XSelect)
9	-1 (5%)	-1 (55%)	-1 (35°C)	1 (1%)	-1 (0,5)	-1 (30 min)	-1(XBrigde)
10	1 (10%)	-1 (55%)	-1 (35°C)	1 (1%)	-1 (0,5)	1 (60 min)	1(XSelect)
11	-1 (5%)	1 (75%)	-1 (35°C)	1 (1%)	-1 (0,5)	1 (60 min)	1(XSelect)
12	1 (10%)	1 (75%)	-1 (35°C)	1 (1%)	-1 (0,5)	-1 (30 min)	-1(XBrigde)
13	-1 (5%)	-1 (55%)	1 (80°C)	1 (1%)	-1 (0,5)	1 (60 min)	-1(XBrigde)
14	1 (10%)	-1 (55%)	1 (80°C)	1 (1%)	-1 (0,5)	-1 (30 min)	1(XSelect)
15	-1 (5%)	1 (75%)	1 (80°C)	1 (1%)	-1 (0,5)	-1 (30 min)	1(XSelect)
16	1 (10%)	1 (75%)	1 (80°C)	1 (1%)	-1 (0,5)	1 (60 min)	-1(XBrigde)
17	-1 (5%)	-1 (55%)	-1 (35°C)	-1 (0,1%)	1 (1 ml)	1 (60 min)	-1(XBrigde)
18	1 (10%)	-1 (55%)	-1 (35°C)	-1 (0,1%)	1 (1 ml)	-1 (30 min)	1(XSelect)
19	-1 (5%)	1 (75%)	-1 (35°C)	-1 (0,1%)	1 (1 ml)	-1 (30 min)	1(XSelect)
20	1 (10%)	1 (75%)	-1 (35°C)	-1 (0,1%)	1 (1 ml)	1 (60 min)	-1(XBrigde)
21	-1 (5%)	-1 (55%)	1 (80°C)	-1 (0,1%)	1 (1 ml)	-1 (30 min)	-1(XBrigde)
22	1 (10%)	-1 (55%)	1 (80°C)	-1 (0,1%)	1 (1 ml)	1 (60 min)	1(XSelect)
23	-1 (5%)	1 (75%)	1 (80°C)	-1 (0,1%)	1 (1 ml)	1 (60 min)	1(XSelect)
24	1 (10%)	1 (75%)	1 (80°C)	-1 (0,1%)	1 (1 ml)	-1 (30 min)	-1(XBrigde)
25	-1 (5%)	-1 (55%)	-1 (35°C)	1 (1%)	1 (1 ml)	-1 (30 min)	1(XSelect)
26	1 (10%)	-1 (55%)	-1 (35°C)	1 (1%)	1 (1 ml)	1 (60 min)	-1(XBrigde)
27	-1 (5%)	1 (75%)	-1 (35°C)	1 (1%)	1 (1 ml)	1 (60 min)	-1(XBrigde)
28	1 (10%)	1 (75%)	-1 (35°C)	1 (1%)	1 (1 ml)	-1 (30 min)	1(XSelect)
29	-1 (5%)	-1 (55%)	1 (80°C)	1 (1%)	1 (1 ml)	1 (60 min)	1(XSelect)
30	1 (10%)	-1 (55%)	1 (80°C)	1 (1%)	1 (1 ml)	-1 (30 min)	-1(XBrigde)
31	-1 (5%)	1 (75%)	1 (80°C)	1 (1%)	1 (1 ml)	-1 (30 min)	-1(XBrigde)
32	1 (10%)	1 (75%)	1 (80°C)	1 (1%)	1 (1 ml)	1 (60 min)	1(XSelect)

Foi utilizado duas estratégias complementares: Inicialmente, (I) um gráfico de probabilidade normal foi empregado para identificar graficamente as variáveis mais relevantes.

(NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; PEREIRA, 2015; ZAVISKA et al., 2011; MONTGOMERY, 2017; BOX; HUNTER, 1978; DEJAEGHER; VANDER HEYDEN, 2001; LUNDSTEDT et al., 1998; TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Para confirmar sua relevância, esta etapa foi seguida por (II) monitorar a contribuição de cada contraste estimado ao quadrado (correspondente às variáveis estudadas e suas possíveis interações) sobre a soma dos quadrados de todos os contrastes calculados (PEREIRA, 2015; ZAVISKA et al., 2011) de acordo com a Equação 1:

$$\text{Porcetagem } P_i = (\text{contraste } i^2 / \sum \text{contraste } i^2) \cdot 100 \quad (1)$$

onde P_i é a porcentagem de contribuição de um dado contraste ao quadrado sobre a soma dos quadrados em relação a todos os estimados, o contraste i^2 é o contraste ao quadrado estimado no projeto fatorial fracionário (2_{IV}^{7-2}) e $\sum \text{Contraste } 2i$ é a soma dos quadrados de todos os contrastes calculados.

Uma vez que as variáveis significativas foram identificadas (Figura 8), empregamos um planejamento de Doehlert (FERREIRA et al., 2004; DOEHLER, 1970) (Tabela 5 e 6) para estimar um modelo empírico que pudesse descrever matematicamente o domínio experimental e indicar uma região experimental ótima. A resposta para número de bandas cromatográficas (n) foi monitorado em 260 nm, em que n era o número total de bandas ao longo do cromatograma. Os experimentos foram realizados de forma aleatória para evitar qualquer viés nos resultados e erros sistemáticos de otimização.

3.3.6 Quimiometria e análise de dados

Os dados foram organizados no LibreOffice Calc 5. A análise de variância (ANOVA), regressão e as análises gráficas foram realizadas com o software Statistica, v. 12 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

3.3.7 Métrica para o método cromatográfico verde otimizado

A pontuação dada pelo HPLC-EAT é calculada de acordo com a Equação 2, considerando os impactos de cada componente da fase móvel à saúde, segurança e ambiente (SHE).

$$\text{HPLC-EAT} = m_i (S_i + H_i + E_i) + m_{i+1} (S_{i+1} + H_{i+1} + E_{i+1}) + \dots \quad (2)$$

A pontuação SHE (*Safety, Health and Environment*) é determinada a partir de diferentes parâmetros, como toxicidade aguda e crônica e persistência no ambiente (KOLLER et al., 2000).

S, *H* e *E* são as pontuações para cada componente da fase móvel em relação aos parâmetros Segurança, Saúde e Ambiente, respectivamente. E *m* é a massa em gramas do composto usado no método. Quanto menor for a pontuação (*score*) do HPLC-EAT, menor será o impacto ambiental do método cromatográfico. Essas informações e o software utilizado foram obtidas a partir do trabalho de Gaber et al. (2011).

3.3.8 Avaliação do impacto ambiental: AGREE – Analytical GREENess

A métrica tem como objetivo quantificar o impacto ambiental do método desenvolvido e estabelecer comparações com os métodos de referência (KAO; CHEN, 2012 e KIM et al., 2014) para os quais podem ser atribuídos pesos pelo analista, os quais são transformados em uma escala que varia de 0 a 1.

Os resultados foram apresentados na forma de pictograma por um *software* de livre acesso disponibilizado no material suplementar da referência original. O pictograma indica o *score* final, o desempenho do processo analítico em cada um dos critérios avaliados e pesos atribuídos pelo usuário (PENA-PEREIRA, WOJNOWSKI, TOBISZEWSKI, 2020).

3.3.9 Validação do método cromatográfico verde

A validação do método desenvolvido para *G. max* foi feita de acordo com *International Conference for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 2005). Para isso, a Repetibilidade e a Precisão Instrumental seguiram uma metodologia descrita por Funari et al. (2014) para matrizes complexas. O desvio padrão relativo (DPR) para cada parâmetro foi realizado comparando (i) as áreas de pico das seis isoflavonas únicas identificadas (bandas 3-8,) nos cromatogramas, (ii) e as diferenças entre o tempo de retenção (*tR*) das bandas identificadas como isoflavonas e o valor de *tR* observado para a banda cromatográfica de referência (*tR*: 16,81 min) destacado por um asterisco na (Figura 10 B).

3.4 Análise TG-DSC

Foram avaliados por TG-DSC as sementes secas de *G. max*, sua biomassa residual e extrato hidroetanólico. O preparo do extrato hidroetanólico para análise por TG-DSC foi realizado de forma semelhante ao descrito na seção 3.3.2, porém em escala maior para obtenção de maior massa. Resumidamente 50 g do pó seco das sementes de *G. max* foram imersos em 500 mL de solvente de extração composto de etanol e água (7:3, v/v), resultando na proporção de 1:10 (m/v). O solvente de extração foi trocado a cada 48 horas, totalizando 6 dias de preparo. Após a extração, os solventes foram evaporados em um evaporador rotativo R-300 (Buchi, Suíça) sob pressão reduzida a 40 °C. O extrato foi transferido para um recipiente, congelado a -20 °C e liofilizado para completar a remoção de H₂O.

3.4.1 Avaliação dos parâmetros de combustão

Para avaliar quantitativamente o desempenho da combustão para o extrato de *G. max* e biomassa residual foram aplicadas as equações descritas por CHEN et al., 2017. Os parâmetros (D_v , índice de matéria volátil liberada; C_i , índice de ignição; C_b , índice de queima; S , índice de combustibilidade abrangente) e as equações necessárias para os cálculos estão descritos abaixo:

$$D_v = \frac{-R_p}{T_p \times T_v \times \Delta T_{1/2}} \quad (3)$$

$$C_i = \frac{-R_p}{t_i \times t_p} \quad (4)$$

$$C_b = \frac{-R_p}{\Delta t_{1/2} \times t_p \times t_b} \quad (5)$$

$$S = \frac{(-R_p) \times (-R_v)}{T_i^2 \times T_p} \quad (6)$$

- $-R_p$ é a taxa máxima de perda de massa em $\% \text{ min}^{-1}$;
- T_v representa a temperatura inicial de volatilização em k. T_p é a temperatura de pico em k; $\Delta t_{1/2}$ é o intervalo de tempo na metade do valor de $-R_p$ em k;
- T_i é a temperatura de ignição em k, T_p , o tempo de pico;
- T_b é a temperatura de queima em k;
- t_i , t_b , representam o tempo de ignição, o tempo de queima, respectivamente. R_v é a taxa média de perda de massa em $\% \text{ min}^{-1}$;

Quanto maior o valor de S melhor é a reatividade do combustível ou da mistura (BURATTI et al., 2015; LÓPEZ et al., 2014a; MOON et al., 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Desenvolvimento do método cromatográfico verde para a análise de *G. max*

4.1.1 Avaliação do preparo de amostras (*clean-up*) por HPLC-PDA

Estudos fitoquímicos dos extratos EHA das sementes de *G. max* mostraram que é composto por uma mistura complexa de metabólitos secundários como polifenóis, flavonóides, catequinas, ácidos fenólicos, carotenóides. Devido à alta complexidade do extrato EHA das sementes de *G. max* como demonstrado por (DENARDIN et al., 2015; LEE et al., 2018; LEE, KIMB, ZHENG, ROW, 2007; NIAMNUY et al., 2011) a realização de etapas de pré-tratamento da amostra se fez necessária pois permite a eliminação de possíveis interferentes que prejudicam a eficiência de separação das isoflavonas como também a resolução cromatográfica refletindo na resposta dos analitos de interesse. Portanto, o extrato foi submetido a dois métodos de *clean-up* com extração em fase sólida (SPE), utilizando cartuchos Sep-pack de C₁₈ para a remoção das substâncias apolares que poderiam ficar adsorvidas na coluna de fase reversa do sistema HPLC, prejudicando a eficiência da coluna e reduzindo o seu tempo de vida útil.

Nesse ponto, é importante frisar a importância do *clean-up* no processo de triagem de variáveis e na utilização de HPLC verde, pois o mesmo permite que as substâncias que possam causar interferências nas análises sejam eliminadas antes que a amostra seja injetada no HPLC-PDA. Assim, podemos obter uma concentração mais alta dos analitos de interesse, aumentando a sensibilidade do método.

Nas análises por HPLC-PDA foram utilizadas as condições descritas na seção 3.3.4. A água da fase móvel foi acidificada a fim de se evitar o encaudamento das bandas cromatográficas dos metabólitos presentes no EHA, pois os metabólitos presentes possuem grupos fenólicos que pode sofrer ionização. Portanto, a função do ácido na fase móvel é de suprimir essa ionização de compostos de caráter ácido. A escolha do ácido acético (AcOH) e do EtOH foi baseada na classificação do guia “CHEM21 *selection guide of classical- and less classical-solvents*” (PRAT et al., 2016).

No cromatograma do EHA das sementes de *G. max* obtido para a fração EtOH/H₂O (1:9, v/v), (Figura 4) é possível observar a presença de pequenas bandas com tempos de retenção entre 5 a 10 min, região que representa substâncias com polaridade mais elevada e bandas intensas com tempos de retenção maiores e menor polaridade.

No cromatograma da fração EtOH/H₂O (1:1, v/v), (Figura 5) é possível observar a presença das mesmas bandas intensas da fração EtOH/H₂O (1:9, v/v), porém sem a presença de substâncias de alta polaridade.

No cromatograma da fr. 100% EtOH (Figura 6) é possível observar que as substâncias estão presentes em quantidades muito pequenas, podendo ser confundidas com os ruídos da linha de base e, com isso, não sendo possível analisar os espectros UV.

Por último, no cromatograma da fr. EtOH/H₂O (7:3, v/v), (Figura 7), fração proveniente do segundo método de *clean-up*, foi possível observar a presença das substâncias da fração EtOH/H₂O (1:9, v/v), fração EtOH/H₂O (1:1, v/v) e fração 100 % EtOH. Portanto permitiu concentrar as substâncias representativas do extrato em uma única fração, com apenas uma eluição. Esse método possibilita o preparo da amostra de *G. max* em menor tempo e com menor desperdício de solventes, contemplando os princípios da Química Verde. Portanto, foi o escolhido para ser utilizado nas próximas etapas deste trabalho.

Figura 4 - Cromatogramas referentes às etapas de pré-tratamento do extrato hidroetanólico 70% de *G. max*. **metodologia 1.** Eluição 1: EtOH/H₂O (1:9, v/v). Sistema de eluição gradiente: 5-100% EtOH em 60 min, coluna C18 XBridge (150 x 4.6 mm d.i.; 5 µm), com pré-coluna (4 x 3 mm, 5µm), HPLC (Jasco®), vazão 1,0 mL min⁻¹, λ = 260 nm.

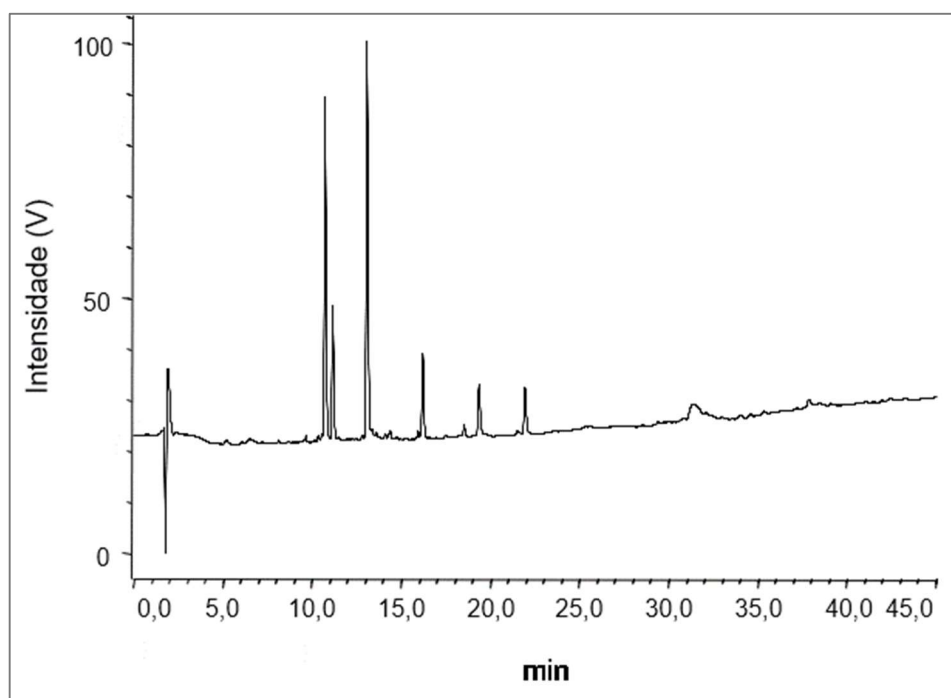


Figura 5. Cromatogramas referentes às etapas de pré-tratamento do extrato hidroetanólico 70% de *G. max*. **metodologia 1.** Eluição 2: EtOH/H₂O (1:1, v/v). Sistema de eluição gradiente: 5-100% EtOH em 60 min, coluna C18 XBridge (150 x 4.6 mm d.i.; 5 μ m), com pré-coluna (4 x 3 mm, 5 μ m), HPLC (Jasco®), vazão 1,0 mL min⁻¹, λ = 260 nm.

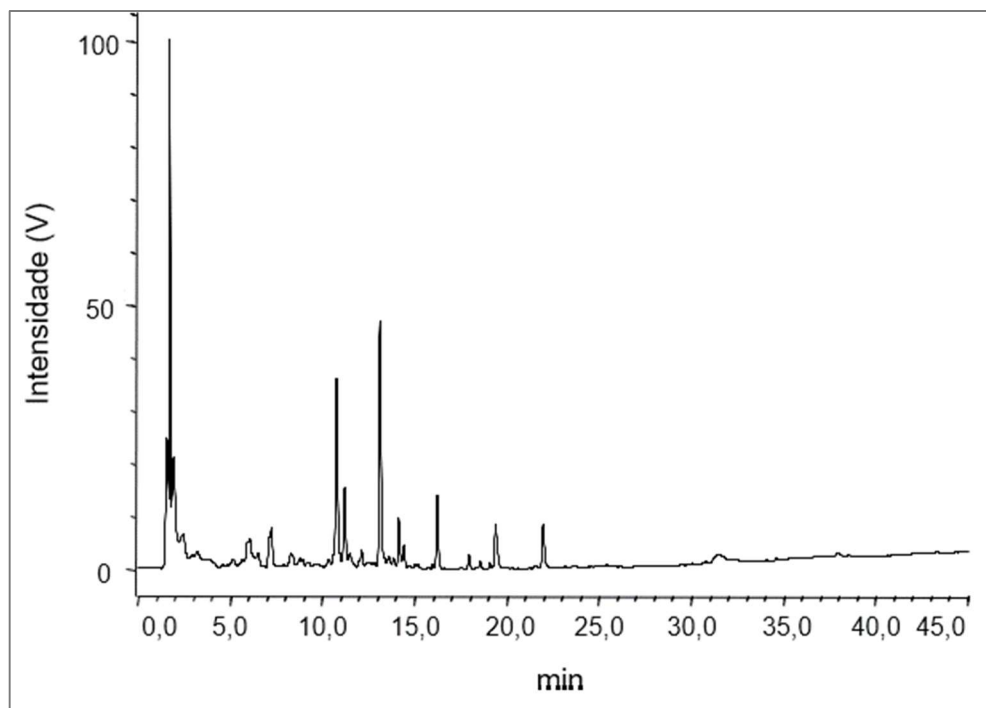


Figura 6. Cromatogramas referentes às etapas de pré-tratamento do extrato hidroetanólico 70% de *G. max*. **metodologia 1.** Eluição 3: 100% EtOH. Sistema de eluição gradiente: 5-100% EtOH em 60 min, coluna C18 XBridge (150 x 4.6 mm d.i.; 5 μ m), com pré-coluna (4 x 3 mm, 5 μ m), HPLC (Jasco®), vazão 1,0 mL min⁻¹, λ = 260 nm.

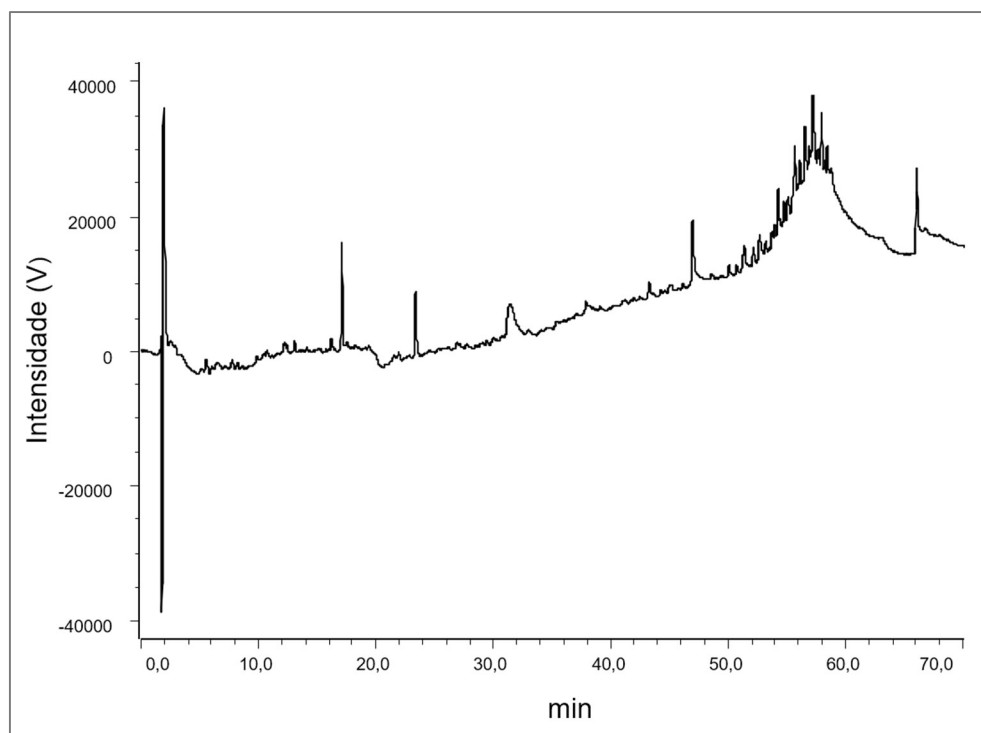
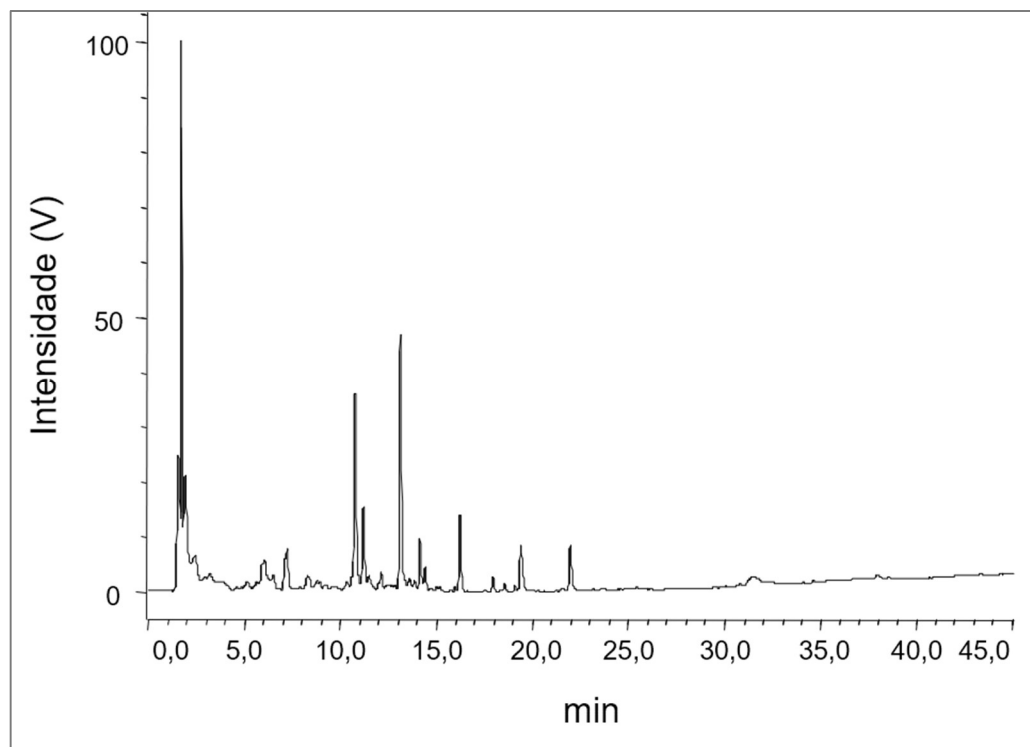


Figura 7. cromatogramas referentes às etapas de pré-tratamento do extrato hidroetanólico 70% de *G. max*. **metodologia 2.** EtOH/H₂O (7:3, v/v). Sistema de eluição gradiente: 5-100% EtOH em 60 min, coluna C18 XBridge (150 x 4.6 mm d.i.; 5 µm), com pré-coluna (4 x 3 mm, 5 µm), HPLC (Jasco®), vazão 1,0 mL min⁻¹, λ = 260 nm.



4.1.2 Aplicação de avaliação do planejamento fatorial fracionário (2^{IV-2})

Esta etapa teve o objetivo de identificar, dentre sete variáveis avaliadas, aquela(s) que apresenta(m) maior(es) efeito(s) na separação dos metabólitos secundários de *G. max* por HPLC-PDA, utilizando EtOH e água como fase móvel.

O comprimento de onda de 260 nm empregado permitiu obter a melhor resposta de absorção para os derivados de isoflavonas presentes no EHA e que são os marcadores da soja.

A primeira etapa do planejamento experimental foi identificar as variáveis que seriam significativas na separação dos constituintes. Para isso foi empregado o Planejamento fatorial fracionário de 7 variáveis e 2 níveis sem repetições e sem ponto central. Exemplos relativos a planejamentos experimentais sem ponto central podem ser encontrados em várias referências (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; PEREIRA, 2015; MONTGOMERY, 2017; BOX, HUNTER, HUNTER, 1978).

As variáveis quantitativas estudadas foram (X1) % inicial de EtOH, (X2) % final de EtOH, (X3) temperatura de análise (°C), (X4) % de ácido acético em água, (X5) vazão (em mL min⁻¹) e (X6) tempo de análise (min). A variável qualitativa foi (X7) fase estacionária.

O volume de injeção e a concentração da amostra foram fixados com valores que permitissem a análise dos espectros UV das substâncias eluídas e esses valores foram 20 µL e concentração de 1 g L⁻¹, respectivamente. A matriz de experimentos e os resultados obtidos em cada experimento são mostrados na Tabela 3. Os cromatogramas referentes às triagens de variáveis estão apresentados na Figura S1 no apêndice.

Tabela 3 - Planejamento fatorial fracionário com 2 níveis e 5 fatores (2_{IV}^{7-2}) e as respostas obtidas para cada análise.

Exp.	Variáveis ^{a,b}							Resultados ^{c,d}
	X1	X2	X3	X4	X5	X6 (1234)	X7 (1245)	n
1	-1 (5,0)	-1 (55,0)	-1 (35,0)	-1 (0,1)	-1 (0,5)	1 (60,0)	1 (XSelect)	11
2	1 (10,0)	-1 (55,0)	-1 (35,0)	-1 (0,1)	-1 (0,5)	-1 (30,0)	-1 (XBridge)	8
3	-1 (5,0)	1 (75,0)	-1 (35,0)	-1 (0,1)	-1 (0,5)	-1 (30,0)	-1 (XBridge)	10
4	1 (10,0)	1 (75,0)	-1 (35,0)	-1 (0,1)	-1 (0,5)	1 (60,0)	1 (XSelect)	12
5	-1 (5,0)	-1 (55,0)	1 (80,0)	-1 (0,1)	-1 (0,5)	-1 (30,0)	1 (XSelect)	8
6	1 (10,0)	-1 (55,0)	1 (80,0)	-1 (0,1)	-1 (0,5)	1 (60,0)	-1 (XBridge)	4
7	-1 (5,0)	1 (75,0)	1 (80,0)	-1 (0,1)	-1 (0,5)	1 (60,0)	-1 (XBridge)	5
8	1 (10,0)	1 (75,0)	1 (80,0)	-1 (0,1)	-1 (0,5)	-1 (30,0)	1 (XSelect)	6
9	-1 (5,0)	-1 (55,0)	-1 (35,0)	1 (1,0)	-1 (0,5)	-1 (30,0)	-1 (XBridge)	9
10	1 (10,0)	-1 (55,0)	-1 (35,0)	1 (1,0)	-1 (0,5)	1 (60,0)	1 (XSelect)	10
11	-1 (5,0)	1 (75,0)	-1 (35,0)	1 (1,0)	-1 (0,5)	1 (60,0)	1 (XSelect)	12
12	1 (10,0)	1 (75,0)	-1 (35,0)	1 (1,0)	-1 (0,5)	-1 (30,0)	-1 (XBridge)	12
13	-1 (5,0)	-1 (55,0)	1 (80,0)	1 (1,0)	-1 (0,5)	1 (60,0)	-1 (XBridge)	7
14	1 (10,0)	-1 (55,0)	1 (80,0)	1 (1,0)	-1 (0,5)	-1 (30,0)	1 (XSelect)	5
15	-1 (5,0)	1 (75,0)	1 (80,0)	1 (1,0)	-1 (0,5)	-1 (30,0)	1 (XSelect)	7
16	1 (10,0)	1 (75,0)	1 (80,0)	1 (1,0)	-1 (0,5)	1 (60,0)	-1(XBridge)	3
17	-1 (5,0)	-1 (55,0)	-1 (35,0)	-1 (0,1)	1 (1,0)	1 (60,0)	-1 (XBridge)	9
18	1 (10,0)	-1 (55,0)	-1 (35,0)	-1 (0,1)	1 (1,0)	-1 (30,0)	1 (XSelect)	10
19	-1 (5,0)	1 (75,0)	-1 (35,0)	-1 (0,1)	1 (1,0)	-1 (30,0)	1 (XSelect)	10
20	1 (10,0)	1 (75,0)	-1 (35,0)	-1 (0,1)	1 (1,0)	1 (60,0)	-1 (XBridge)	5
21	-1 (5,0)	-1 (55,0)	1 (80,0)	-1 (0,1)	1 (1,0)	-1 (30,0)	-1 (XBridge)	5
22	1 (10,0)	-1 (55,0)	1 (80,0)	-1 (0,1)	1 (1,0)	1 (60,0)	1 (XSelect)	6
23	-1 (5,0)	1 (75,0)	1 (80,0)	-1 (0,1)	1 (1,0)	1 (60,0)	1 (XSelect)	7
24	1 (10,0)	1 (75,0)	1 (80,0)	-1 (0,1)	1 (1,0)	-1 (30,0)	-1 (XBridge)	3
25	-1 (5,0)	-1 (55,0)	-1 (35,0)	1 (1,0)	1 (1,0)	-1 (30,0)	1 (XSelect)	13
26	1 (10,0)	-1 (55,0)	-1 (35,0)	1 (1,0)	1 (1,0)	1 (60,0)	-1 (XBridge)	6
27	-1 (5,0)	1 (75,0)	-1 (35,0)	1 (1,0)	1 (1,0)	1 (60,0)	-1 (XBridge)	9
28	1 (10,0)	1 (75,0)	-1 (35,0)	1 (1,0)	1 (1,0)	-1 (30,0)	1 (XSelect)	10
29	-1 (5,0)	-1 (55,0)	1 (80,0)	1 (1,0)	1 (1,0)	1 (60,0)	1 (XSelect)	7
30	1 (10,0)	-1 (55,0)	1 (80,0)	1 (1,0)	1 (1,0)	-1 (30,0)	-1 (XBridge)	3
31	-1 (5,0)	1 (75,0)	1 (80,0)	1 (1,0)	1 (1,0)	-1 (30,0)	-1 (XBridge)	5
32	1 (10,0)	1 (75,0)	1 (80,0)	1 (1,0)	1 (1,0)	1 (60,0)	1 (XSelect)	7

^aX1, % inicial de EtOH; X2, % final de EtOH; X3, temperatura (°C); X4, % de ácido acético na água; X5, vazão (mL min⁻¹); X6, tempo de análise (min), X7, fase estacionária.

^b Representação: Valores codificados (Valores reais).

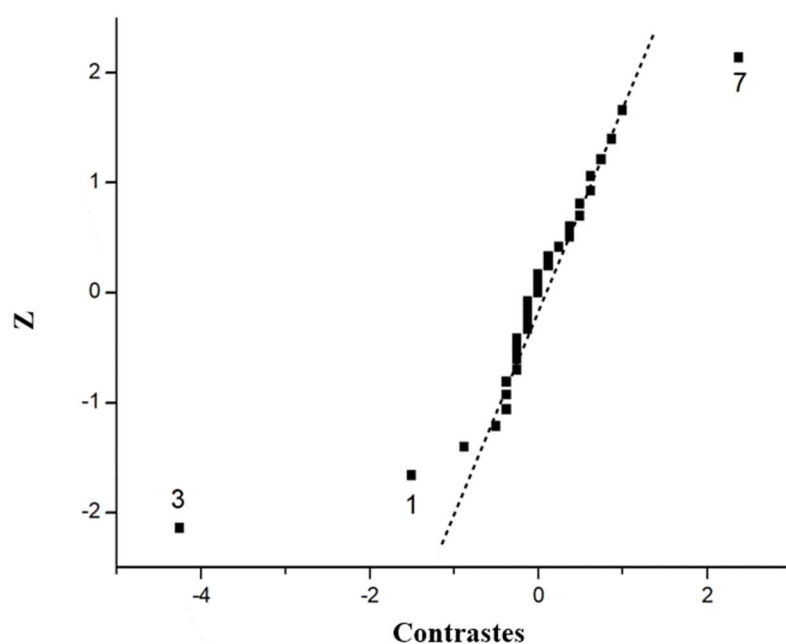
^c Número das bandas correspondentes.

^d Dados obtidos em 260 nm.

A interpretação gráfica dos efeitos foi realizada usando um gráfico de probabilidade normal. Efeitos não significativos tendem a cair em uma linha reta através de zero, enquanto efeitos significativos se desviam do mesmo (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; PEREIRA, 2015; DEJAEGER B; VANDER HEYDEN, 2011; VANDER HEYDEN et al., 2001).

De acordo com o gráfico de probabilidade normal (Figura 8), as variáveis mais importantes foram X1, X3 e X7 para o número de bandas cromatográficas (n). Por se tratar de uma variável qualitativa, para a variável X7 foi atribuído o valor do nível codificado +1 (XSelect), pois como é possível observar no gráfico da Figura 8, o valor do contraste da X7 abrange a região positiva do gráfico normal de probabilidade, indicando que as melhores respostas (número de bandas cromatográficas) foram alcançadas quando o nível foi positivo.

Figura 8 - Gráfico de probabilidade normal para contrastes relacionados a resposta do número de bandas (n)



Adaptado de: Borges et al., 2020

Como as variáveis X2, X4, X5 e X6 (Tabela 3) não apresentaram influência significativa sobre a resposta (número de bandas, n), elas foram retiradas do planejamento fatorial fracionário original 2_{IV}^{7-2} , permitindo-nos simular um planejamento fatorial fracionário completo com oito repetições para cada execução realizada. As variáveis mais relevantes X1, X3 e X7 explicam cerca de 82% da variabilidade dos dados, levando a um modelo multivariado com $R^2 = 0,82$ (de acordo com cálculos ANOVA). Ainda, de acordo com a equação 1, a soma

dos respectivos contrastes de primeira ordem ao quadrado para essas três variáveis representa 82% de contribuição sobre a soma de todas as estimadas ao quadrado, o que também corrobora globalmente a relevância dessas variáveis e é coerente com a interpretação gráfica de um gráfico de probabilidade normal. Porém, mesmo com a possibilidade de estimar um modelo multivariado com esse tipo de triagem de experimentos ele apresenta um número reduzido de níveis e não permite medir com precisão uma eventual curvatura quadrática (segunda ordem) da superfície de resposta (MONTGOMERY, 2017; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; PEREIRA, 2015) portanto, é mais adequado empregar esse planejamento apenas como uma ferramenta preliminar para identificar variáveis significativas no sistema estudado e nas faixas experimentais estabelecidas (SOUZA et al., 2018).

Diante disso, optou-se por realizar um planejamento fatorial fracionário sem pontos centrais (Tabelas 2 e 3) uma vez que o conjunto original de corridas apresenta uma variável qualitativa (X7). Uma vez que os níveis para variáveis qualitativas não são corretos atribuir valores intermediários e não há razão aceitável para classificar variáveis qualitativas em uma ordem numérica específica ou organizá-las em ordens de magnitude como pode ser feito para variáveis contínuas ou quantitativas (MONTGOMERY, 2017; LUNDSTEDT et al., 1998; TEOFILLO; FERREIRA, 2006). Os pontos centrais geralmente são realizados em planejamentos experimentais com variáveis quantitativas (MONTGOMERY, 2017).

Portanto, embora seja intuitivo incluir pontos centrais em todos os planejamentos experimentais (e esperar encontrar essas execuções em planejamentos experimentais gerais na literatura, uma vez que sua aplicação é usual), neste caso, não seria certo incluir um terceiro nível como ponto central para X7 independentemente das condições de operação. Considerando o caráter qualitativo da variável X7 e, portanto, dos pontos acima mencionados, não seria uma estratégia razoável mesmo que este nível intermediário pudesse teoricamente incluir uma coluna com as mesmas dimensões das empregadas nos experimentos fatoriais (XBridge e XSelect) ou outra coluna que não tem necessariamente as mesmas dimensões, mas tem as mesmas condições cromatográficas ou compatíveis com as outras (após conversões apropriadas) empregadas nos níveis mínimo e máximo estudados no planejamento fatorial fracionário.

É verdade que em casos específicos os pontos centrais podem ser incluídos no desenho experimental com fatores qualitativos, desde que esse seja composto principalmente por variáveis quantitativas ou contínuas e, por último, por variáveis categóricas (MONTGOMERY, 2017). Se o pesquisador optar por incluir essas réplicas naquele tipo de desenho, a maneira razoável de executar esta abordagem é realizar pontos centrais executando o fator quantitativo

ou contínuo nos níveis intermediários (nível zero), mas os qualitativos (em menor quantidade no planejamento de experimentos) que variam em uma escala discreta devem executar no nível alto (+) ou (-) baixo; não existe um nível intermediário para o qualitativo (MONTGOMERY, 2017). Portanto, se hipoteticamente tivéssemos optado por adotar essa estratégia neste projeto fatorial fracionário realizado 2_{IV}^{7-2} , podemos supor que poderia exigir dois grupos de réplicas: no primeiro, as seis variáveis quantitativas deveriam ser executadas em nível zero, mas o nível experimental da coluna nível deveria ser estabelecido no nível baixo, e no segundo, um grupo adicional de experimentos em triplicata devem ser realizados igualmente, mas com a coluna fixada no nível alto. No entanto, é importante destacar que esta decisão é apenas uma estratégia possível, não uma regra (MONTGOMERY, 2017). Embora possa ser usual, não é obrigatório incluir pontos centrais em alguns projetos de triagem (por exemplo, experimentos fatoriais fracionários), mas apenas alternativa comum (MONTGOMERY, 2017; DEJAEGHER; VANDER, 2011). Na verdade, há muitos exemplos de planejamentos experimentais úteis sem replicações no ponto central na literatura cuja aplicação é adequada (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; PEREIRA, 2015; MONTGOMERY, 2017; BOX, HUNTER, HUNTER, 1978). É importante ressaltar que a inclusão usual de pontos centrais não tem validade para fins de regressão e ocorre apenas para avaliar a reprodutibilidade e/ou estimar os erros quanto aos efeitos/contrastes estimados. No entanto, realizar pontos centrais não é a única forma de obter essas estimativas. Uma abordagem mais econômica para avaliar os erros é estimá-los a partir de efeitos ou contrastes desprezíveis (por exemplo, aqueles com influência muito baixa sobre a resposta que se ajustam no gráfico de probabilidade normal em uma linha até zero) (PEREIRA, 2015; DEJAEGHER; VANDER, 2011).

Alguns autores (DEJAEGHER; VANDER, 2011) consideram esta abordagem ainda mais apropriada do que o emprego de experimentos replicados para estimar os erros padrão em projetos de triagem. Além disso, essa abordagem evita um possível grande número de execuções apenas para estimativa de erro. Em oposição, ao assumir que efeitos ou contrastes desprezíveis estão relacionados ao erro e/ou desvios, este cálculo pode ser realizado com uma abordagem mais econômica, sem exigir execuções adicionais, levando a conclusões semelhantes e sendo mais coerentes com os objetivos sustentáveis neste trabalho.

4.1.3 Otimização da condição de eluição cromatográfica de *G. max*.

A próxima ação foi realizar um planejamento fatorial do tipo Doehlert para o extrato EHA de *G. max*, que tem como característica a possibilidade de testar as variáveis em diferentes números de níveis, no sentido de obter uma condição ótima (Tabela 5).

O planejamento Doehlert avalia as variáveis escolhidas em diferentes números de níveis, permitindo a estimativa de modelos matemáticos de segunda ordem (FERREIRA et al., 2004). Esta abordagem, juntamente com a metodologia de superfície de resposta (MSR), é fortemente útil para prever uma condição experimental ótima. A variável X3 (temperatura de análise) apresentou efeito um pouco maior que a variável X1 (% inicial de EtOH). Assim, X1 foi estudada em três níveis (na faixa de 5 a 10%), enquanto X3 foi estudada em cinco níveis (na faixa de 35 a 80 °C).

Os níveis das variáveis X2, X4, X5 e X6 foram fixados em EtOH 55%, ácido acético 0,5% (v/v) na fase aquosa, vazão de 1 mL min⁻¹ e 30 min de análise, respectivamente (Tabela 4)

Tabela 4 – Valores atribuídos às variáveis menos significativas do Planejamento Fatorial Fracionário

Variáveis	Valores
X2. % final de EtOH	55
X4. % de AcOH	0,5
X5. Vazão (mL min ⁻¹)	1
X6. Tempo de corrida (min)	30
X7. Fase Estacionária	XSelect
Injeção de volume µL	20

Embora as variáveis X4 e X5 não tenham apresentado os melhores níveis considerando a perspectiva da química verde, seus valores experimentais permitiram melhor resolução das bandas cromatográficas. Os resultados e cromatogramas do planejamento Doehlert são apresentados na Tabela 5 e Figura 9.

Tabela 5 - Variáveis e níveis investigados no design Doehlert

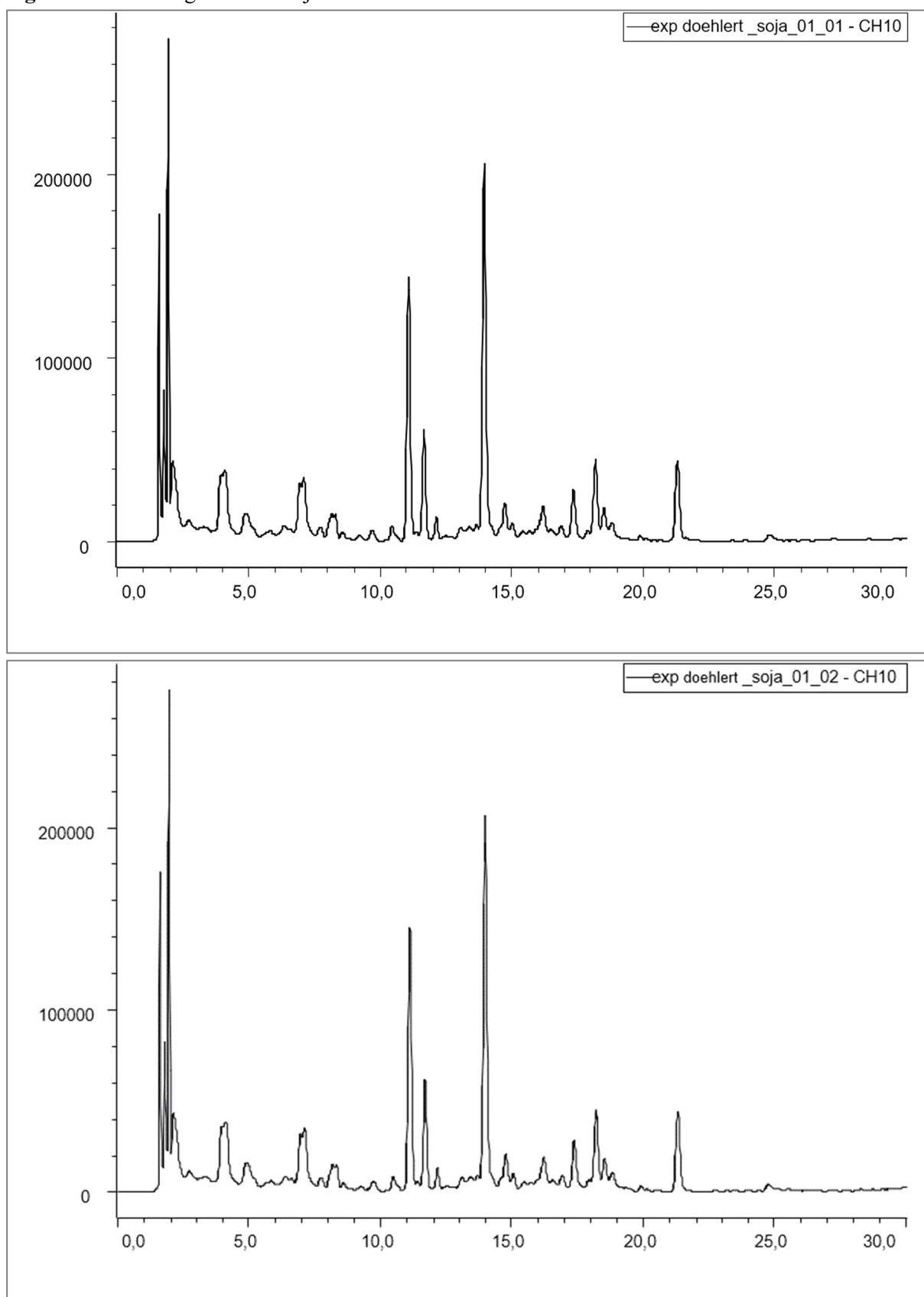
Experimentos	Variáveis ^a		Resultados	
	X3	X1	Número experimental de (n) ^b	Número previsto de (n) ^c
1	1 (80,0)	0 (7,5)	7	6,78
2	0,5 (68,75)	0,866 (10,0)	6	5,94
3	-1,0 (35,0)	0 (7,5)	12	11,44
4	-0,5 (46,25)	-0,866 (5,0)	10	10,28
5	0,5 (68,75)	-0,866 (5,0)	10	9,94
6	-0,5 (46,25)	0,866 (10,0)	10	10,28
CP1 ^d	0 (57,5)	0 (7,5)	9	9,11
CP2 ^d	0 (57,5)	0 (7,5)	9	9,11
CP3 ^d	0 (57,5)	0 (7,5)	9	9,11

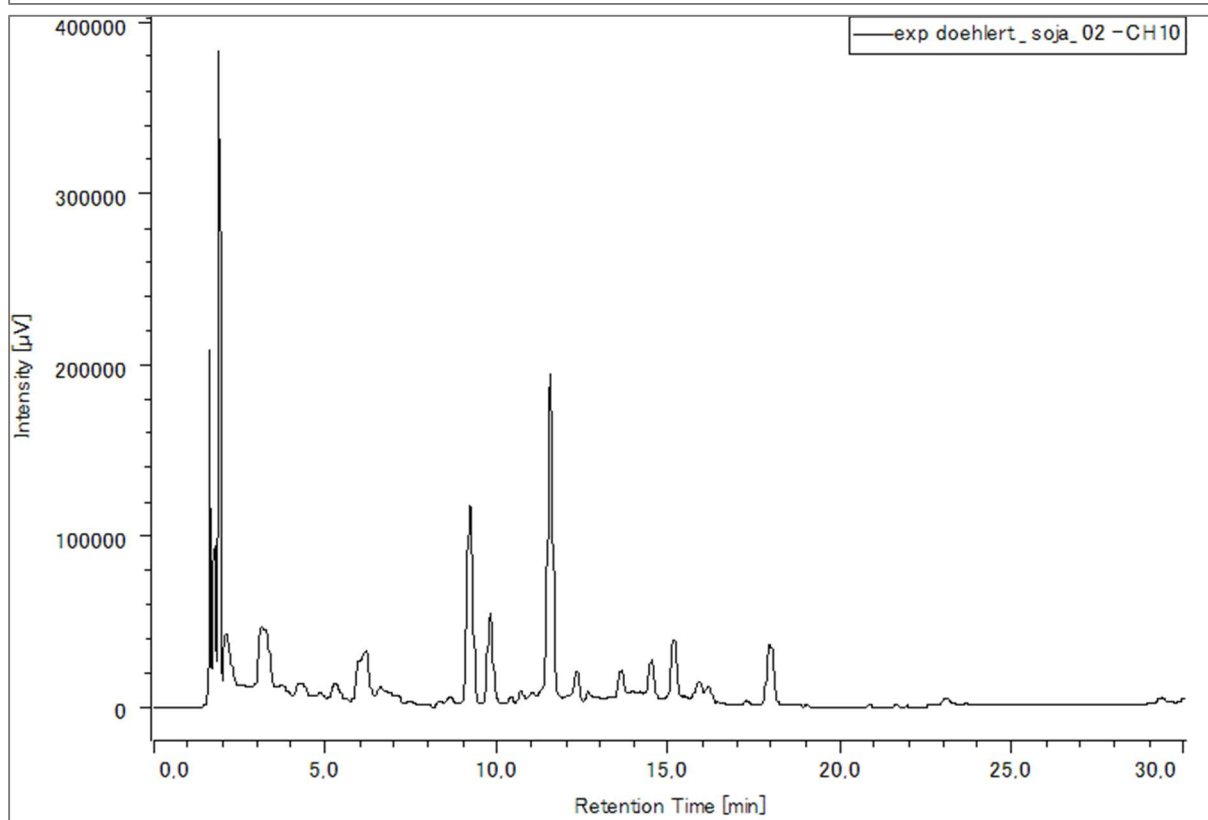
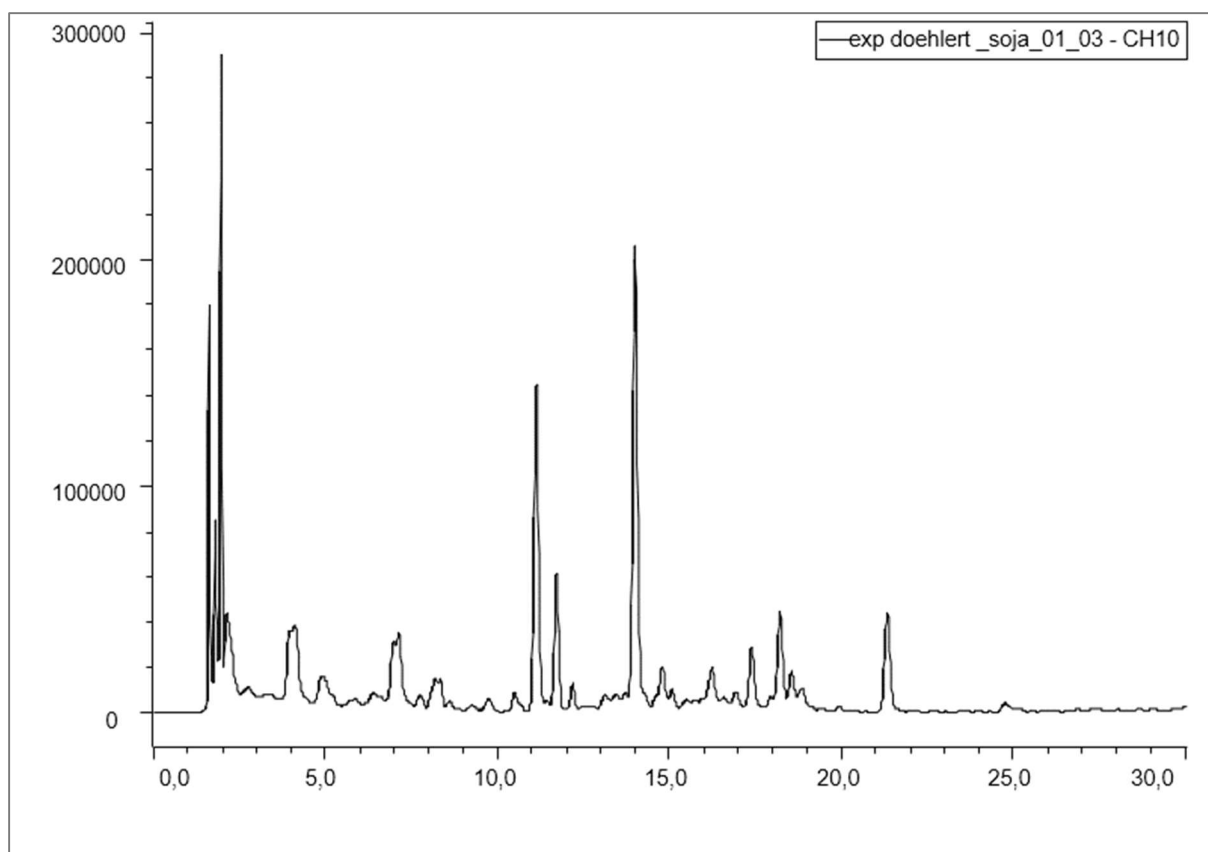
^aValores identificados (valores experimentais).

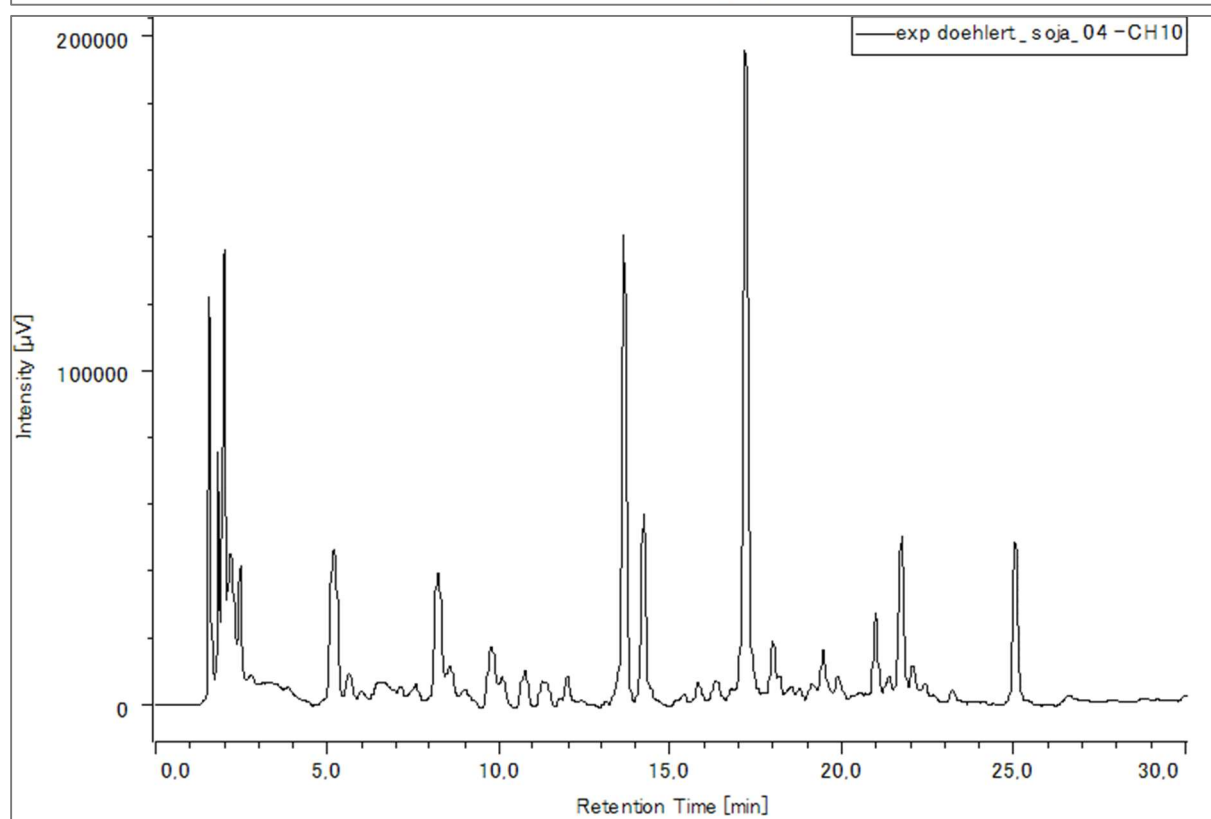
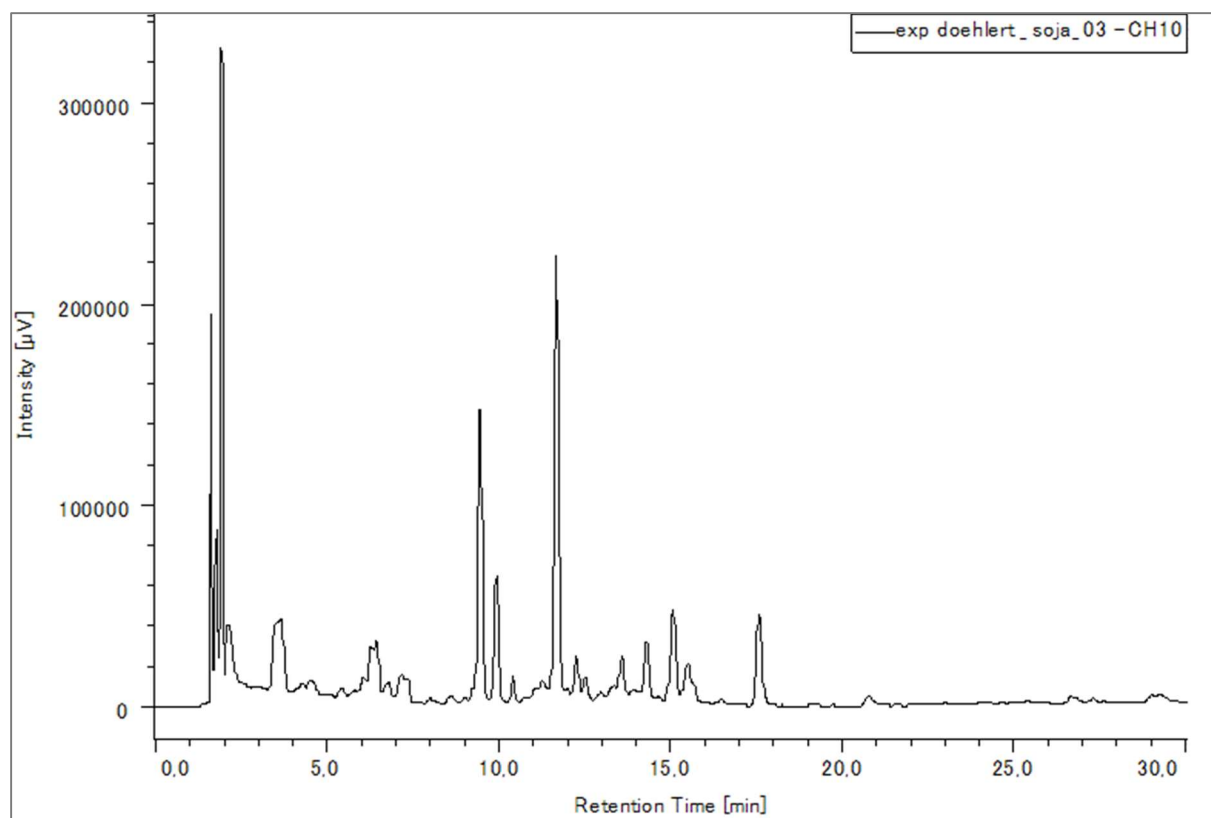
^bNúmero de bandas coletados em 260 nm.

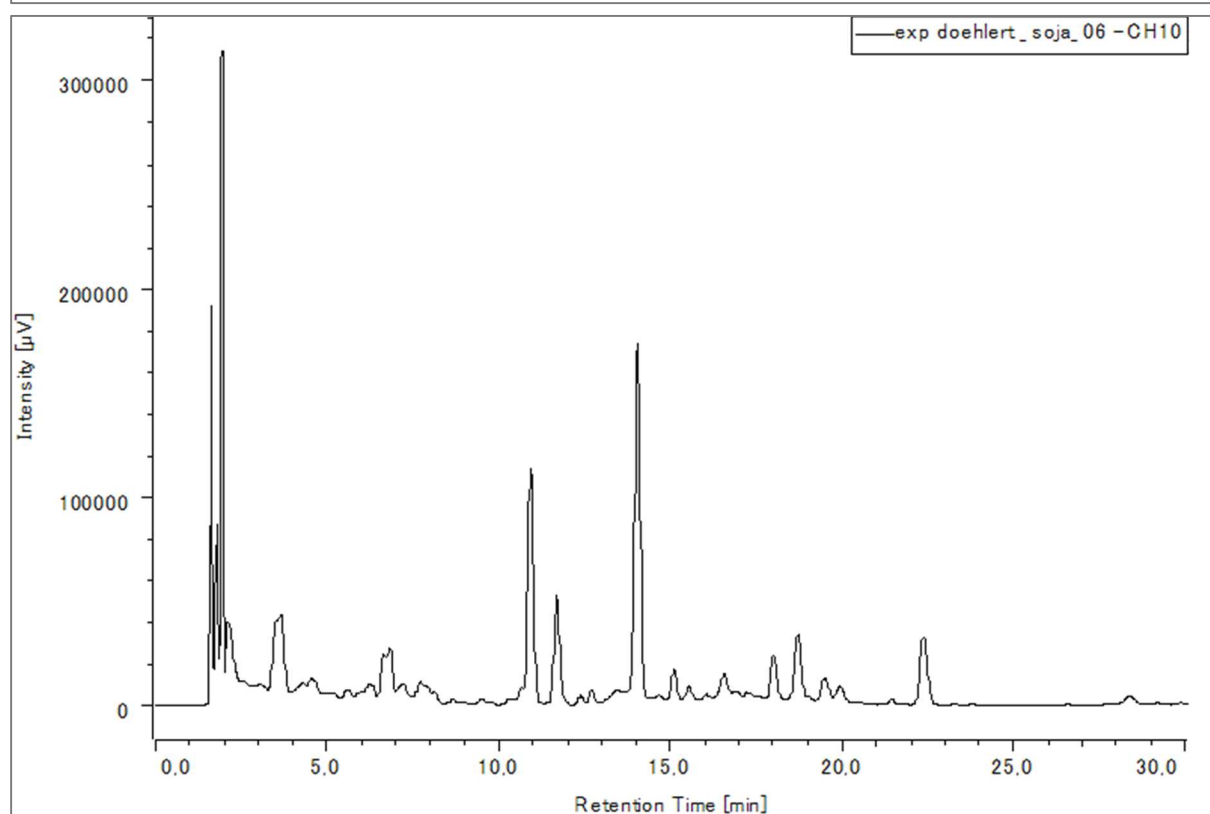
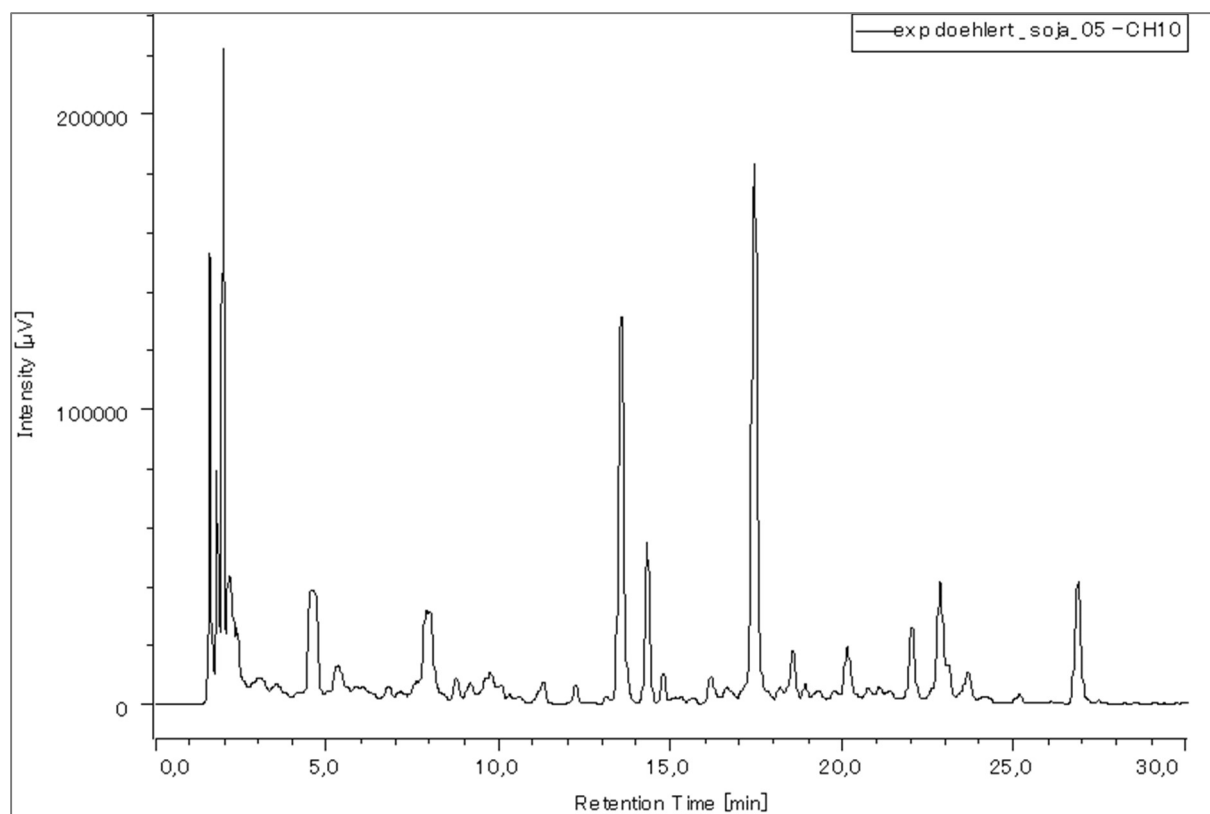
^cNúmero previsto de bandas cromatográficas (n) pelo modelo empírico (equação (7)).

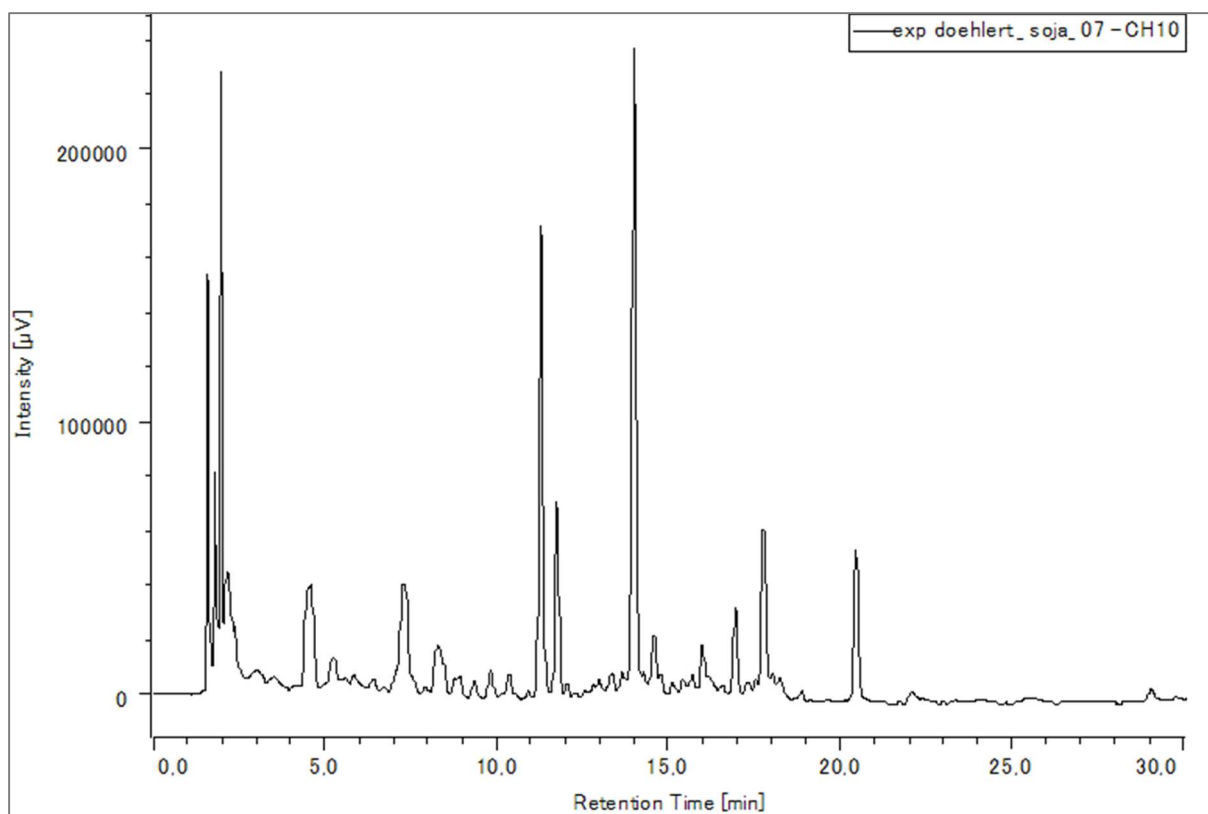
^dPonto central e número de réplica correspondente.

Figura 9 - Cromatogramas Planejamento Doehlert *G. max*









De acordo com a análise de variância (ANOVA) mostrada na Tabela 6, o modelo calculado não apresenta falta de ajuste, indicando que o modelo quadrático representa os dados experimentais com nível de confiança de 95%. O modelo de regressão multivariada apresentou um alto valor para o coeficiente de determinação, com R^2 de 0,978. Quatro coeficientes foram significativos no nível de confiança de 95%. O modelo gerado é dado na equação (7).

Os efeitos lineares das variáveis temperatura (X3) e % inicial de EtOH (X1) foram significativos para a resposta (n). Os coeficientes quadráticos b33 e b11 não foram significativos a um nível de confiança de 95% para o número de bandas cromatográficas (n). Assim, o modelo foi recalculado sem esses coeficientes. A tabela ANOVA para o modelo recalculado é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo recalculado representando o número de bandas cromatográficas (n) em função da Temperatura (X3) e % Inicial de etanol (X1).

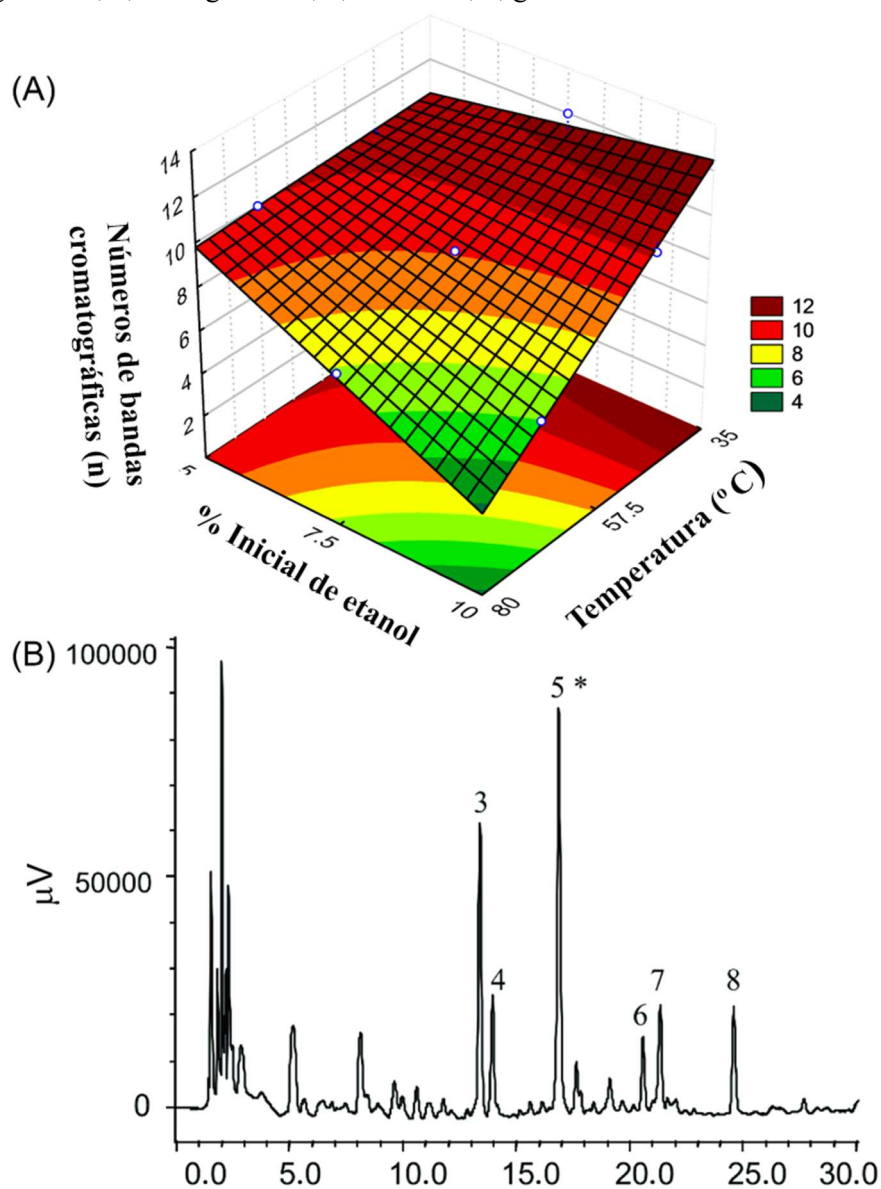
Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média Quadrática	valor F	valor P ^c
X3 (L) ^a	16,33	1	16,33	147,00	6.70E-05
X1 (L) ^a	4,00	1	4,00	36,00	1.85E-03
X1 by X3 ^b	4,00	1	4,00	36,00	1.85E-03
Resíduo	0,56	5	0,11		
Soma Total dos Quadrados	24,89	8			

^a Coeficiente linear^b Coeficiente de interação^c Os valores de p destacados em negrito são estatisticamente significativos a um nível de confiança de 95% (p < 0,05).

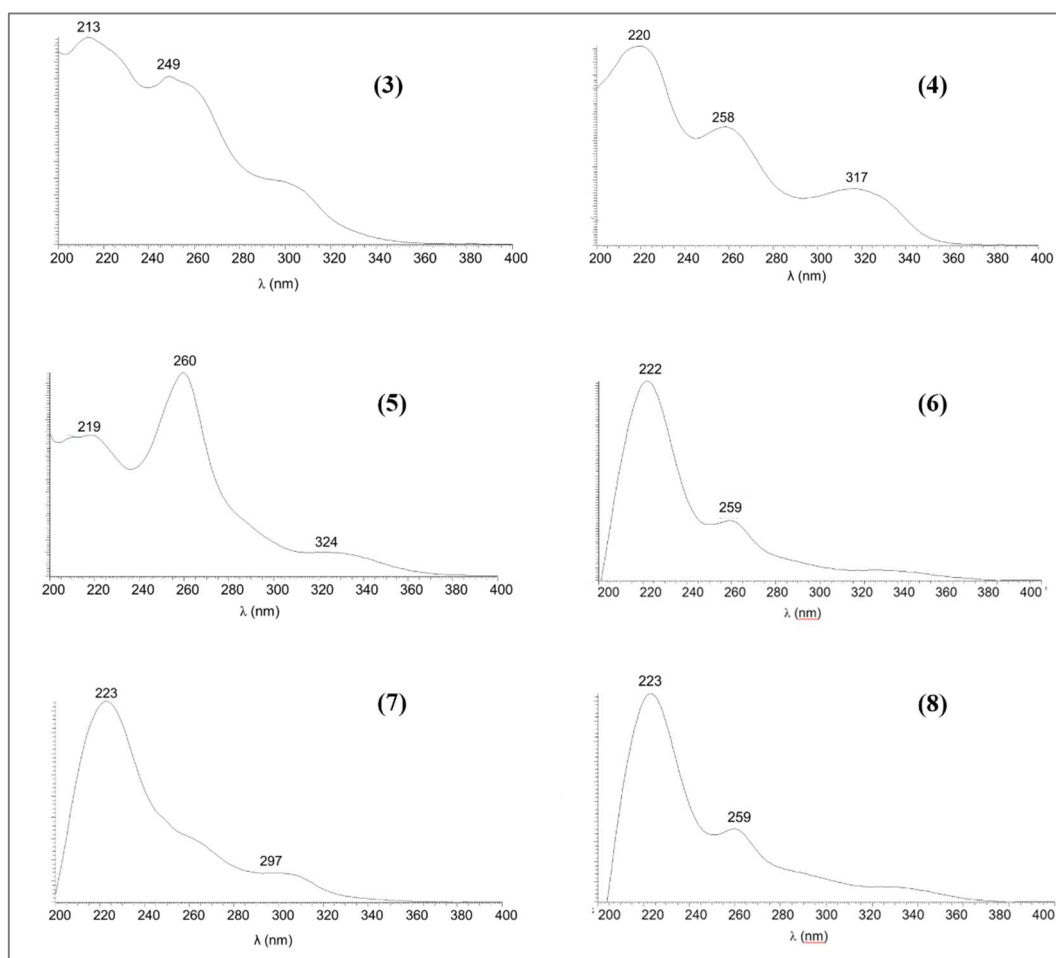
$$n = 9,111_{(\pm 0,286)} - 1,155_{(\pm 0,286)}X_1 - 2,333_{(\pm 0,495)}X_3 - 2,309_{(\pm 0,989)}X_{13} \quad (7)$$

Os resultados obtidos mostraram que o modelo foi estatisticamente significativo no domínio experimental estudado considerando os testes F. Apenas os coeficientes b0 (interceptor), b3, b1 (ambos lineares) e b13 (interação) foram significativos. A Ferramenta Solver, disponível no LibreOffice Calc, foi utilizada para estabelecer níveis máximos e mínimos para cada uma das variáveis. A partir do modelo estimado, uma superfície de resposta foi plotada em função da porcentagem inicial de B (X1) e da temperatura da corrida cromatográfica (X3) para o número de bandas cromatográficas (n, equação 7), apresentada na Figura 10 (A), que indicou que a condição ideal para as duas variáveis foram, respectivamente, 0,866 e -1 (valores codificados), para obter a condição experimental ótima, com um percentual inicial de etanol (X1) e temperatura de análise (X3) de 10% e 35 °C, respectivamente.

Figura 10 – (A) Gráfico de superfície de resposta para o número de bandas cromatográficas (n) de resposta no projeto Doehlert e (B) Fingerprint de *Glycine max*. Condições cromatográficas: C18 XSelect (150 x 4.6 mm d.i.; 5 μ m), com pré-coluna (4 x 3 mm, 5 μ m), HPLC (Jasco®), Fase móvel: H₂O + 0,5% de ácido acético (A) e EtOH (B) no seguinte gradiente: 5-55% de B em 30 min. Vazão: 1 mL min⁻¹. Temperatura de análise: 35 °C; volume de injeção: 20 μ L, λ = 260 nm. bandas: 3, daidzina; 4, glicetina; 5, genistina; 6, acetilgenistina; 7, daidzeína; 8, genisteína

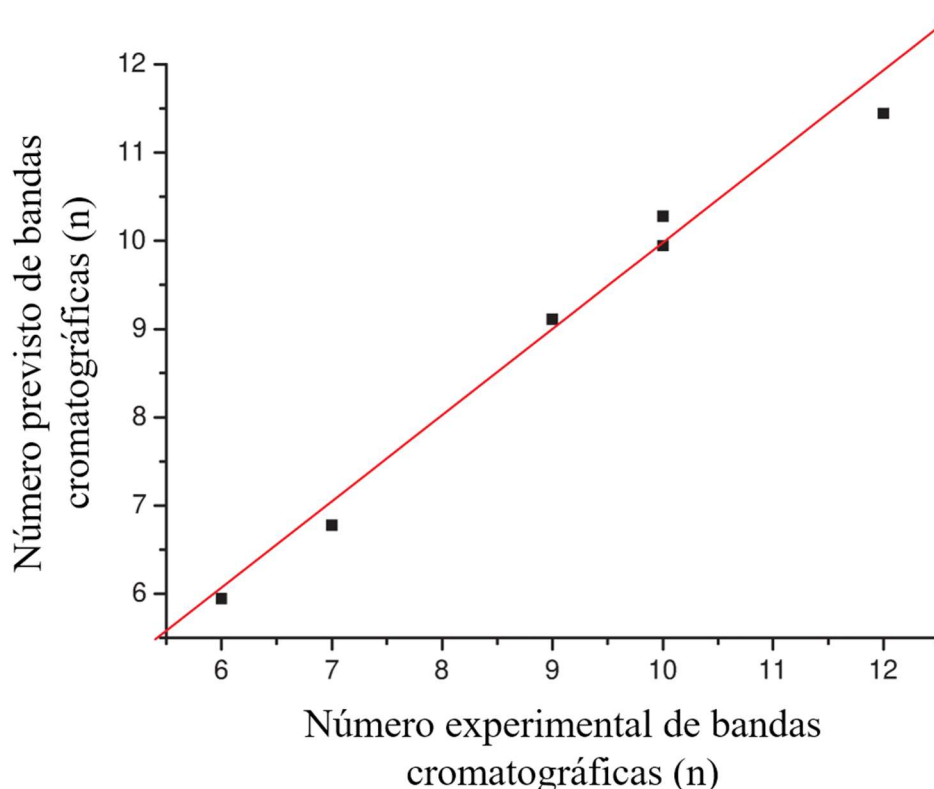


Adaptado de: Borges et al., 2020

Figura 11. Espectros na região do UV para os picos de 3-8 referentes as isoflavonas da soja.

Testamos em triplicata a condição prevista otimizada de 10% (valor codificado de 0,866) para X1 e 35 °C (valor codificado de -1) para X3 e obtivemos $n = 13,00 \pm 0,00$ (média $\pm$ desvio padrão; todas as réplicas apresentaram o mesmo número de bandas).

Este valor está muito próximo do previsto (12,44), o que além do alto valor de R^2 , mostra a alta qualidade do modelo estimado. Portanto, traçamos um gráfico (Figura 12) que mostra uma comparação do número de bandas cromatográficas previsto vs. experimental. A Figura 12 mostra uma boa concordância entre os resultados previstos e experimental, com alto valor para coeficiente de determinação ($R^2 = 0,989$). Isso sugere que os dados se ajustam muito bem ao modelo empírico (equação 2). O número experimental e previsto de bandas cromatográficas para cada execução no planejamento Doehlert são mostrados na Tabela 5. A igualdade de alguns pontos experimentais causou sua sobreposição na Figura 12 (ver Tabela 5).

Figura 12 - Gráfico de número de bandas cromatográficas (n) previsto vs. experimental

Adaptado de: Borges et al.,2020

Porém, estritamente do ponto de vista cromatográfico, percebemos que um valor experimental menor para X1 poderia melhorar a resolução das bandas cromatográficas (n), principalmente os primeiros com tempo de retenção entre 0 e 5 min, sem prejuízo para a otimização. Assim, a condição ótima foi estabelecida em 5% de B e 35 °C para X1 e X3, respectivamente. Essa condição foi testada em triplicata e também levou ao número de bandas cromatográficas (n) igual a $13,00 \pm 0,00$. Este valor é superior aos originais obtidos no projeto Doehlert, o que indica uma otimização bem-sucedida.

Testamos o bioetanol de grau alimentar 95 GL mais ecológico, derivado de biomassa e mais barato com porcentagens corrigidas em relação à condição ideal (considerando pureza mais baixa em comparação com grau de etanol para HPLC), como descrito na seção 3.3.4. Como solvente orgânico no sistema de fase móvel, foi um substituto adequado. Um cromatograma representativo para a condição cromatográfica otimizada é mostrado na Figura 10 (B). Pela comparação dos tempos de retenção e espectros de UV com os dados da literatura, o método desenvolvido permitiu inicialmente a identificação de seis isoflavonas de soja, Tabela 7.

4.2 Identificação dos compostos por LC-ESI-MS/MS

As informações obtidas no LC-ESI-MS/MS registradas para cada pico cromatográfico identificaram os oito compostos nas amostras de soja analisadas pelo método cromatográfico verde desenvolvido. A análise em modo negativo de íons moleculares e o padrão de fragmentação da literatura revelaram a presença de isoflavonas e ácidos orgânicos. A análise espectral de massa MS/MS dos íons precursores sugere a presença adicional de dois ácidos orgânicos (Tabela 7): (1) ácido glucônico (m/z 195) e (2) ácido quínico (m/z 191); além de seis isoflavonas: (3) daidzina (m/z 415), (4) glicitina (m/z 445), (5) genistina (m/z 431), (6) acetilgenistina (m/z 473), (7) daidzeína (m/z 253) e (8) genisteína (m/z 269).

Tabela 7 - Compostos presentes no EHA das sementes de soja propostos por LC-MS e os correspondentes dados de UV e MS/MS

Bandas	t_R (min)	UV (nm)	$[M-H]^-$	MS^2	Compostos	Referências
1	1.99	215	195	177, 159, 129	Ácido glucônico	(GARCIA-VILLALBA, 2008)
2	5.12	218	191	173, 111	Ácido quínico	(SANTOS et al., 2006)
3	13.35	213, 249, 300	415	253	Daidzina	(LEE et al, 2018; GARCIA-VILLALBA, 2008; LEE et al., 2008)
4	13.89	220, 258, 317	445	283	Glycitina	(LEE et al, 2018; SANTOS et al., 2006; BARNES, KIRK, COWARD. 1994)
5	16.81	219, 260, 324	431	269	Genistina	LEE et al, 2018; GARCIA-VILLALBA, 2008; LEE et al., 2008)
6	20.52	222, 259	473	269	Acetilgenistinaa	LEE et al, 2018
7	21.28	223, 259, 297	253	253	Daidzeina	LEE et al, 2018; SANTOS et al., 2006; LEE at al., 2008)
8	24.52	223, 259	269	269	Genisteina	LEE et al, 2018; GARCIA-VILLALBA, 2008; LEE at al., 2008

Esses espectros são fornecidos no apêndice (Figuras S1-S8). No entanto, o fingerprint cromatográfico por HPLC-PDA (Figura 10 B) mostra apenas seis bandas (identificados como isoflavonas; banda 3-8) e na Figura 11 é possível verificar os espectros de UV para essas bandas identificadas. Os dois ácidos identificados por LC-ESI-MS/MS não absorvem em 260 nm, o comprimento de onda monitorado.

4.3 Desempenho do método desenvolvido: comparação com métodos de referência

4.3.1 Métrica HPLC-EAT

Monitoramos o desempenho do método desenvolvido sob uma perspectiva analítica e ambiental e estabelecemos comparações quanto ao seu desempenho em relação a dois outros métodos previamente publicados na literatura para análise de isoflavonas em soja: o primeiro é o método de Kao e Chen, 2002 (considerando a eluição do método descrito na seção de discussão do artigo original), e o segundo é o método de Kim et al. 2014. Escolhemos esses dois métodos como obras de referência pois avaliamos que ambos apresentam melhor resolução cromatográfica dos principais compostos presentes na soja. Além disso, ambos empregam acetonitrila como modificador orgânico, um solvente orgânico amplamente utilizado para a fingerprint da soja.

Esta escolha parece ser ainda mais adequada no caso da seleção do trabalho de Kim et al. 2014, como método de referência, uma vez que emprega uma fase móvel cuja composição (acetonitrila e água, ambas acidificadas com 0,1% de ácido acético) aparece em vários trabalhos; (GRIFFITH; COLLISON, 2001; LEE et al., 2010; PYO, YOO, SURH, 2009) portanto, este método tem uma representatividade em relação a outros publicados e é adequado como obra de referência. Como parâmetro analítico para monitorar o desempenho do método e realizar comparações com os trabalhos de referência, optamos por empregar o número de bandas detectadas (n , a mesma resposta empregada para otimizar o método) por ser a resposta mais empregada em fingerprint cromatográfica visando fins qualitativos (ALAERTS et al., 2010; TISTAERT et al., 2011). Também analisamos e comparamos o tempo de execução dos três métodos e o número de bandas detectados por minuto de corrida cromatográfica (ou n/t) que cada um deles apresentou em seus respectivos cromatogramas.

Em relação aos aspectos ambientais, foi utilizada a ferramenta HPLC-EAT simples e de fácil acesso (equação 2), que foi utilizada para quantificar o impacto ambiental do método

desenvolvido e compará-lo aos métodos de referência. Também comparamos o volume gasto de modificador orgânico em cada método.

Considerando que o número de bandas detectadas é um parâmetro estritamente analítico e não considera o impacto ambiental, a métrica HPLC-EAT considera o desempenho ambiental de um determinado método de eluição, mas não é capaz de avaliar o desempenho cromatográfico, portanto, aplicamos um híbrido das métricas (equação 8) propostas por Funari et al., 2015 para monitorar simultaneamente o desempenho analítico e ambiental dos métodos:

$$n/EAT \text{ (8)}$$

em que n é o número de bandas cromatográficas detectadas de um determinado cromatograma e EAT é a pontuação HPLC-EAT de um determinado método.

A métrica foi proposta para realizar comparações globais, precisas entre fingerprint de métodos cromatográficos e classificá-los em uma perspectiva robusta, uma vez que leva em consideração simultaneamente parâmetros sustentáveis e cromatográficos. Além disso, é desejável obter um alto número de bandas detectadas para um determinado cromatograma e um baixo impacto ambiental (portanto, uma baixa pontuação HPLC-EAT), quanto maior o valor da razão n/EAT , maior o desempenho de um determinado método de um ponto de vista cromatográfico e sustentável.

Reproduzimos os dois trabalhos de referência em laboratório com o objetivo de comparar com precisão o desempenho geral dos métodos. As injeções foram realizadas em triplicata. O método mostrou fingerprint muito semelhante em relação aos métodos de referência. Os cromatogramas dos métodos de Kao e Chen (2002) e Kim et al. (2014) apresentaram bandas de $13,67 \pm 0,58$ e $13,00 \pm 0,00$ (média $\pm$ desvio padrão), respectivamente. Esses valores são próximos aos obtidos pelo método desenvolvido ($13,00 \pm 0,00$) ou mesmo idênticos. O método desenvolvido baseado em etanol, Kao e Chen (2002) e Kim et al. (2014) têm, respectivamente, 30, 27 e 60 min de tempo de execução. Em relação ao número de bandas detectados por minuto de corrida cromatográfica, os três métodos citados apresentaram $0,43 \pm 0,00$, $0,51 \pm 0,02$ e $0,22 \pm 0,00$ bandas por minuto, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8 - Comparação do desempenho do método proposto neste trabalho com dois métodos previamente relatados na literatura para a fingerprint de isoflavonas em soja por HPLC-PDA/UV.

Método/ referência	Parâmetros cromatográficos/ analíticos			Parâmetros ambientais		Desempenho <i>n</i> /EAT ^{a,d}
	<i>n</i> ^{a,b}	Tempo de análise (min)	<i>n</i> /t (bandas por minuto de corrida) ^a	Gasto de solvente orgânico (mL)	HPLC- EAT ^c	
Este trabalho	13.00 ± 0.00	30	0.43 ± 0.00	9.0	18.1	0.72 ± 0.00
Kao and Chen	13.67 ± 0.58	27 ^e	0.51 ± 0.02	11.1	39.7	0.34 ± 0.01
Kim et al.	13.00 ± 0.00	60 ^e	0.22 ± 0.00	16.0	57.2	0.23 ± 0.00

^a Resultados dados como média ± desvio padrão (*n* = 3).

^b Número de bandas

^c Ferramenta de avaliação ambiental. Quanto menor a pontuação, mais ecológico é o método. O cálculo não leva em consideração as colunas de equilíbrio.

^d Quanto maior o valor da razão *n*/EAT, maior o desempenho heurístico do método, considerando simultaneamente parâmetros analíticos e ambientais.

^e Tempo total de execução dos métodos cromatográficos conforme originalmente relatado nos respectivos trabalhos de referência.

Embora esta avaliação preliminar dos aspectos analíticos possa nos levar a concluir que os métodos de Kao e Chen (2002), para os parâmetros considerados, apresentam um desempenho cromatográfico igual ou até superior que os outros dois métodos, não faz sentido do ponto de vista ambiental: O método desenvolvido, e os métodos de Kao e Chen (2002) e Kim et al. (2014) apresentaram escores HPLC-EAT de 18,1, 39,7 e 57,2, respectivamente, mostrando que o método em análise é o mais verde entre os três. Isso se deve aos menores escores dos parâmetros de segurança (S), saúde (H) e ambientais (E), devido a utilização do EtOH em relação à acetonitrila, e ao menor gasto de modificador orgânico neste gradiente em comparação aos outros métodos: o método desenvolvido neste trabalho emprega 9,0 mL de EtOH, enquanto os métodos de Kao e Chen (2002) e Kim et al. (2014) empregam 11,1 mL e 16,0 mL de acetonitrila, respectivamente.

A superioridade estatística de desempenho do método desenvolvido (teste de Tukey com 95% de confiança) fica evidente quando levamos em consideração o valor da relação n/EAT . O método apresentou valor de $0,72 \pm 0,00$ para a relação n/EAT , enquanto Kao e Chen (2002) e Kim et al. (2014) apresentaram valores de $0,34 \pm 0,01$ e $0,23 \pm 0,00$, respectivamente. Isso mostra o melhor desempenho do método desenvolvido, mesmo empregando o etanol mais viscoso como modificador orgânico, e indica que os parâmetros ambientais e de separação devem ser igualmente considerados no desenvolvimento do fingerprint cromatográfico. Os resultados da comparação envolvendo os métodos citados estão resumidos na Tabela 8.

A temperatura nos permitiu substituir a acetonitrila, o solvente orgânico empregado em trabalhos de referência, pelo EtOH mais verde. A estratégia adotada na otimização foi aumentar a temperatura em relação ao trabalho de referência de Kao e Chen (2002) em pelo menos 10 °C (já que o método de referência emprega uma temperatura de 25 °C, enquanto o método planejado emprega temperaturas na faixa de 35–80 °C) para reduzir a viscosidade das misturas EtOH/H₂O a um valor aceitável e melhorar a seletividade da fase móvel.

No entanto, notamos que temperaturas superiores a 35 °C, neste sistema, levaram a uma maior solvatação dos analitos da amostra pela fase móvel e a uma diminuição no equilíbrio de substâncias entre as fases estacionária e móvel (ou seja, uma menor interação analito/coluna), causando coeluição das bandas cromatográficas (SOUZA et al., 2018). Esse fenômeno também diminui o número de bandas (n) da resposta, o que pode ser comprovado pelos contrastes negativos e ponto ótimo em relação à temperatura (variável X3) no gráfico de probabilidade normal e no modelo estimado, respectivamente. Assim, conforme previsto pelo modelo empírico (equação 7) e pelos resultados analíticos, a temperatura ótima foi de 35 °C.

Este valor de temperatura é superior ao trabalho de referência de Kao e Chen (2002) e simultaneamente próximo à temperatura ambiente em nossa região. Isso leva a uma viscosidade e seletividade aceitáveis, evitando a coeluição de bandas e, acima de tudo, permite que a acetonitrila seja substituída como componente da fase móvel, levando simultaneamente a um número maior de bandas cromatográficas (n) em comparação com outras temperaturas.

Sabe-se que a acetonitrila apresenta muitas vantagens quando utilizado como modificador orgânico para HPLC-PDA é o mais comumente empregado na literatura. Dentre essas vantagens, podem ser citadas a miscibilidade em água, baixa viscosidade das soluções com água, baixa temperatura de ebulição, capacidade de solvatar muitos analitos (WELCH et al., 2010; FUNARI et al., 2014; HUTCHINSON et al., 2012). No entanto, este solvente é rapidamente absorvido quando em contato com a pele, pulmões e sistema digestivo, espalhando-se rapidamente por todo o corpo, podendo causar graves efeitos deletérios em caso

de intoxicação por sua degradação em cianeto, forte inibidor da cadeia de transporte de elétrons (CASSINI, ANTUNES, KELLER, 2013; HASHIMOTO, MORIMOTO, DOBSON, 1993).

No que diz respeito ao metanol, também um solvente amplamente utilizado em cromatografia líquida, pode ser utilizado como alternativa à acetonitrila tóxica por apresentar também propriedades cromatográficas favoráveis, como viscosidade relativamente baixa e comprimento de onda mínimo no ultravioleta de 205 nm. No entanto, o metanol pode ser metabolizado a ácido fórmico ou formaldeído, de forma cumulativa, sendo tóxicos em humanos após ser prontamente absorvido por exposição cutânea ou inalação de vapor (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010; PUBLIC HEALTH ENGLAND (PHE), 2015; CAPELLO, FISCHER, HUNGERBÜHLER, 2007).

Consequentemente os métodos derivados da acetonitrila, precisam de tratamento adequado dos resíduos químicos gerados, o que pode ser caro, além de aumentar a carga de descarte de resíduos ambientais (FUNARI et al., 2015; SANDRA et al., 2010; HUTCHINSON et al., 2012; WELCH et al., 2012; ARMENTA, GARRIGUES, DE LA GUARDIA, 2008). Considerando que resíduos químicos perigosos podem ser deletérios para a manutenção de produtos naturais e contribuem com potenciais danos ao meio ambiente, o emprego de acetonitrila e metanol em impressões digitais cromatográficas de plantas é anacrônico e contraditório (FUNARI et al., 2014).

No entanto, o EtOH tem uma toxicidade relativamente baixa e é biodegradável; assim, é considerada uma alternativa mais ecológica ao HPLC de acordo com os parâmetros ambientais, apresentando concordância com os princípios da química verde (ANASTAS, WARNER, 2008) e do GAC (GAŁUSZKA, MIGASZEWSKI, NAMIESNIK, 2013). Esses argumentos nos ajudam a mostrar que o método desenvolvido neste trabalho pode ser ainda mais vantajoso considerando que todo o efluente gerado a partir de seu emprego é biodegradável (etanol, ácido acético e a própria soja), não exigindo tratamento específico do resíduo químico, além de ser aplicável com bioetanol 95 GL (grau alimentício), que é de origem renovável e é mais barato que acetonitrila e metanol grau HPLC.

4.3.2 Avaliação do impacto ambiental: AGREE – Analytical GREENess

Os parâmetros de entrada no *software* da métrica AGREE para os três métodos analisados para soja estão representados nas Tabelas 9, 10 e 11, os pictogramas resultantes estão representados na Figura 13.

Tabela 9 - Parâmetros de entrada no software da métrica AGREE para cálculo do escore referente ao método cromatográfico verde desenvolvido neste trabalho para *G. max*.

Princípios	Procedimento	Pontuação
1. Tratamento da amostra	Análise off-line	0,48
2. Quantidade de amostra	0,02 mL	1,00
3. Posicionamento do dispositivo	Desligada	0,00
4. Estágios de preparação da amostra	3 ou menos	1,00
5. Automação, miniaturização	Semi-automático/ não miniaturizado	0,25
6. Derivatização	-	1,00
7. Resíduos	10,5	0,38
8. Taxa de transferência de análise	13/2	0,74
9. Consumo de energia	Cromatografia Líquida	0,50
10. Fonte de reagentes	Todos os reagentes são de base biológica	1,00
11. Toxicidade	Não	1,00
12. Segurança do operador	Altamente inflamável	0,80

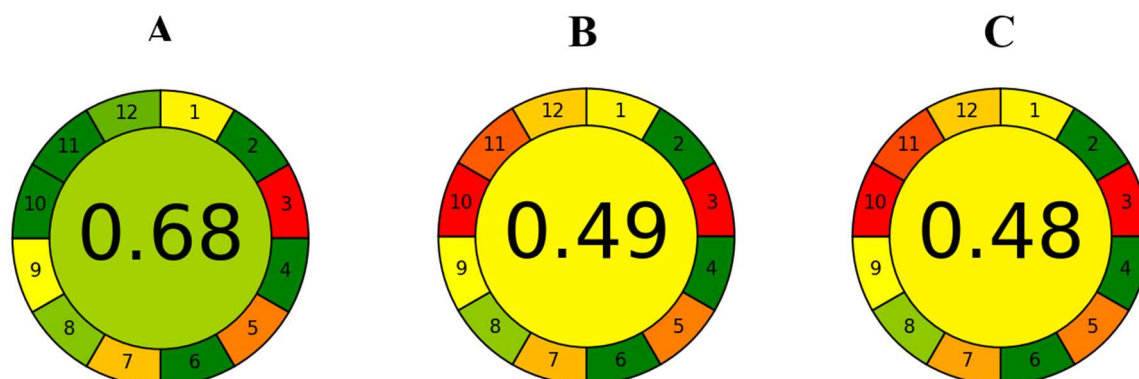
Tabela 10 - Parâmetros de entrada no software da métrica AGREE para cálculo do escore referente ao método de Kao e Chen (2002).

Princípios	Procedimento	Pontuação
1. Tratamento da amostra	Análise off-line	0,48
2. Quantidade de amostra	0,02 mL	1,00
3. Posicionamento do dispositivo	Desligada	0,00
4. Estágios de preparação da amostra	3 ou menos	1,00
5. Automação, miniaturização	Semi-automático/ não miniaturizado	0,25
6. Derivatização	-	1,00
7. Resíduos	11,1	0,36
8. Taxa de transferência de análise	13,67/2	0,72
9. Consumo de energia	Cromatografia Líquida	0,50
10. Fonte de reagentes	Nenhum dos reagentes é de origem biológica	1,00
11. Toxicidade	Sim/11,1	0,18
12. Segurança do operador	Altamente inflamável/tóxico para a vida aquática/bioacumulativo	0,40

Tabela 11 - Parâmetros de entrada no software da métrica AGREE para cálculo do score referente ao método cromatográfico desenvolvido, método de Kim et al. (2014).

Princípios	Procedimento	Pontuação
1. Tratamento da amostra	Análise off-line	0,48
2. Quantidade de amostra	0,02 mL	1,00
3. Posicionamento do dispositivo	Desligada	0,00
4. Estágios de preparação da amostra	3 ou menos	1,00
5. Automação, miniaturização	Semi-automático/não miniaturizado	0,25
6. Derivatização	-	1,00
7. Resíduos	16	0,32
8. Taxa de transferência de análise	13/2	0,72
9. Consumo de energia	Cromatografia Líquida	0,50
10. Fonte de reagentes	Nenhum dos reagentes é de origem biológica	0,00
11. Toxicidade	Sim/16	0,14
12. Segurança do operador	Altamente inflamável/tóxico para a vida aquática/bioacumulativo	0,40

Figura 13.- Pictogramas contendo os escores apresentados na métrica AGREE para (A) o método com bioetanol desenvolvido no presente trabalho e (B) o método de Kao e Chen (2002) e (C) Kim et al. (2014)



A pontuação geral é mostrada no meio do pictograma com valores próximos a 1 no qual a cor verde escura indica que o método avaliado é mais verde. O desempenho do procedimento em cada um dos critérios de avaliação foi refletido pela cor no segmento com o número correspondente ao critério.

Comparando os escores dos três métodos, 0,68 (método otimizado), 0,49 (método de Kao e Chen, 2002) e 0,48 (método de Kim et al., 2014), a diferença no desempenho do método otimizado em relação aos outros dois métodos é notável, principalmente devido à toxicidade dos solventes utilizados. O uso de etanol como solvente orgânico na análise por HPLC leva em consideração os princípios 10, 11 e 12 do GAC devido ao uso de solventes renováveis, redução de resíduos tóxicos e aumento da segurança do operador. Outros critérios adicionais importantes foram o uso de quantidade mínima de material vegetal, a miniaturização das análises e a abordagem multivariada, relacionados aos princípios do GAC 2, 5 e 8 respectivamente.

Com relação ao princípio 1 da química analítica verde relacionado ao tratamento de amostra os três métodos receberam escores baixos pois realizam algum tipo de tratamento de amostra antes da análise final. Evitar etapas e tratamento de amostras devem ser preferidos com o intuito de reduzir drasticamente os problemas ambientais, de saúde e segurança associados à metodologia (PENA-PEREIRA, WOJNOWSKI, TOBISZEWSKI, 2020). Porém a análise direta nem sempre é possível devido à complexidade da matriz vegetal resultando em baixa resolução cromatográfica. Portanto, a preparação dos extratos incluindo etapas de pré-tratamento da amostra são de extrema importância nesses casos, pois permitem eliminar possíveis interferentes relacionados a substâncias de alta polaridade, como açúcares livres que estão presentes na matriz vegetal bruta (RODRIGUES et al., 2008). Além disso, essas substâncias podem interferir na eficiência e resolução da separação cromatográfica, assim como na resposta dos analitos de interesse.

Com relação aos princípios 3, 5 e 7 relacionados ao posicionamento do dispositivo offline da instrumentação, automação, miniaturização e resíduo. Métodos miniaturizados requerem menos reagentes, solventes e energia e a automação de procedimentos analíticos resultam em menor exposição ocupacional, especialmente para vapores de solventes, e o risco de acidentes se reduz. Nesses quesitos os três métodos tiveram penalidades. Uma vez que utilizaram de posicionamento offline da instrumentação, a metodologia foi semiautomática e o preparo de amostra não foi miniaturizado. Portanto tiveram escores baixos.

Entretanto a metodologia desenvolvida para soja nesse trabalho se demonstrou mais verde pois utilizou solvente de menor toxicidade se comparado os dois outros métodos que

fizeram uso de metanol (método Kao e Chen, 2002) e acetonitrila (método Kim et al., 2014). O método desenvolvido neste trabalho respeitou os princípios 10, 11 e 12 da Química Analítica Verde. Portanto, as comparações realizadas pela métrica AGREE corroboram com os resultados obtidos pela métrica HPLC-EAT.

4.4 Validação do método otimizado

4.4.1 Repetibilidade

O parâmetro de repetibilidade foi avaliado realizando nove injeções consecutivas em 260 nm, nas quais a amostra foi preparada em diferentes concentrações de material vegetal em três níveis (15, 30 e 60 mg mL⁻¹) e três repetições para cada nível. O DPR máximo em relação às áreas das bandas cromatográficas únicas das seis isoflavonas (Banda 3-8, Figura 10B) foi de 3,82%, enquanto o DPR máximo observado para o tempo de retenção relativo foi de 0,87%. Boa seletividade foi observada mesmo entre as amostras com diferentes concentrações de material vegetal, pois as impressões digitais cromatográficas não mostraram alterações qualitativas.

4.4.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi calculada por combinações aleatórias de amostras (três amostras preparadas em três dias diferentes, por dois analistas diferentes), a concentração da amostra (15, 30 e 60 mg mL⁻¹) e o dia da injeção (três dias diferentes para cada amostra) (FUNARI et al., 2014). Em relação às áreas das bandas cromatográficas únicas das seis isoflavonas (Banda 3–8, Figura 10B) o valor DPR foi 4,69%, enquanto o DPR máximo observado para o tempo de retenção relativo foi 1,54%.

4.5 Aplicação da metodologia otimizada para analisar soja comercial

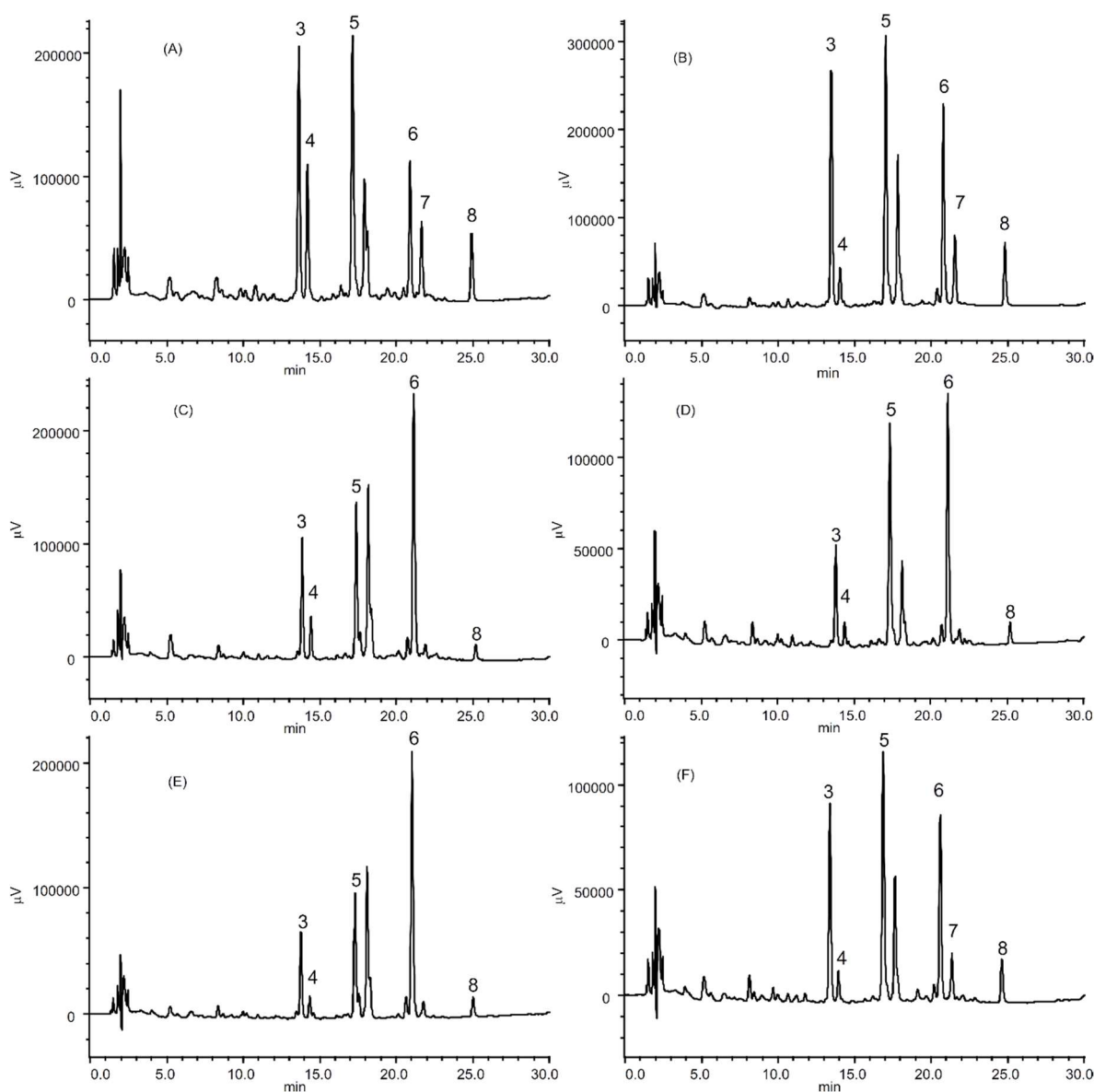
Aplicamos o método HPLC otimizado com EtOH e água acidificada em seis amostras de soja comercial produzida em diferentes locais e adquirida em mercados locais na cidade de Bauru, SP, Brasil. As seis amostras de soja foram produzidas em: (a) Neves Paulista, SP; (b) São José do Rio Preto, SP; (c) São João da Boa Vista, SP; (d) São Paulo, SP; (e) Hortolândia, SP; (f) Camaquã, RS. A comparação dos perfis cromatográficos de seis amostras demonstrou as semelhanças entre o fingerprint das amostras comerciais de *Glycine max* (L.) Merr. (Figura

14) e a amostra autêntica (Figura 10B). Esta comparação foi realizada verificando o tempo de retenção e os espectros de UV dos principais marcadores (isoflavonas): daidzina (pico 3), glicitina (pico 4), genistina (pico 5), acetilgenistina (pico 6), daidzeína (pico 7) e genisteína (pico 8). Portanto, esta metodologia é uma alternativa viável para o controle de qualidade e autenticação da soja. Este método de HPLC verde, além de permitir comparações entre os perfis cromatográficos através do tempo de retenção e dos espectros de UV das bandas cromatográficas, foi eficaz na separação dos principais marcadores da soja, que estavam presentes nas seis amostras comerciais.

O planejamento experimental em cromatografia abrange a química verde (ANASTAS, WARNER, 2008) e os princípios do GAC (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013). É uma abordagem atualizada e mais ampla para fins analíticos, pois reduz o número necessário de experimentos e também o tempo e a energia gastos (o sétimo e o nono princípios do GAC). Os principais princípios relativos ao GAC foram considerados desde a preparação das amostras até a otimização geral do método. A abordagem sustentável usou EtOH como solvente orgânico no sistema de fase móvel. A abordagem multivariada respeita o oitavo princípio do GAC, enquanto o uso de uma quantidade mínima de material vegetal cobre o segundo princípio do GAC. O solvente tóxico acetonitrila foi substituído pelo EtOH menos tóxico, reduzindo os resíduos tóxicos, convergindo com os princípios 10, 11 e 12 da GAC.

A análise de seis amostras comerciais de soja produzidas em diferentes locais do Brasil foi realizada com sucesso em condições otimizadas, o que prova que o método desenvolvido pode ser aplicado para determinação de isoflavonas de soja. Portanto, o método de HPLC verde e sustentável e as análises estatísticas realizadas são uma ferramenta poderosa para o controle de qualidade da soja.

Figura 14 - Cromatogramas de amostras comerciais de soja. Condições cromatográficas: C18 XSelect (150 x 4.6 mm d.i.; 5 μ m), com pré-coluna (4 x 3 mm, 5 μ m), HPLC (Jasco®), Fase móvel: H₂O + 0,5% de ácido acético (A) e EtOH (B) no seguinte gradiente: 5-55% de B em 30 min. Vazão: 1 mL min⁻¹. Temperatura de análise: 35 °C; volume de injeção: 20 μ L, λ = 260 nm. (A) Amostra de Neves Paulista, SP; (B) amostra de São José do Rio Preto, SP; (C) amostra de São João da Boa Vista, SP; (D) amostra de São Paulo, SP; (E) amostra de Hortolândia, SP; (F) amostra de Camaquá, RS. Bandas: 3, daidzina; 4, glicitina; 5, genistina; 6, acetilgenistina; 7, daidzeína; 8, genisteína.



Adaptado de: Borges et al.,2020

4.6 Análise térmica por TG-DSC

A discussão a seguir é focada nas mudanças no perfil térmico (TG-DSC) causadas pela extração da amostra inicial. Quando a "amostra inicial" é mencionada ao longo da discussão, estamos nos referindo às sementes secas trituradas de soja. A influência da extração no comportamento térmico pode ser percebida pela variação da decomposição das amostras. Portanto, a composição das amostras iniciais é de extrema importância para sugerir as fontes dessas alterações (Tabela 12).

Tabela 12. Metabólitos secundários de *G. max*

Espécie	Família	Parte usada	Classe de metabólitos presentes	Metabólitos principais	Referências
<i>Glycine max</i> (soybean)	Fabaceae	sementes	Proteína, conteúdo de óleo, carboidrato solúvel, carboidratos insolúveis, minerais de cinzas, fenólicos, isoflavonas, triterpenóides, saponinas, vitaminas, tocoferóis e aminoácidos	Sementes contendo ácido glucônico, ácido quínico, daidzina, glicetina, genistina, acetilgenistina, daidzeína e genisteína	LEE et al., 2018 LEE et al., 2015 ZAFRA-GÓMEZ et al., 2010 CHO et al., 2013

4.6.1 Termogravimetria simultânea - calorimetria de varredura diferencial (TG-DSC).

Esta seção foi organizada na seguinte ordem: 1) discussão do teor de umidade e cinzas para apoiar as diferenças de composição na amostra inicial, biomassa residual e extrato; 2) discussão do comportamento térmico, perdas de massa e estabilidade térmica para fornecer evidências do efeito da extração na composição da matriz. Na primeira seção, devemos considerar que cada conjunto de comparação (amostra inicial: m_i , extrato: m_e e biomassa residual após a extração: m_r) deve seguir o esquema e a equação 9:

$$m_i \xrightarrow{\text{extração}} m_e + m_r \quad \text{Balanço de massa}$$

$$m_i = m_e + m_r \quad (9)$$

A equação 9 deve ser válida para conteúdos orgânicos e inorgânicos.

Uma questão surge da diferença na composição e na extração: a eficiência de extração e composição de cada parte é diferente. Portanto, devemos considerar as diferenças na composição de cada parte e na eficiência da extração.

Na segunda seção, o final dos estágios de decomposição foi assumido como o mínimo local da derivada primeira da curva TG (DTG). É importante notar que as etapas podem estar relacionadas à decomposição de diferentes compostos principais, ou seja, proteína, celulose, hemicelulose e lignina. De acordo com a literatura, a decomposição térmica em matrizes lignocelulósicas, até aproximadamente 400 °C, deve-se principalmente à celulose, hemicelulose e parte da lignina; acima de 400 °C aproximadamente, a decomposição é a partir do resíduo carbonáceo de celulose e lignina (RUEDA-ORDÓÑEZ; TANNOUS, 2018)

4.6.2 Umidade e cinzas

As amostras de soja apresentaram variações em seu teor de umidade (Tabela 13). De acordo com a Farmacopeia Brasileira (6ª edição), a umidade da planta seca varia de 8 a 14% (ANVISA, 2019). Pode absorver umidade se deixado exposto ao meio ambiente devido às características higroscópicas das amostras estudadas. Portanto, na amostra seca, a umidade está presente devido à adsorção de água.

A soja é rica em proteínas (40%) e teor de óleo (20%), e também contém aproximadamente 33% de carboidratos, dos quais 16,6% são açúcares solúveis (HYMOWITZ; COLLINS, 1974). Portanto, a umidade residual nas sementes desidratadas se deve à adsorção de água por açúcares presentes como sacarose, estaquiose, rafinose, glicose, frutose e verbascose (GIANNOCCARO et al., 2006; HOU et al., 2009). Como o teor de umidade variou nas amostras, os valores para o teor de cinzas foram normalizados para fornecer uma base comum de comparação sem a influência da umidade - base seca total (Tabela 13).

Tabela 13 - Teores de umidade e cinzas das amostras analisadas.

		Extrato Hidroetanólico – Soja (HS)	biomassa residual - extrato hidroetanólico (RHS)	Soja seca (SS)
Umidade	m (%)	14,24	28,85	7,33
	T_i-T_f (°C)	30–160	30–189	30–165,5
Cinzas	m_{ash} (%)	6,91	2,85	4,48
	m_s (%)	8,05	4,00	4,84

m, porcentagem de umidade; T_i , temperatura inicial; T_f , temperatura final; $T_i - T_f$, faixa de temperatura da perda de umidade; m_{ash} , teor de cinzas a 800 °C obtido a partir da curva TG; m_s , teor de cinza padronizado calculado em base seca total.

As porções orgânica e inorgânica foram calculadas para todas as amostras e a normalização de umidade foi aplicada. Considerando 50 g de soja seca, 46,33 g descontando a umidade, em que cerca de 44,09 g e 2,24 g são os teores orgânico e inorgânico, respectivamente.

Da amostra inicial, foram obtidos 8,36 g de extrato hidroetanólico. A massa descontando a umidade foi de 7,17 g, sendo cerca de 6,59 g e 0,58 g de conteúdo orgânico e inorgânico, respectivamente.

Seguindo a equação 9, a massa da biomassa residual, o conteúdo orgânico e inorgânico deve ser 39,17 g, 37,60 g e 1,57 g, respectivamente. Portanto, o valor calculado das cinzas é de 4,26%, consistente com o valor observado na Tabela 13 para o valor normalizado das cinzas para a biomassa residual (4,00%).

A partir das curvas TG foi obtido a porcentagem de massa (em base seca total), a porcentagem de perda de massa total e o teor de cinzas, os quais foram usados para calcular a massa sem umidade.

4.6.3 Comportamento térmico e estabilidade.

Os dados do TG/DTG-DSC forneceram informações sobre a estabilidade térmica dos compostos presentes na amostra inicial, nos extratos e na biomassa residual. Os dados TG/DTG-DSC serão mostrados de três maneiras diferentes para fornecer diferentes percepções sobre estabilidade térmica, composição e comportamento térmico. O gráfico de linha comum ilustra o comportamento térmico das amostras e a diferença nos eventos térmicos; o gráfico de contorno 2D ilustra a diferença na estabilidade térmica das amostras e permite a comparação visual do conteúdo das cinzas; os dados tabelados apresenta as massas perdidas nas amostras e dá uma comparação de como a extração afeta as porcentagens em cada faixa de temperatura ou estágio de perda de massa.

A curva DSC (Figura 14-a) mostra diferenças no comportamento térmico da biomassa residual, principalmente em temperaturas mais elevadas, onde, na amostra inicial (SS), podem ser observados dois picos exotérmicos a 468,5 e 494,5 °C, a amostra (RHS) apresenta um pico exotérmico a 485,5 °C e o extrato hidroetanólico – Soja (HS) apresenta um pico a 397,7 °C. O pico exotérmico em 397,7 °C no extrato hidroetanólico está provavelmente relacionado ao pico

largo presente na amostra inicial; a diminuição no último pico da biomassa residual em comparação com a amostra inicial pode estar intimamente relacionada a essa mudança.

Um fator importante na mudança dos padrões de decomposição é como a distribuição de um composto em uma amostra altamente inflamável pode alterar a decomposição térmica dos compostos individuais.

Para os gráficos de linha (Fig. 15-a) os intermediários produzidos pela decomposição térmica do extrato se decompõem em temperaturas mais altas. Portanto, o pico exotérmico largo presente na amostra inicial não é observado na biomassa residual - um ombro para o pico agudo é observado neste caso. A Figura 15-b também ilustra o mesmo padrão: a estabilidade térmica do extrato é menor do que a amostra inicial e a estabilidade térmica da biomassa residual é maior do que a amostra inicial.

A Tabela 14 mostra que os compostos extraídos (HS) se decompõem em quantidades maiores no primeiro estágio em relação a biomassa residual (RHS). Consequentemente, a massa decomposta na primeira etapa da biomassa residual (RHS) é menor do que a observada na amostra inicial (SS). Portanto, a biomassa residual tem uma maior perda de massa nas etapas seguintes.

Figura 15 - a) TG/DTG-DSC e b) Mapa de contorno colorido 2D da soja em base seca total. Extrato Hidroetanólico – Soja (HS); Biomassa residual – Extrato hidroetanólico – Soja (RHS); Soja seca (SS)

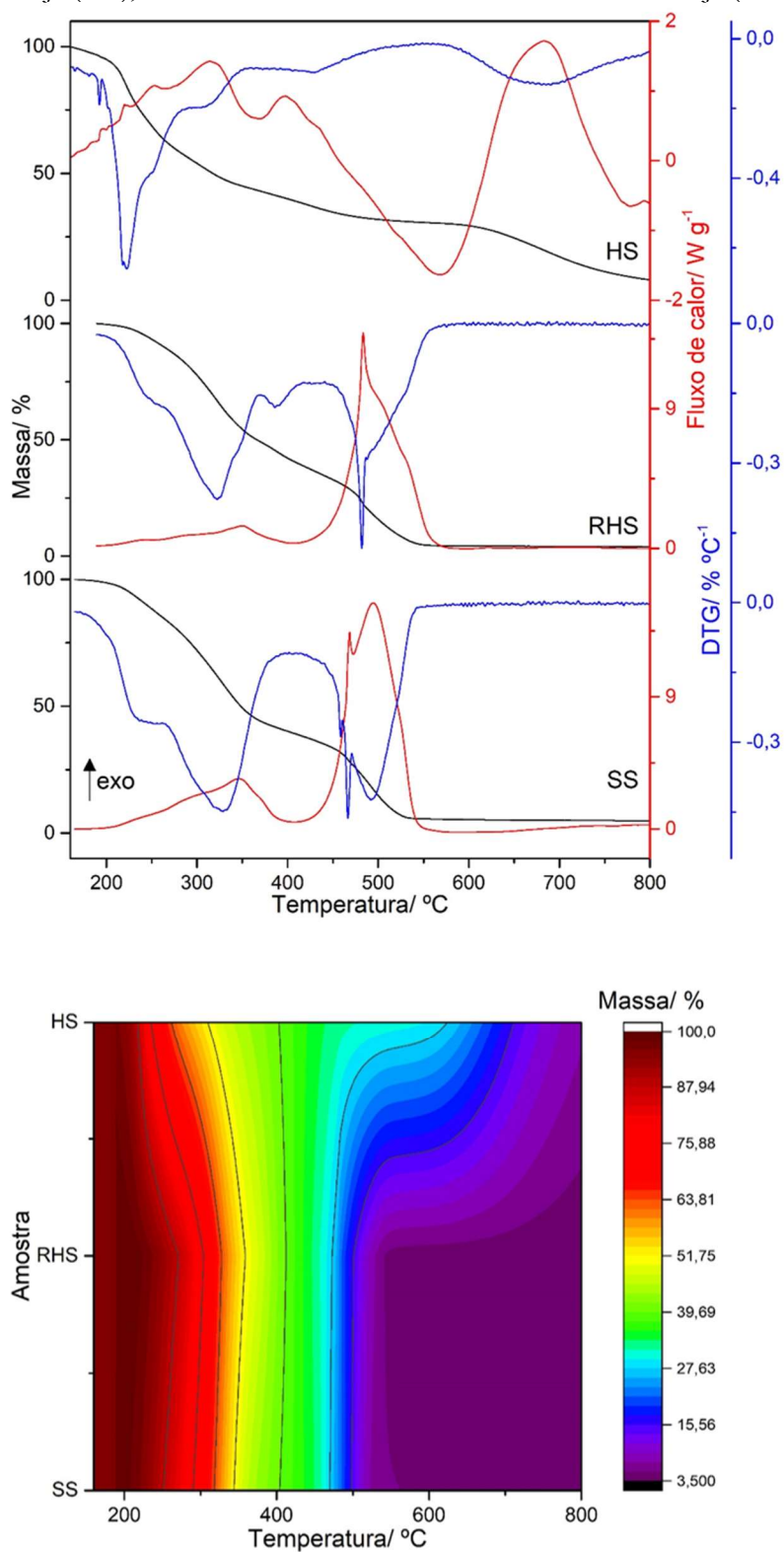


Tabela 14 - Soja: Faixas de temperatura (θ), perdas de massa (Δm) e temperatura de pico (T_p) para cada etapa das curvas TG-DSC em atmosfera de ar seco.

Amostras		Estágio			
		Primeiro	Segundo	Terceiro	Quarto
Extrato Hidroetanólico – Soja (HS)	θ (°C)	160 – 359	359 – 548,5	548,5 – 800	
	Δm (%)	55,90	13,41	22,65	
	T_p (°C)	194↑ 219,7↑ 252,5↑ 314,5↑	397,7↑	682,8↑	
Biomassa residual – Extrato hidroetanólico – Soja (RHS)	θ (°C)	189 – 370	370 – 432,5	432,5 – 582	582 – >800
	Δm (%)	50,83	13,12	31,67	0,38
	T_p (°C)	350,2↑	483,5↑	–	–
Soja Seca (SS)	θ (°C)	165 – 401,5	401,5 – 570	570 – 800	
	Δm (%)	60,05	34,50	0,62	
	T_p (°C)	346,3↑	468,5↑ 494,5↑	–	

θ , faixa de temperatura; Δm , perda de massa; T_p , pico de temperatura no DSC; ↑, exotérmico; ↓ endotérmico.; SS, Soja seca.

4.7 Análise de gás evoluído

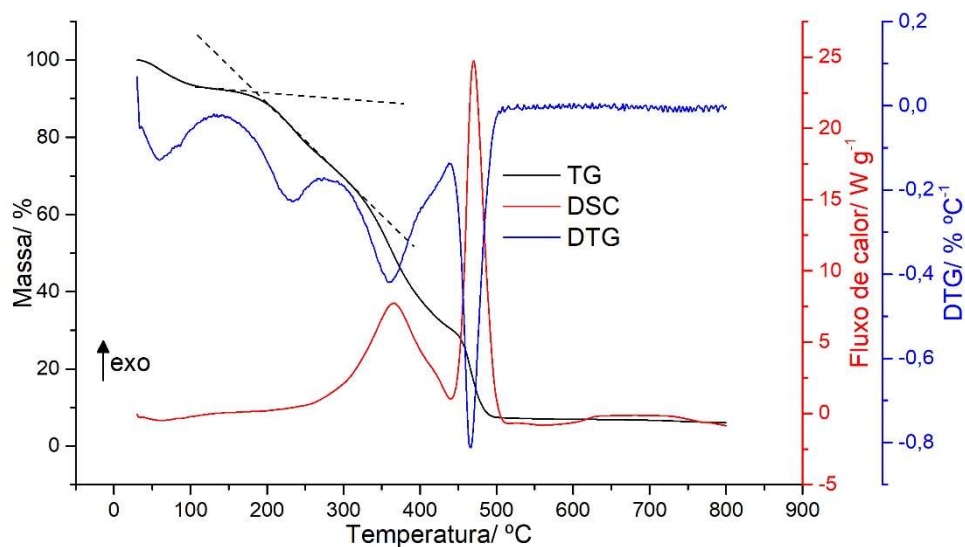
Os gases evoluídos durante a decomposição térmica das amostras corroboram as premissas feitas nas seções anteriores: principalmente que os compostos extraídos têm menor estabilidade térmica; e que os compostos extraídos são observados com menor grau na biomassa residual como mostra a Figura S10 no apêndice. O padrão de combustão não será discutido em profundidade nesta seção, já que a maioria dos intermediários e resíduos carbonáceos produzem dióxido de carbono e água. Portanto, a faixa na qual esses compostos (CO_2 e H_2O) são liberados é a mesma dos picos de DTG.

Em toda a biomassa residual e nas amostras iniciais, o ácido acético foi detectado na primeira fase de decomposição da amostra sem umidade. Para a biomassa residual e amostras iniciais, as bandas estão relacionadas a compostos orgânicos (hidrocarbonetos) no primeiro estágio de decomposição. Em temperaturas mais altas (a partir de 490 °C), bandas relacionadas à amônia são observadas. Essa decomposição pode estar associada a uma grande variedade de metabólitos secundários, principalmente alcaloides, presentes no extrato seco.

4.8 Desempenho de Combustão

A Termogravimetria (TG), Termogravimetria Derivada (DTG) e calorimétrica exploratória diferencial (DSC) são técnicas utilizadas para determinação dos parâmetros de combustão como Temperatura de ignição (T_i) e Temperatura de *Burnout* (*queima*) (t_b) e temperatura de máxima perda de massa (T_p) que são as temperaturas de início e fim do evento de perda de massa, respectivamente, obtidas a partir da curva TG. A temperatura de máxima perda de massa (T_p) que é a temperatura na qual se registra a máxima razão de perda de massa sofrida por uma amostra, correspondendo ao valor mínimo registrado na curva DTG associado a uma determinada etapa de perda de massa. O ponto máximo de perda de massa (R_p) e a média de perda de massa (R_v) em função da temperatura, ambos determinados em ($\% \text{ min}^{-1}$), são obtidos através da curva DTG (Figura 17).

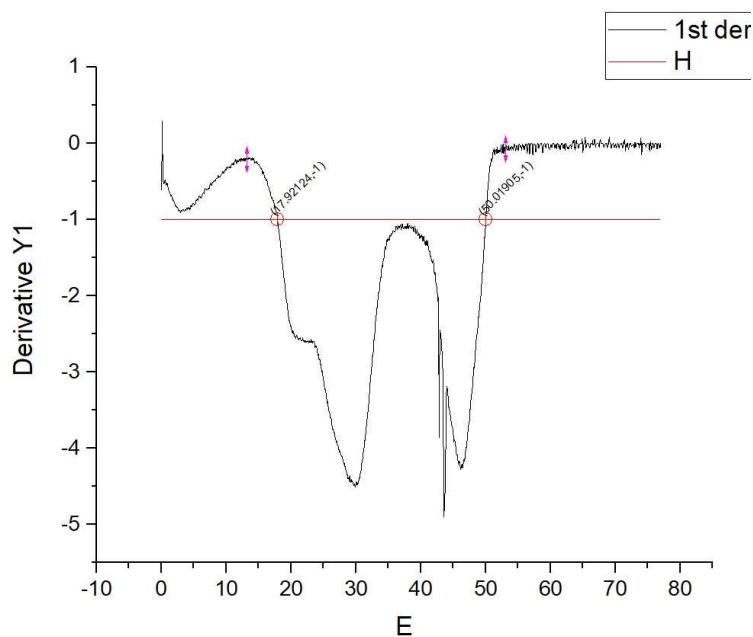
A Temperatura de ignição (T_i) é calculada pela temperatura *onset* (temperatura em que a linha extrapolada da maior razão de perda de massa cruza a linha extrapolada de quando se inicia a perda de massa). Linha extrapolada preta é a da massa antes do início de perda de massa. E a linha vermelha é a da maior razão de perda de massa como mostra a Figura 16.

Figura 16 - Determinação da temperatura de ignição (Ti) pelo método da tangente por TG.

Fonte: próprio autor

A partir da curva DTG foi possível calcular a temperatura/tempo de volatilização e Burnout:

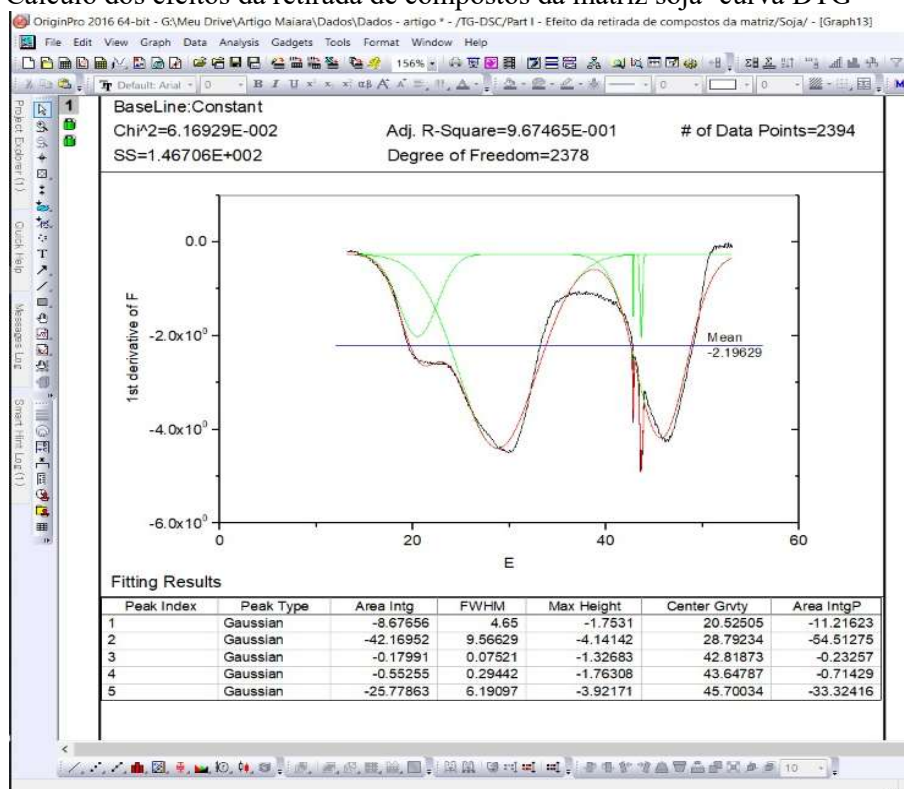
- Volatilização: quando a dtg tem um valor a $-1 \text{ } \text{min}^{-1}$ após o início da decomposição;
- Burnout: quando a dtg tem um valor de $-1 \text{ } \text{min}^{-1}$ quando termina a decomposição;

Figura 17 - Curva DTG

Fonte: próprio autor

A partir dos dados tabelados é possível calcular os picos, as larguras e a meia altura da curva e a média da DTG realizando a deconvolução dos picos. Anotado os valores da tabela de FWHM, Max Height e Center Gravity (Figura 18) é possível calcular os parâmetros de combustão.

Figura 18 - Cálculo dos efeitos da retirada de compostos da matriz soja- curva DTG



Fonte: próprio autor

A Tabela 15 mostra os parâmetros de combustão das amostras, extratos e biomassa residual. A consequência da extração dos compostos da amostra inicial é especialmente destacada nesta seção. Os resultados discutidos na seção 4.6.3 mostram as diferenças no comportamento térmico, e esses resultados estão diretamente relacionados com o desempenho de combustão.

Tabela 15 - Parâmetros de combustão das amostras, resíduo e extrato *G .max*.

	Extrato Hidroetanólico – Soja (HS)	Biomassa residual – Extrato hidroetanólico – Soja (RHS)	Soja Seca (SS)	(HS/SS) %	(RHS/SS) %
10⁵ x D_v	5,76	2,39	3,12	185,6154	76,6026
10² x C_i	4,17	1,57	1,81	230,3867	86,7403
10³ x C_b	66,20	3,14	11,95	553,9749	26,2762
10⁷ x S	1,25	0,37	0,50	250	74

D_v, índice de matéria volátil liberada; C_i, índice de ignição; C_b, índice de burnout; S, índice de combustibilidade abrangente. HS, Extrato hidroetanólico – Soja; RHS, Biomassa residual - Extrato hidroetanólico – Soja; SS, Soja Seca.

A extração de compostos da matriz inicial e, conseqüentemente, dos intermediários que se decompõem em altas temperaturas, afetarão os parâmetros de combustão. Mesmo que essas diferenças possam afetar alguns parâmetros importantes, por exemplo, a taxa média de decomposição, elas também podem melhorar a taxa de decomposição de uma etapa individual.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 15 é possível observar que boa parte da energia gerada se deve aos compostos extraído (HS) e não a biomassa residual (RHS). Portanto as taxas observadas para as biomassas residuais diminuíram com a extração dos compostos presentes na soja. Os parâmetros da biomassa residual diminuíram se comparados ao extrato hidroetanólico. Uma diminuição de 23%, 13%, 73% e 26% para os parâmetros D_v, C_i, C_b, S respectivamente.

O tempo de ignição e a temperatura diminuiu para a biomassa residual em comparação com a amostras inicial, o que segue o padrão mostrado no mapa de contorno 2D (Figura 15-b).

Resumindo os resíduos de soja demonstrarem baixos índices de combustibilidade em comparação a amostra inicial e o extrato hidroetanólico.

Estudos relacionados a biomassa residual de plantas em especial a soja, se demonstraram necessários já que se trata de uma das principais culturas do mundo devido a produção de isoflavonas, compostos de alto valor agregado, de alimentos e biodiesel. O trabalho de Carneiro et al., 2020 relacionado a investigação do potencial ocorrência e teor de isoflavonas em resíduos agrícolas de soja mostrou a importância de se investigar resíduos uma vez que aproximadamente 460 milhões de toneladas de soja residual foram produzidos na colheita 2018/2019 como também os métodos de extração geram grandes quantidades de resíduos sólidos que não são reaproveitados.

Até onde sabemos, a literatura não relata a ocorrência potencial da biomassa residual de soja. Tal investigação estaria em linha com o que é recomendado pela Organização das Nações Unidas (ONU) que reconhece a necessidade de intensificar as pesquisas sobre tecnologias que visam proteger o planeta, promover ações para erradicar a pobreza, garantir qualidade de vida entre todo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todo o processo de desenvolvimento do método foi delineado pelos princípios de Química Verde e Química Analítica Verde para reduzir o número de experimentos, quantidade de resíduos, tempo e energia gastos, além de ser mais seguro para analistas. Essa abordagem multivariada respeitou o Princípio 8, a quantidade mínima de material vegetal utilizada respeitou o Princípio 2, o solvente tóxico acetonitrila foi substituído pelo menos tóxico EtOH permitindo a redução de resíduos tóxicos e concordando com os Princípios 7, 10, 11 e 12 da Química Verde.

Este estudo demonstrou que planejamento experimental é uma abordagem que pode ser empregada para desenvolvimento de métodos cromatográficos verdes para HPLC. Porém, é importante ressaltar que no processo de desenvolvimento cromatográfico parâmetros ambientais devem ser levados em consideração no processo de otimização, principalmente na atribuição de valores das variáveis que não foram significativas no modelo matemático determinado. O método verde desenvolvido é inédito para análises da composição química de sementes de soja.

É importante ressaltar que o EtOH indicado para o método foi o bioetanol (EtOH grau alimentício de origem fermentativa), o que torna o método sustentável e menos custoso em razão de suas propriedades como biodegradabilidade, origem renovável, preço muito inferior em relação aos solventes grau HPLC tradicionais e maior disponibilidade, além de oferecer a possibilidade de análise sem a geração de resíduos tóxicos que necessitam de tratamentos custosos.

O método proposto foi comparado com dois métodos de referências (Kao e Chen, 2002; Kim et al., 2014) utilizando as métricas HPLC-EAT e AGREE e, em ambas as métricas o método desenvolvido apresentou pontuações que o classifica com mais verde do que os métodos comparados.

A eficiência do método desenvolvido foi determinada pelas figuras de mérito no processo de validação e pelas análises de seis amostras comerciais de soja produzidas em diferentes localidades do Brasil, evidenciando que o método desenvolvido pode ser aplicado na determinação de isoflavonas de soja.

Portanto, o método de HPLC verde e sustentável pode ser uma alternativa eficiente e de menor custo para aplicação em análises de rotina, aquelas que geram grandes volumes de descarte de solventes, como controle de qualidade de produtos derivados da soja.

Com relação ao estudo térmico, foi avaliado o efeito da extração hidroetanólico sobre o parâmetro de combustão da biomassa residual da soja. A amostra inicial apresentou menor estabilidade térmica em comparação com a biomassa residual. Os intermediários da decomposição térmica dos compostos extraídos apresentaram temperaturas mais elevadas. Portanto, a biomassa residual apresentou menores quantidades de perda de massa em temperaturas mais elevadas em comparação com a amostra inicial.

As características da decomposição térmica e termo-oxidativa de biomassa de *Glycine max* (soja) foram avaliados por TG-DSC simultâneo. O efeito da extração hidroetanólica sobre os parâmetros de combustão da biomassa residual e a estabilidade térmica dessa amostra foram afetados pelo método de extração. Pode-se observar que os parâmetros de combustão da biomassa residual são inferiores aos da soja seca e do extrato hidroetanólico, sendo que os parâmetros de combustão do extrato são superiores aos demais (soja seca e biomassa residual). Assim, foi possível atribuir a capacidade de combustão em maior parte aos compostos presentes no extrato. Com isso conclui-se que a extração pode afetar os parâmetros de combustão.

REFERÊNCIAS

- ALAERTS, G. et al. Recent developments in chromatographic fingerprints from herbal products: set-up and data analysis. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 13, n. 10, p. 900-922, 2010.
- AMEH, S. J. et al. Current phytotherapy - A perspective on the science and regulation of herbal medicine. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 072–081, 2010.
- ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301–312, 2010.
- ANASTAS P.T, WARNER J.C. **Green Chemistry: Theory and Practice**. Oxford: Oxford University Press; 2008.
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Green analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 497-511, 2008.
- BAKER, D. D. et al. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 6, p. 1225–1244, 2007.
- BASAK, B. B. Phosphorus Supplying Capacity of Value Added Compost Prepared from Low-Grade Indian Rock Phosphates and Crop Residue. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 8, p. 2653–2662, 2017.
- BARNES, S.; KIRK, M.; COWARD, L. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 11, p. 2466-2474, 1994.
- BELAZ, K. R. A.; PEREIRA-FILHO, E. R.; OLIVEIRA, R. Development of achiral and chiral 2D HPLC methods for analysis of albendazole metabolites in microsomal fractions using multivariate analysis for the *in vitro* metabolism. **Journal of Chromatography B**, v. 932, p. 26-33, 2013.
- BERNARDINI, S. et al. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, v. 32, n. 16, p. 1926–1950, 2018.
- BERNSTEIN, N. et al. **Antiinflammatory Potential of Medicinal Plants: A Source for Therapeutic Secondary Metabolites**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. v. 150
- BHATTACHARYA, M. et al. The effect of renewable energy consumption on economic growth: Evidence from top 38 countries. **Applied Energy**, v. 162, p. 733–741, 2016.
- BORGES, M. S. et al. A green and sustainable method for monitoring the chemical composition of soybean: an alternative for quality control. **Phytochemical Analysis**, n. August, p. 1–13, 2020.
- BOX G. E, HUNTER W. H, HUNTER S. **Statistics for Experimenters**. New York: John Wiley & Sons; 1978.
- BURATTI, C. et al. Thermogravimetric analysis of the behavior of sub-bituminous coal and cellulosic ethanol residue during co-combustion. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 154–62, jun. 2015.

CARNEIRO, A. M. et al. Soya agricultural waste as a rich source of isoflavones. **Food Research International**, v. 130, n. April 2019, p. 108949, 2020.

CASSINI, S. T. A. et al. Validation of the acetonitrile-free analytical method for microcystin analysis by high performance liquid chromatography. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1208-1213, 2013.

CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 927-934, 2007.

CHEN, J. et al. Comparative evaluation of thermal oxidative decomposition for oil-plant residues via thermogravimetric analysis: Thermal conversion characteristics, kinetics, and thermodynamics. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 37–46, 2017.

CHEN, Y. et al. Novel blasting extrusion processing improved the physicochemical properties of soluble dietary fiber from soybean residue and in vivo evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 120, n. 1, p. 1–8, 2014.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

DEJAEGER, B.; VANDER HEYDEN, Y. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 56, n. 2, p. 141-158, 2011.

DENARI, B. G.; CARVALHEIRO, É. T. G. C. M. Princípios e Aplicações de Análise Térmica. Material de apoio, Curso Teórico/Prático. Universidade São Paulo, Instituto de Química de São Carlos. Julho/Agosto, 2012.

DE OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; DE LIMA GOMES, E. C. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224–1230, 2011.

DE SOUZA ARAÚJO, A. A. et al. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 269–277, 2006.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303–336, 2012.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002.

DOEHLERT, D. H. Uniform shell designs. **Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)**, v. 19, n. 3, p. 231-239, 1970.

DOLAN, J. W. LC TROUBLESHOOTING LC Columns — The Top-10 List. n. April, p. 2–4, 2003.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

- FERNANDES, F. H. A. et al. Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 113, n. 2, p. 443–447, 2013.
- FERREIRA, S. L. C. et al. Doehlert matrix: A chemometric tool for analytical chemistry - Review. **Talanta**, v. 63, n. 4, p. 1061–1067, 2004.
- FERREIRA, B. D. L. et al. Kinetic study of anti-HIV drugs by thermal decomposition analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 1, p. 577–585, 2017.
- FLORES, F. P.; SINGH, R. K.; KONG, F. Physical and storage properties of spray-dried blueberry pomace extract with whey protein isolate as wall material. **Journal of Food Engineering**, v. 137, p. 1–6, 2014.
- FUNARI, C. S. et al. Green chromatographic fingerprinting: An environmentally friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 1–2, p. 37–44, 2014.
- FUNARI, Cristiano S. et al. Acetone as a greener alternative to acetonitrile in liquid chromatographic fingerprinting. **Journal of separation science**, v. 38, n. 9, p. 1458–1465, 2015.
- GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, 2013.
- GANORKAR, S. B.; SHIRKHEDKAR, A. A. Design of experiments in liquid chromatography (HPLC) analysis of pharmaceuticals: Analytics, applications, implications and future prospects. **Reviews in Analytical Chemistry**, v. 36, n. 3, 2017.
- GARCÍA-VILLALBA, R. et al. Comparative metabolomic study of transgenic versus conventional soybean using capillary electrophoresis–time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1195, n. 1–2, p. 164–173, 2008.
- GIANNOCCARO, E; WANG, Ya-Jane; CHEN, P. Effects of solvent, temperature, time, solvent-to-sample ratio, sample size, and defatting on the extraction of soluble sugars in soybean. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 1, p. C59–C64, 2006.
- GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Adsorption mechanisms and effect of temperature in reversed-phase liquid chromatography. Meaning of the classical Van't Hoff plot in chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 13, p. 4642–4653, 2006.
- GRIFFITH, A. P.; COLLISON, M. W. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 913, n. 1–2, p. 397–413, 2001.
- HASSAN, H.; LIM, J. K.; HAMEED, B. H. Recent progress on biomass co-pyrolysis conversion into high-quality bio-oil. **Bioresource Technology**, v. 221, n. September, p. 645–655, 2016.
- HASHIMOTO K, MORIMOTO K, DOBSON S. World Health Organization. In: Acetonitrile Environmental Health Criteria 154. Geneva: World Health Organization; 1993.

- HEINISCH, S.; ROCCA, J. L. Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 4, p. 642–658, 2009.
- HOU, A. et al. Sugar variation in soybean seed assessed with a rapid extraction and quantification method. **International Journal of Agronomy**, v. 2009, 2009.
- HUTCHINSON, J. P. et al. Investigation of polar organic solvents compatible with Corona Charged Aerosol Detection and their use for the determination of sugars by hydrophilic interaction liquid chromatography. **Analytica chimica acta**, v. 750, p. 199–206, 2012.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), ICH, 2005.
- IONASHIRO, M.; GIGANTE, A. CRISTINA; CAIRES, F. J. **Giolito: fundamentos da termogravimetria e análise térmica diferencial/calorimetria exploratória diferencial**. 2a. ed. Araraquara: Vesper, 2012.
- IONASHIRO, M.; CAIRES, F. J.; GOMES, D. J. C. **Giolito: fundamentos da termogravimetria e análise térmica diferencial / calorimetria exploratória diferencial**. 2. ed. São Paulo: Giz, 2014. 192 p.
- HSIEH, H. C.; KAO, T. H.; CHEN, B. H. A Fast HPLC Method for Analysis of Isoflavones in Soybean. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 27, n. 2, p. 315–324, 2004.
- HUSAIN, G. M. et al. Pharmacodynamic Evaluation: Herbal Medicine. **Drug Discovery and Evaluation: Methods in Clinical Pharmacology**, p. 1–14, 2017.
- HYMOWITZ, T.; COLLINS, F. I. Variability of Sugar Content in Seed of Glycine max (L.) Merrill and G. soja Sieb. and Zucc. 1. **Agronomy Journal**, v. 66, n. 2, p. 239–240, 1974.
- HYÖTYLÄINEN, T. Critical evaluation of sample pretreatment techniques. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, n. 3, p. 743–758, 2009.
- KAO, T. H.; CHEN, B. H. An improved method for determination of isoflavones in soybean powder by liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 56, n. 7–8, p. 423–430, 2002.
- KIM, J. K. et al. Isoflavones profiling of soybean [Glycine max (L.) Merrill] germplasms and their correlations with metabolic pathways. **Food Chemistry**, v. 153, p. 258–264, 2014.
- KINGHORN, A. D. et al. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 6, p. 1539–1555, 2011.
- KRAVANJA, Z.; VARBANOV, P. S.; KLEMEŠ, J. J. Recent advances in green energy and product productions, environmentally friendly, healthier and safer technologies and processes, CO₂ capturing, storage and recycling, and sustainability assessment in decision-making. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 17, n. 5, p. 1119–1126, 2015.
- LANTE, A. et al. An ecofriendly procedure to extract isoflavones from soybean seeds. **Journal of Cleaner Production**, v. 170, p. 1102–1110, 2018.
- LENARDÃO, E. J. et al. "Green chemistry": os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123–129, 2003.

- LEE, J. et al. Phytochemical constituents from the leaves of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Food Science and Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 578-586, 2008.
- LEE, S. et al. Isoflavones in Korean soybeans differing in seed coat and cotyledon color. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 2, p. 160-165, 2010.
- LEE, J. H. et al. Changes occurring in compositions and antioxidant properties of healthy soybean seeds [*Glycine max* (L.) Merr.] and soybean seeds diseased by *Phomopsis longicolla* and *Cercospora kikuchii* fungal pathogens. **Food Chemistry**, v. 185, p. 205–211, 2015.
- LEE, Y. H. et al. Rapid characterization of metabolites in soybean using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS) and screening for α -glucosidase inhibitory and anti. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 277–291, 2018.
- LI, S. P.; ZHAO, J.; YANG, B. Strategies for quality control of Chinese medicines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 802–809, 2011.
- LI, Z. et al. Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of 12 cruciferous vegetables. **Molecules**, v. 23, n. 5, 2018.
- LOPES SILVA, D. A. et al. Life cycle assessment of the sugarcane bagasse electricity generation in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p. 532–547, abr. 2014.
- LIU, Z. M. et al. A mild favorable effect of soy protein with isoflavones on body composition—a 6-month double-blind randomized placebo-controlled trial among Chinese postmenopausal women. **International journal of obesity**, v. 34, n. 2, p. 309-318, 2010.
- LUNDSTEDT, T. et al. Experimental design and optimization. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 42, n. 1-2, p. 3-40, 1998.
- MAJEED, R. et al. Bakuchiol derivatives as novel and potent cytotoxic agents: A report. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 55–67, 2012.
- MIELENZ, J. R.; BARDSLEY, J. S.; WYMAN, C. E. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3532–3539, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR), Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos**. Brasília: (DF); 2006. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf>. Acesso em: 04 mar. 2021
- MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE. **MS elabora Relação de Plantas Medicinais de interesse ao SUS**. Brasília: Agência Saúde, 2009. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2021.
- MOON, C. et al. Effect of blending ratio on combustion performance in blends of biomass and coals of different ranks. **Experimental Thermal and Fluid Science**, v. 47, p. 232–240, maio 2013.

MONTGOMERY D. C. **Design and Analysis of Experiments**. Chichester: John Wiley & Sons; 2017.

MOUSTAKAS, K.; PARMAXIDOU, P.; VAKALIS, S. Anaerobic digestion for energy production from agricultural biomass waste in Greece: Capacity assessment for the region of Thessaly. **Energy**, v. 191, 2020.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos-: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Bookman Editora, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

NIAMNUY, C. et al. Evaluation of bioactive compounds and bioactivities of soybean dried by different methods and conditions. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 899–906, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.042>>.

OLIVES, A. I.; GONZÁLEZ-RUIZ, V.; MARTÍN, M. A. Sustainable and Eco-Friendly Alternatives for Liquid Chromatographic Analysis. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 7, p. 5618–5634, 2017.

OLOFSSON, J.; BÖRJESSON, P. Residual biomass as resource—Life-cycle environmental impact of wastes in circular resource systems. **Journal of Cleaner Production**, v. 196, p. 997–1006, 2018.

PEÑALVO, J. L.; NURMI, T.; ADLERCREUTZ, H. A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. **Food Chemistry**, v. 87, n. 2, p. 297–305, 2004.

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

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

PIO, I. D. S. L. et al. Traditional knowledge and uses of medicinal plants by the inhabitants of the islands of the são francisco river, Brazil and preliminary analysis of raphiodon echinus (Lamiaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 1, p. 87–99, 2019.

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

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

PUBLIC HEALTH ENGLAND (PHE). Compendium of Chemical Hazards: Methanol. Chilton: PHE Centre for Radiation, Chemical and Environmental Hazards; 2015. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/456293/Methanol_TO_PHE_260815.pdf Accessed 29 May 2020.

PYO, D.; YOO, J.; SURH, J. Comparison of supercritical fluid extraction and solvent extraction of isoflavones from soybeans. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies®**, v. 32, n. 7, p. 923–932, 2009.

- QIAO, X. et al. Separation and detection of minor constituents in herbal medicines using a combination of heart-cutting and comprehensive two-dimensional liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1362, p. 157-167, 2014.
- QIAO, Na. et al. Haemolytic activity and adjuvant effect of soyasaponins and some of their derivatives on the immune responses to ovalbumin in mice. **International immunopharmacology**, v. 18, n. 2, p. 333-339, 2014.
- RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. High-performance Liquid Chromatographic Separation and Identification of Polyphenolic Compounds from the Infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. **Phytochemical Analysis**, v. 19, p. 17-24, 2008.
- ROSA, C. da; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311-318, 2011.
- ROUT, P. K.; NANNAWARE, A. Deepak; RAJASEKHARAN, Ram. **Process for chemical conversion of cellulose isolated from aromatic spent biomass to hydroxymethyl furfural**. U.S. Patent n. 9,199,956, 1 dez. 2015.
- RUEDA-ORDÓÑEZ, Y. J.; TANNOUS, K. Drying and thermal decomposition kinetics of sugarcane straw by nonisothermal thermogravimetric analysis. **Bioresource Technology**, v. 264, p. 131-139, 2018.
- SANDRA, P. et al. Green chromatography (Part 1): introduction and liquid chromatography. 2010.
- SAYED-AHMAD, B. et al. Effect of addition of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) on the quality of protein bread. **Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences**, v. 71, n. 6, p. 509-514, 2017.
- SANTOS, L. S. et al. Chemotaxonomic markers of organic, natural, and genetically modified soybeans detected by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of radioanalytical and nuclear chemistry**, v. 269, n. 2, p. 505-509, 2006.
- SECA, A. M. L.; PINTO, D. C. G. A. Plant secondary metabolites as anticancer agents: Successes in clinical trials and therapeutic application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 2018.
- SHIM, Y. S. et al. Rapid method for the determination of 14 isoflavones in food using UHPLC coupled to photo diode array detection. **Food Chemistry**, v. 187, p. 391-397, 2015.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Appendix I: Properties of HPLC solvents. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**, p. 879-886, 2010.
- SONG, Y. J.; PAIK, H. Y.; JOUNG, H. Soybean and soy isoflavone intake indicate a positive change in bone mineral density for 2 years in young Korean women. **Nutrition research**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 2008.
- SOUZA, O. A. et al. Fingerprinting *Cynara scolymus* L. (Artichoke) by Means of a Green Statistically Developed HPLC-PAD Method. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 7, p. 1977-1985, 2018.

SUN, J. ming et al. Rapid HPLC Method for Determination of 12 Isoflavone Components in Soybean Seeds. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, n. 1, p. 70–77, 2011.

SVETAZ, L. et al. Antifungal chalcones and new caffeic acid esters from *Zuccagnia punctata* acting against soybean infecting fungi. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3297-3300, 2004.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TISTAERT, C.; DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 690, n. 2, p. 148–161, 2011.

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

TRAKA, C. K. et al. Effects of *Ocimum basilicum* and *Ruta chalepensis* hydrosols on *Aphis gossypii* and *Tetranychus urticae*. **Journal of Applied Entomology**, v. 142, n. 4, p. 413–420, 2018.

USDA (United States Department of Agriculture). World Agricultural Supply and Demand Estimates. Washington: USDA; 2019. <https://usda.library.cornell.edu/concern/publications/3t945q76s?locale=en#release-items>. Accessed 20 March 2021.

VANDER HEYDEN, Y. et al. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 24, n. 5-6, p. 723-753, 2001.

VANHOENACKER, G.; SANDRA, P. Elevated temperature and temperature programming in conventional liquid chromatography - Fundamentals and applications. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1822–1835, 2006.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Ethnopharmacology and systems biology: A perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 53–56, 2005.

WANG, M. et al. Biogas production from chinese herb-extraction residues: Influence of biomass composition on methane yield. **BioResources**, v. 8, n. 3, p. 3732–3740, 2013.

WELCH, C. J. et al. Greening analytical chromatography. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 667–680, 2010.

WESOŁOWSKI, M.; KONIECZYŃSKI, P. Thermoanalytical, chemical and principal component analysis of plant drugs. **International journal of pharmaceutics**, v. 262, n. 1-2, p. 29-37, 2003.

WINK, M. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. **Medicines**, v. 2, n. 3, p. 251–286, 2015.

ZAFRA-GÓMEZ, A. et al. Improved sample treatment and chromatographic method for the determination of isoflavones in supplemented foods. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 872–

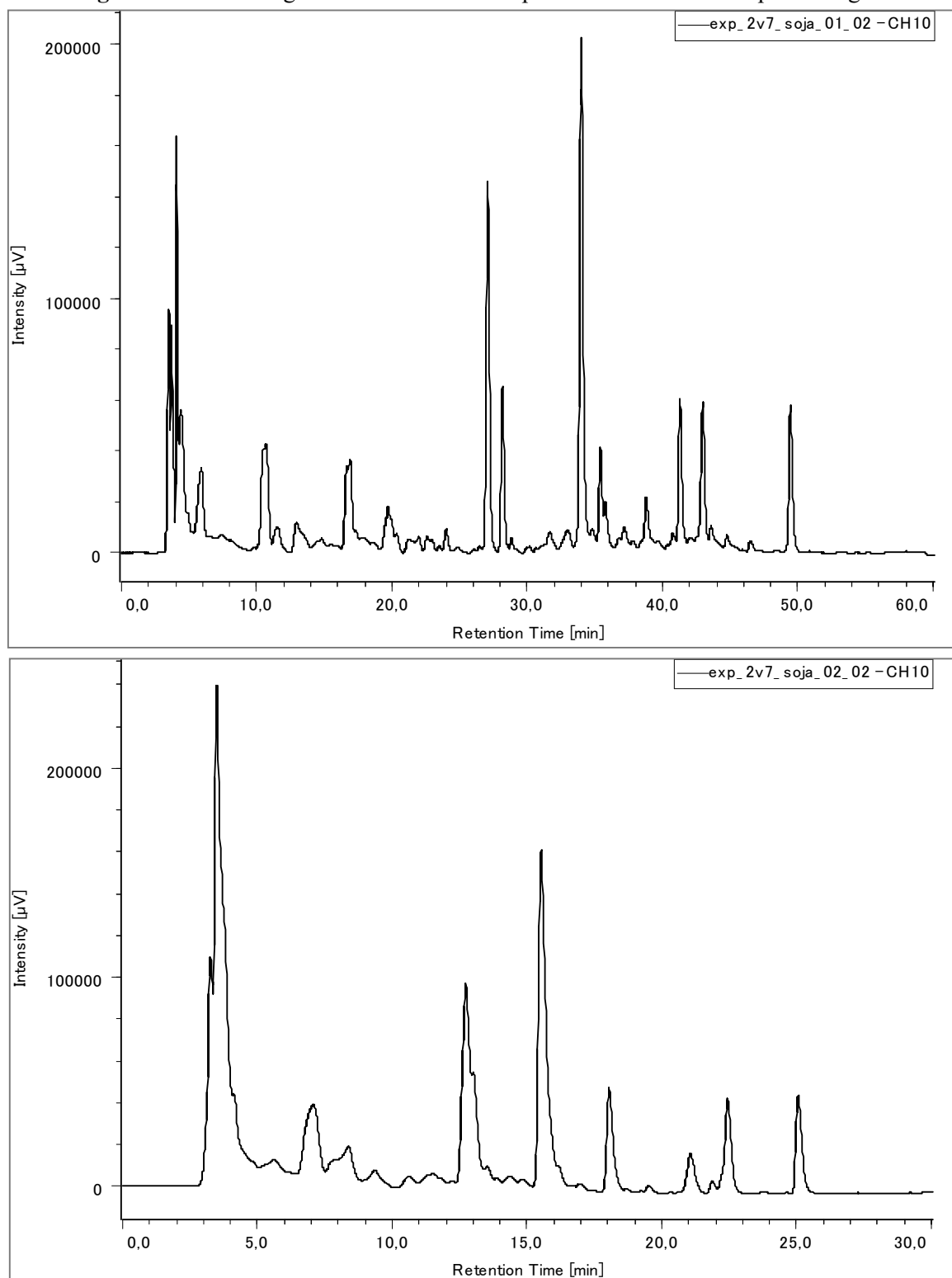
877, 2010.

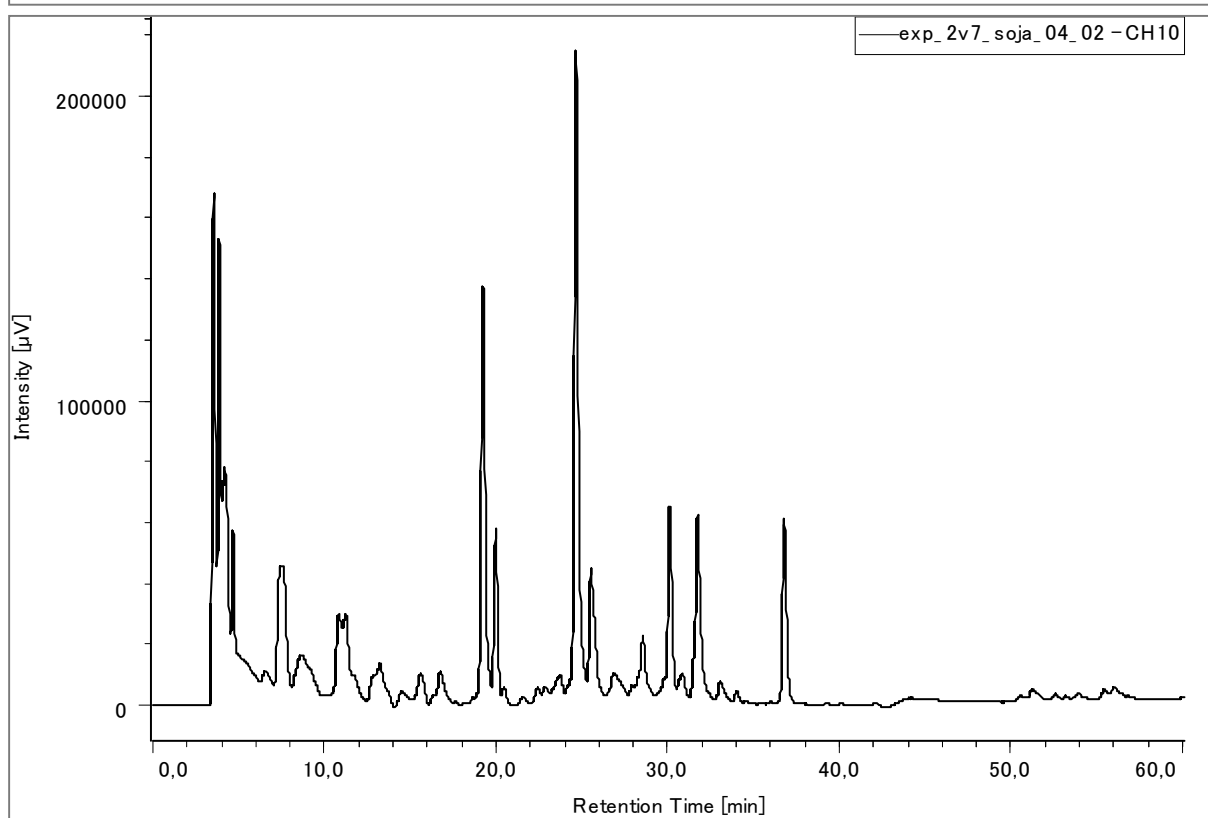
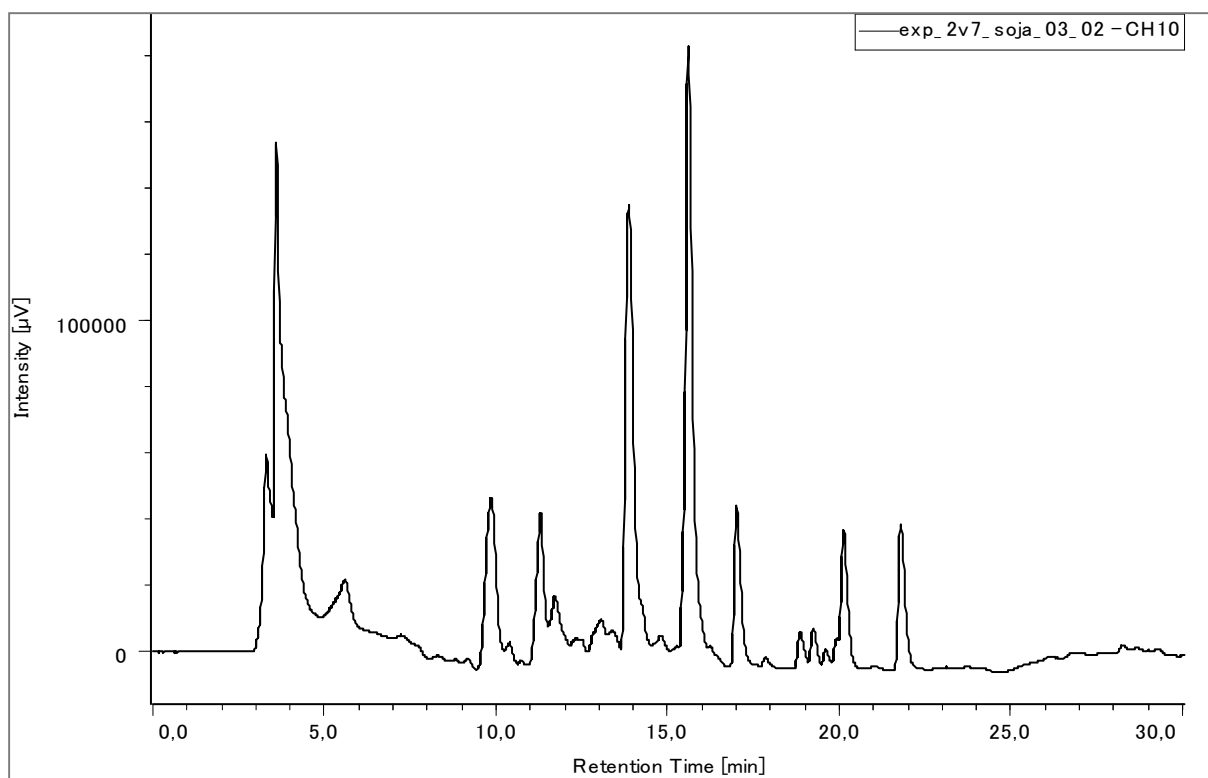
ZHELJAZKOV, V. D. et al. Dual Utilization of Medicinal and Aromatic Crops as Bioenergy Feedstocks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 33, p. 8744–8752, 2018.

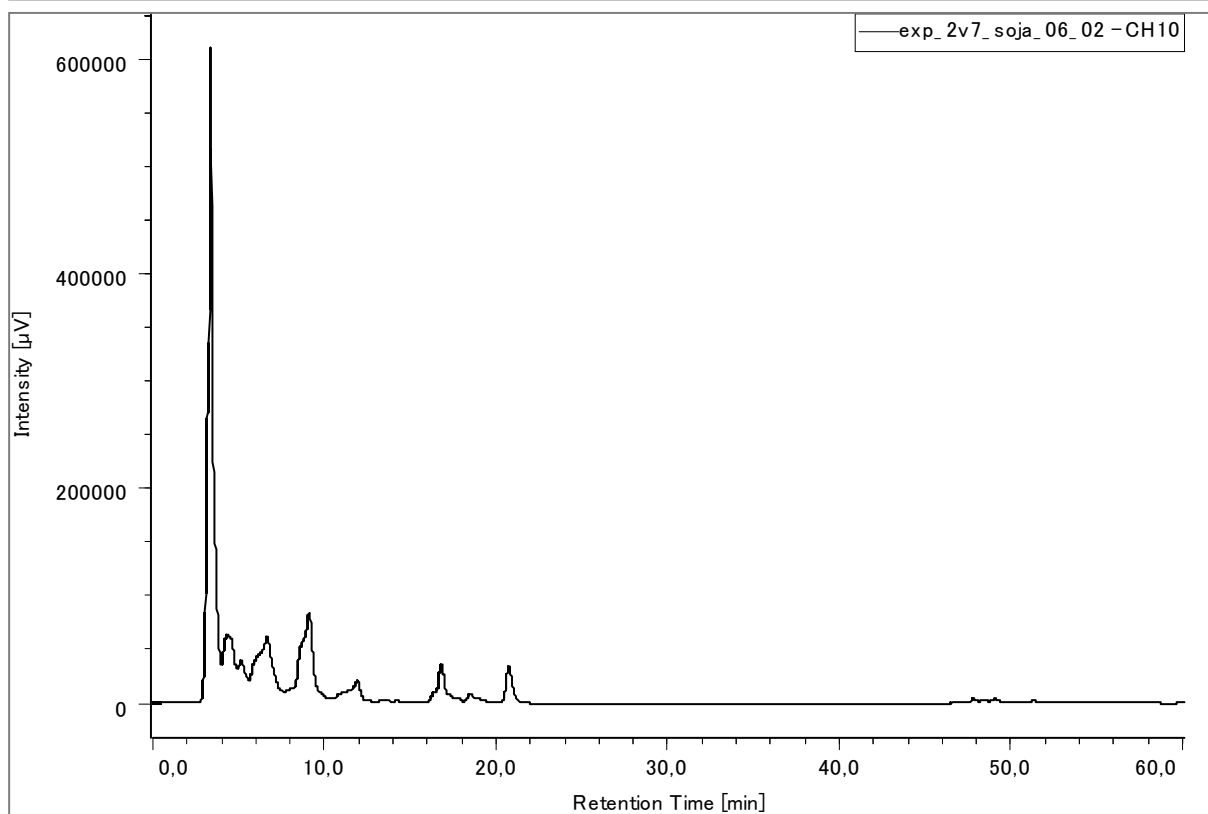
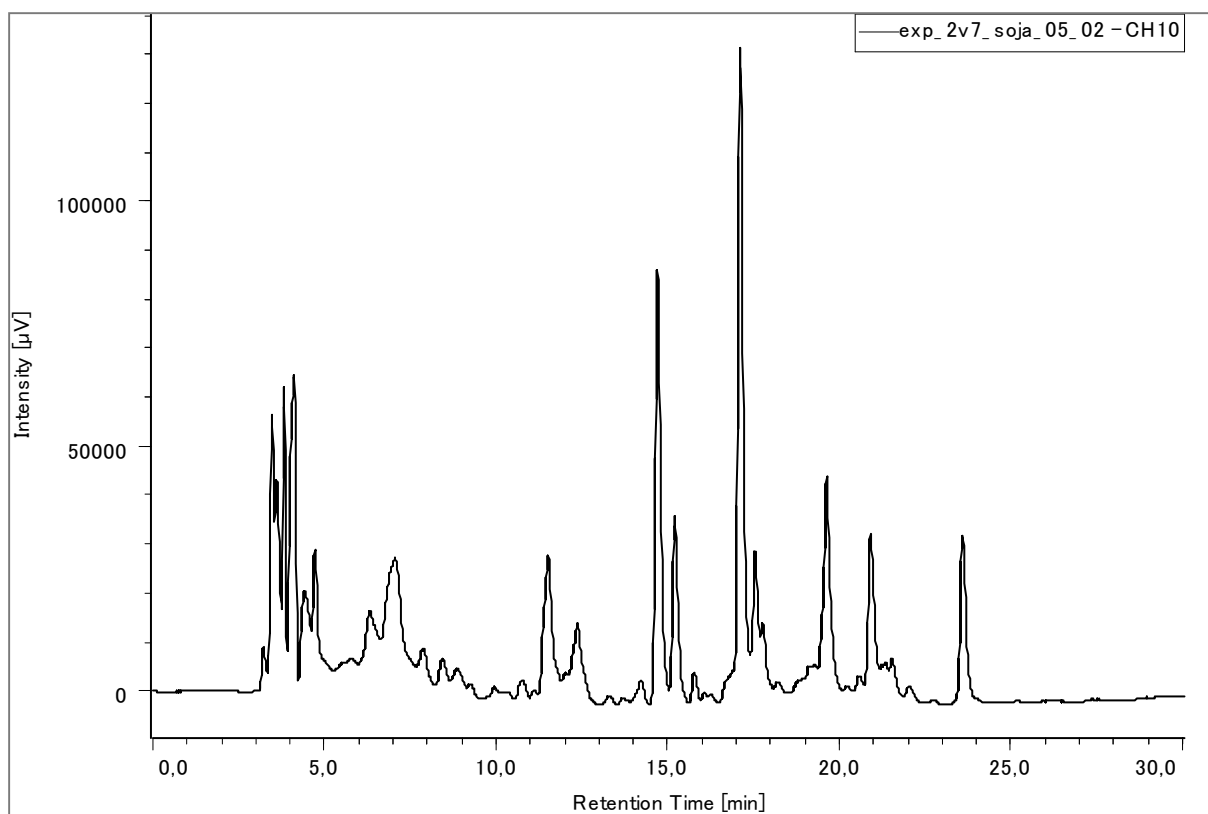
ZHU, G. et al. The utilization of aromatic plant waste resource. **Advanced Materials Research**, v. 518–523, p. 3561–3565, 2012.

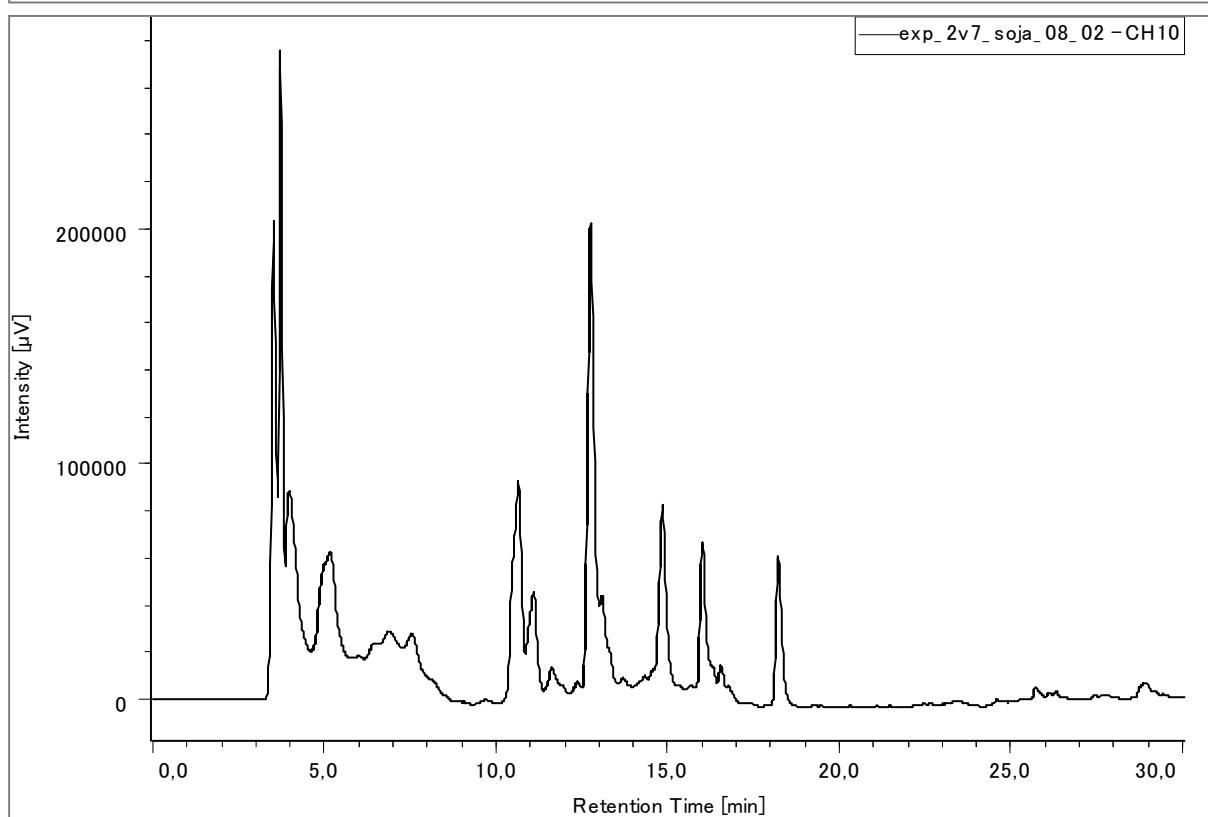
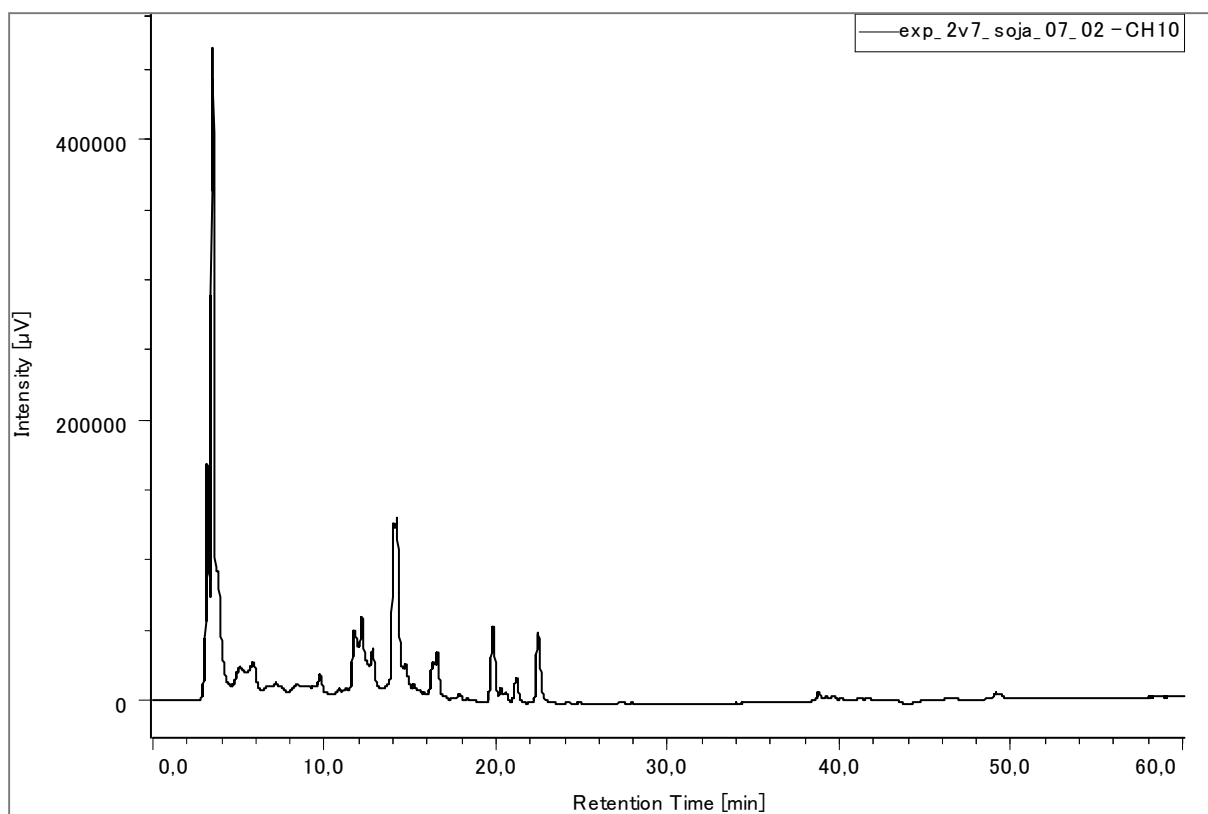
APÊNDICE

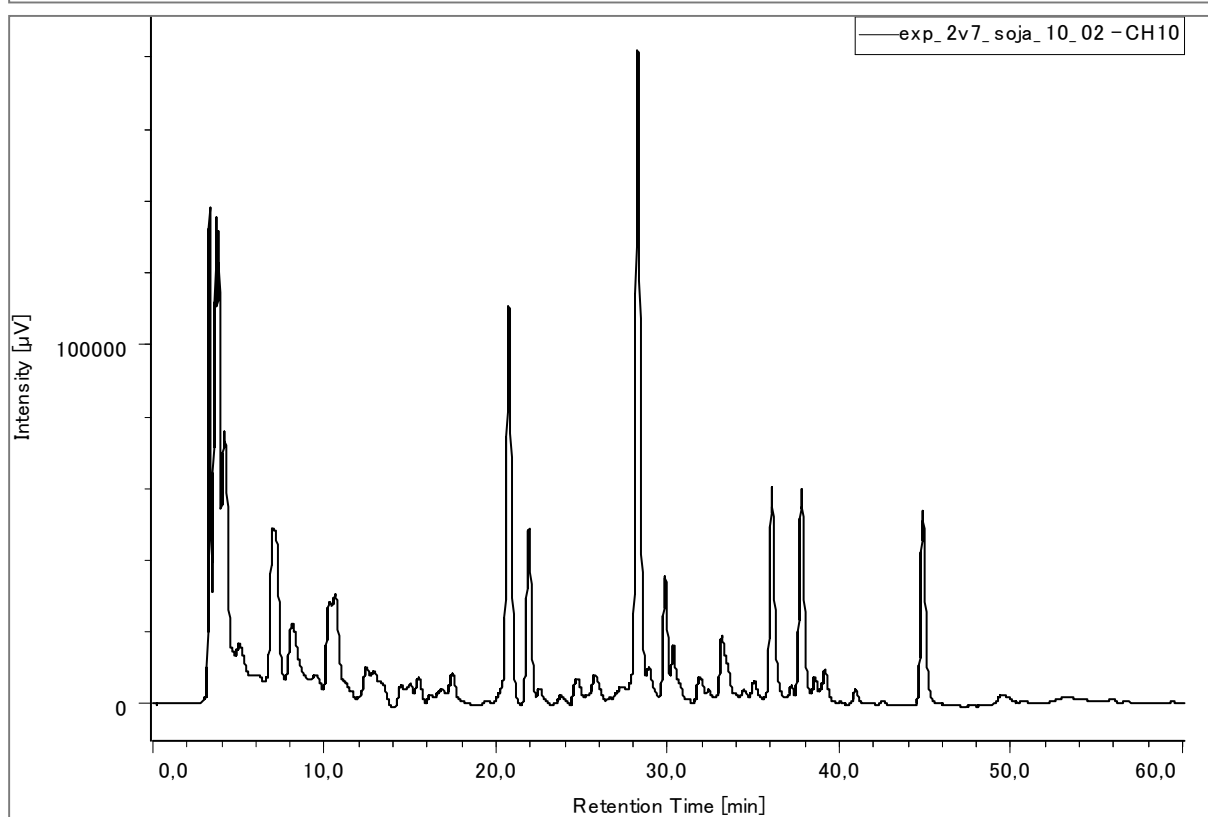
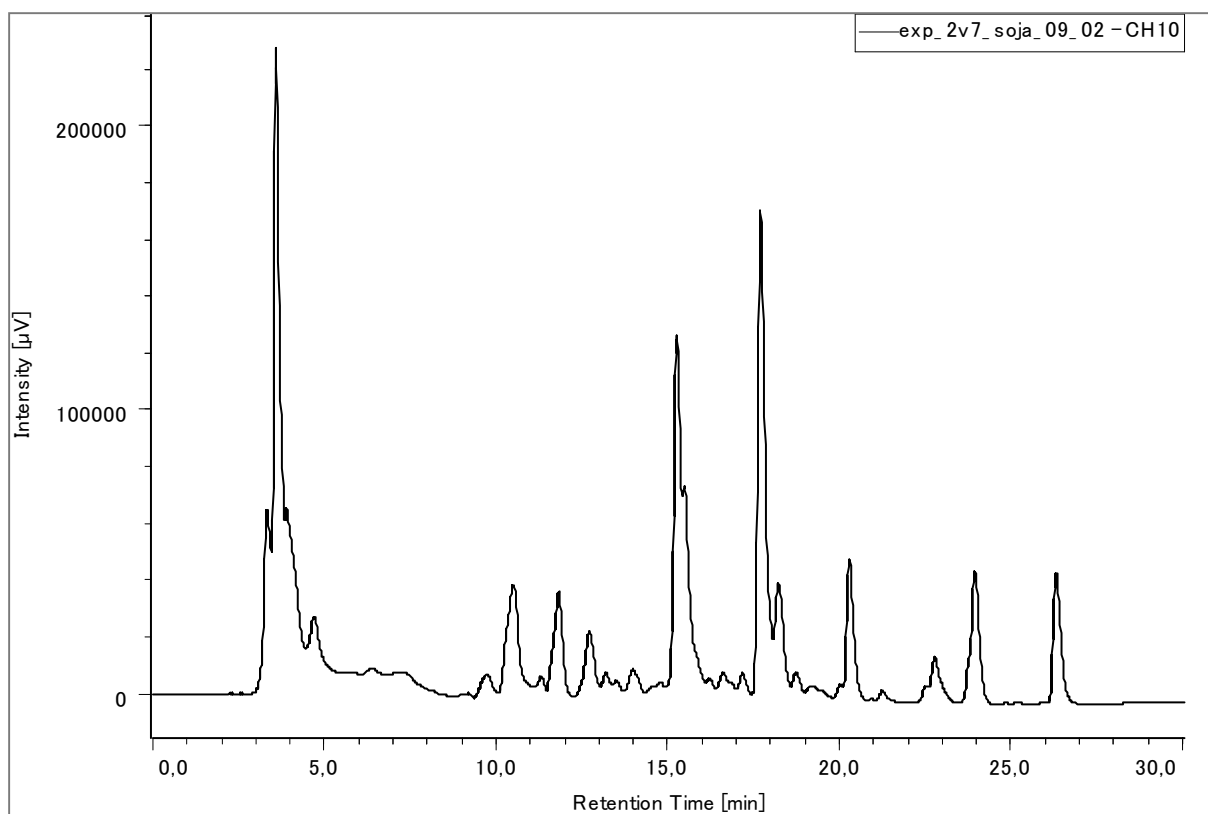
Figura S1 - Cromatogramas referentes aos experimentos 1 a 32 da etapa de triagem.

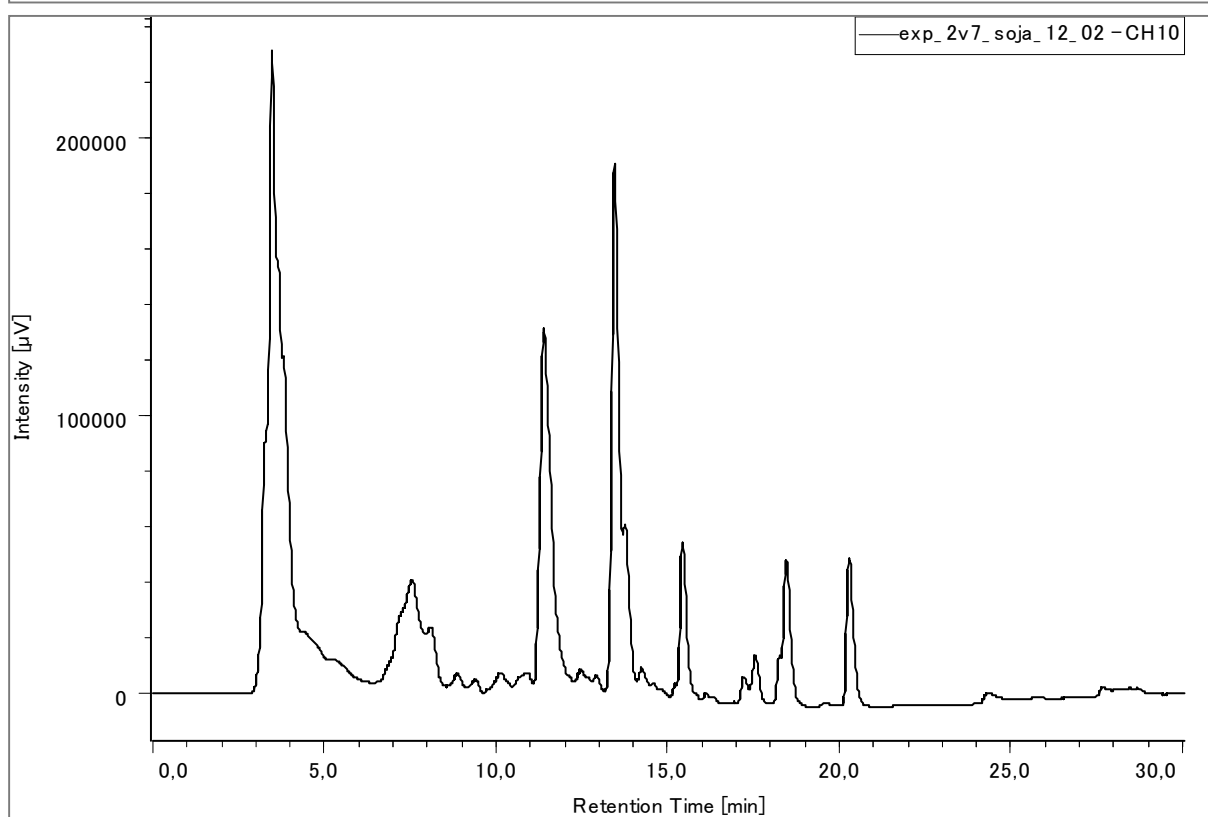
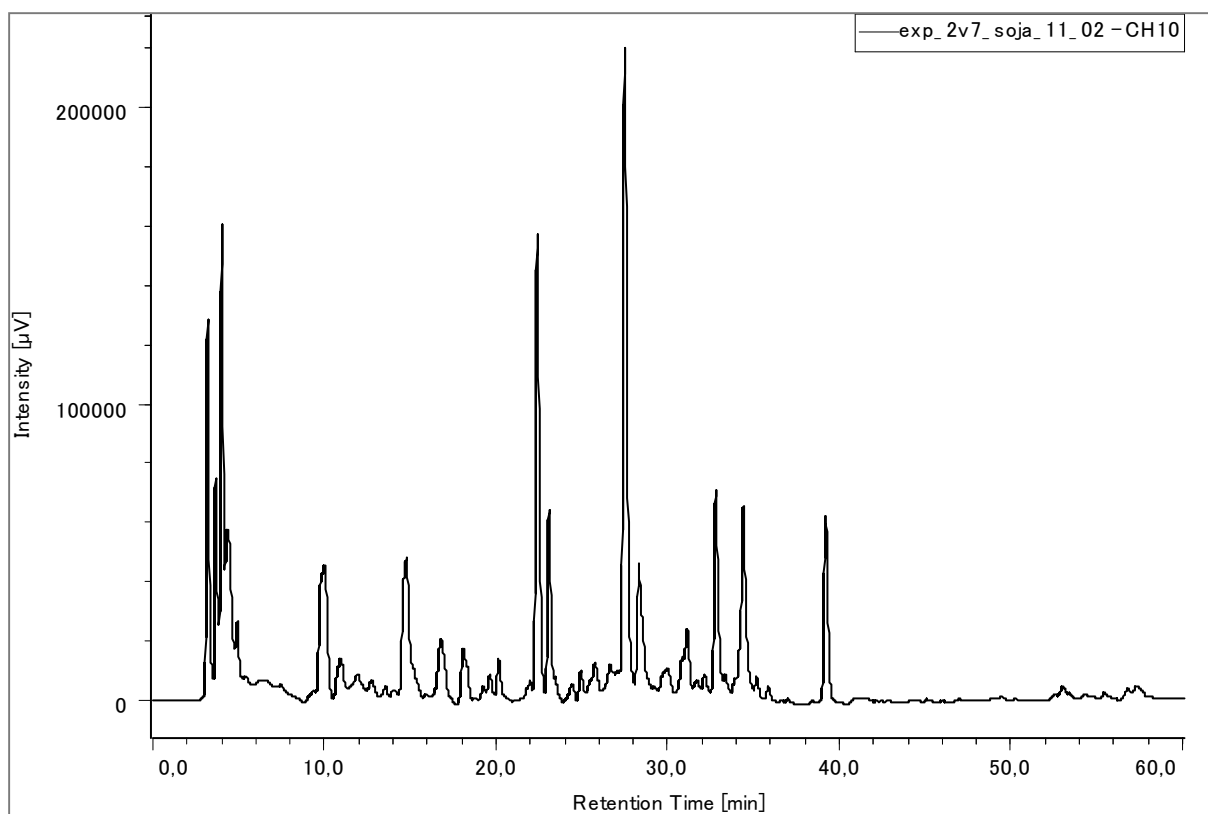


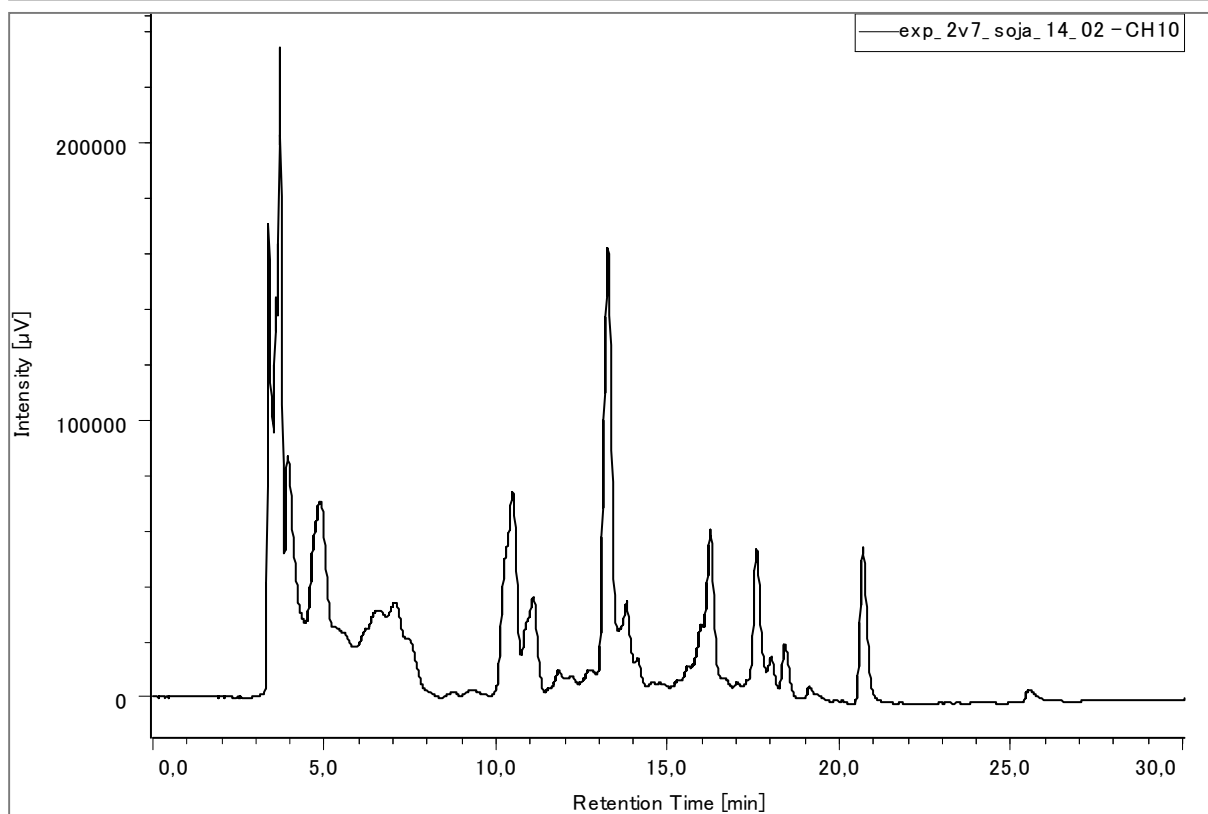
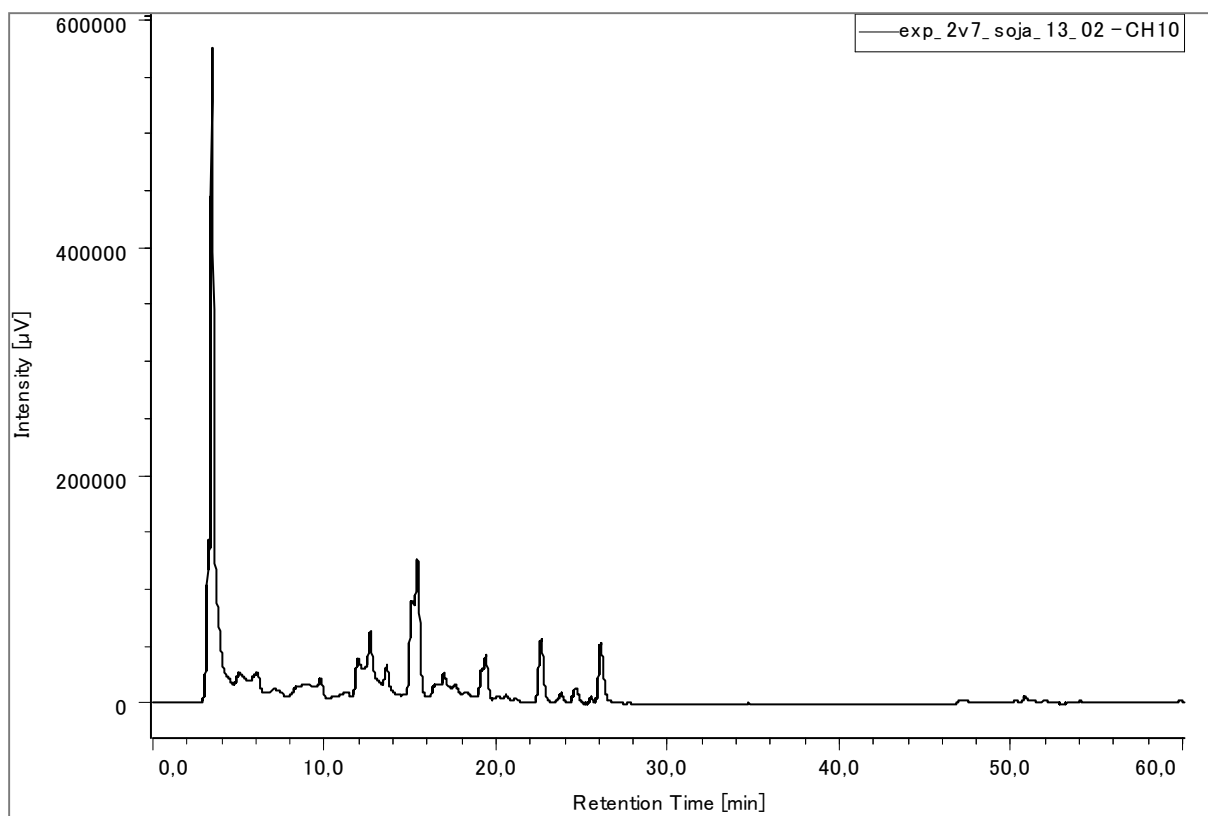


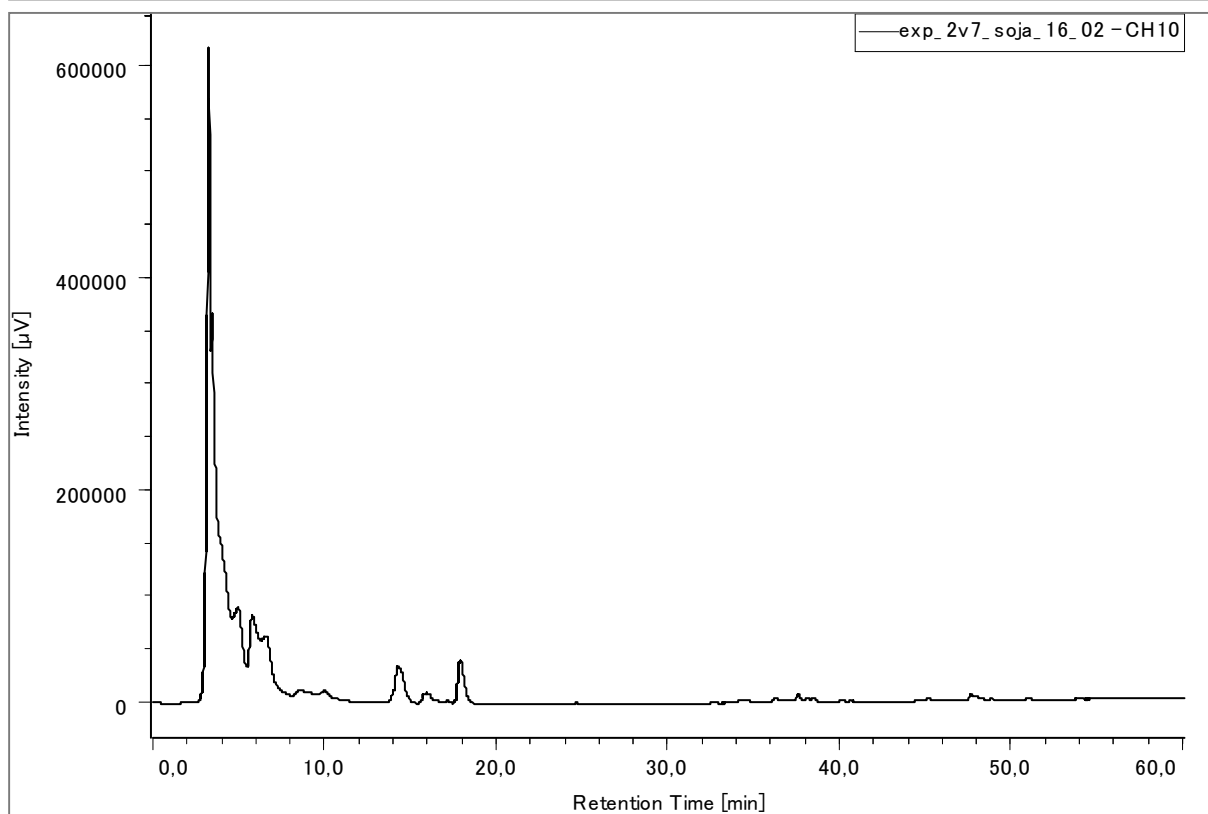
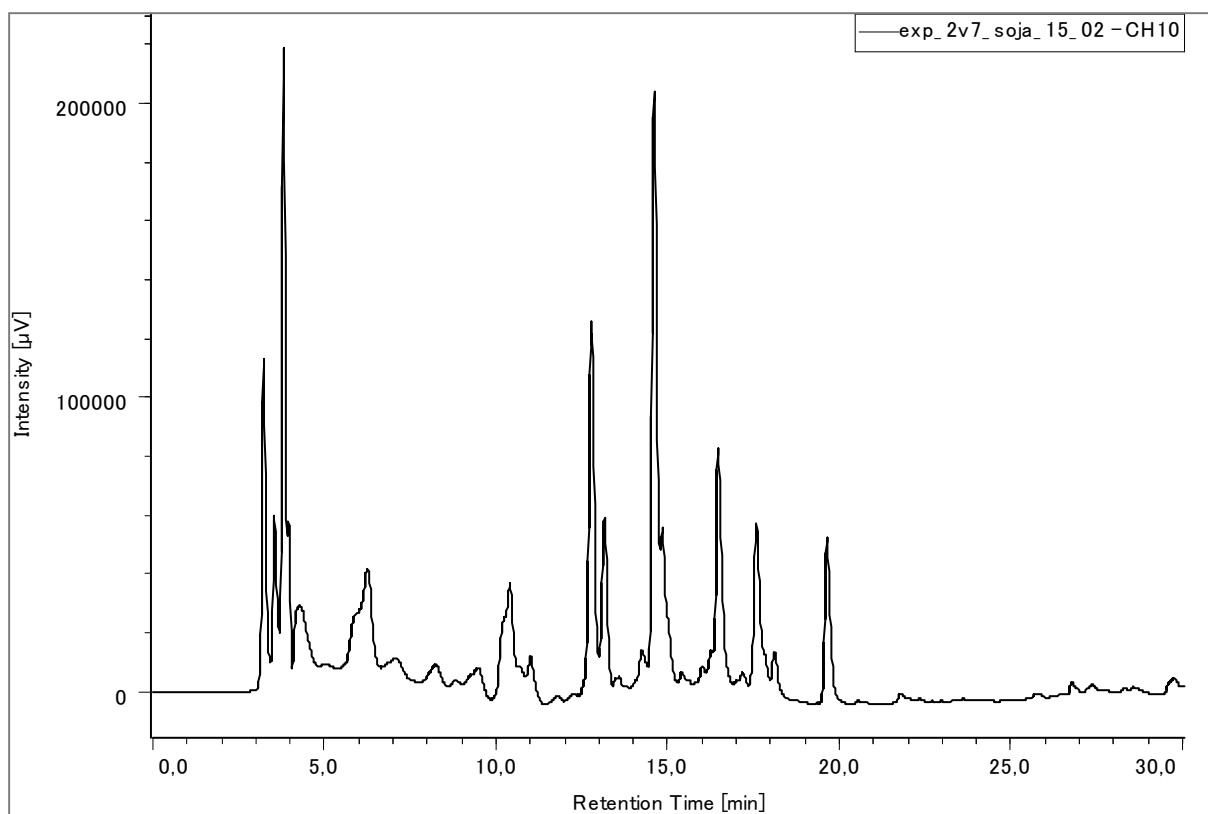


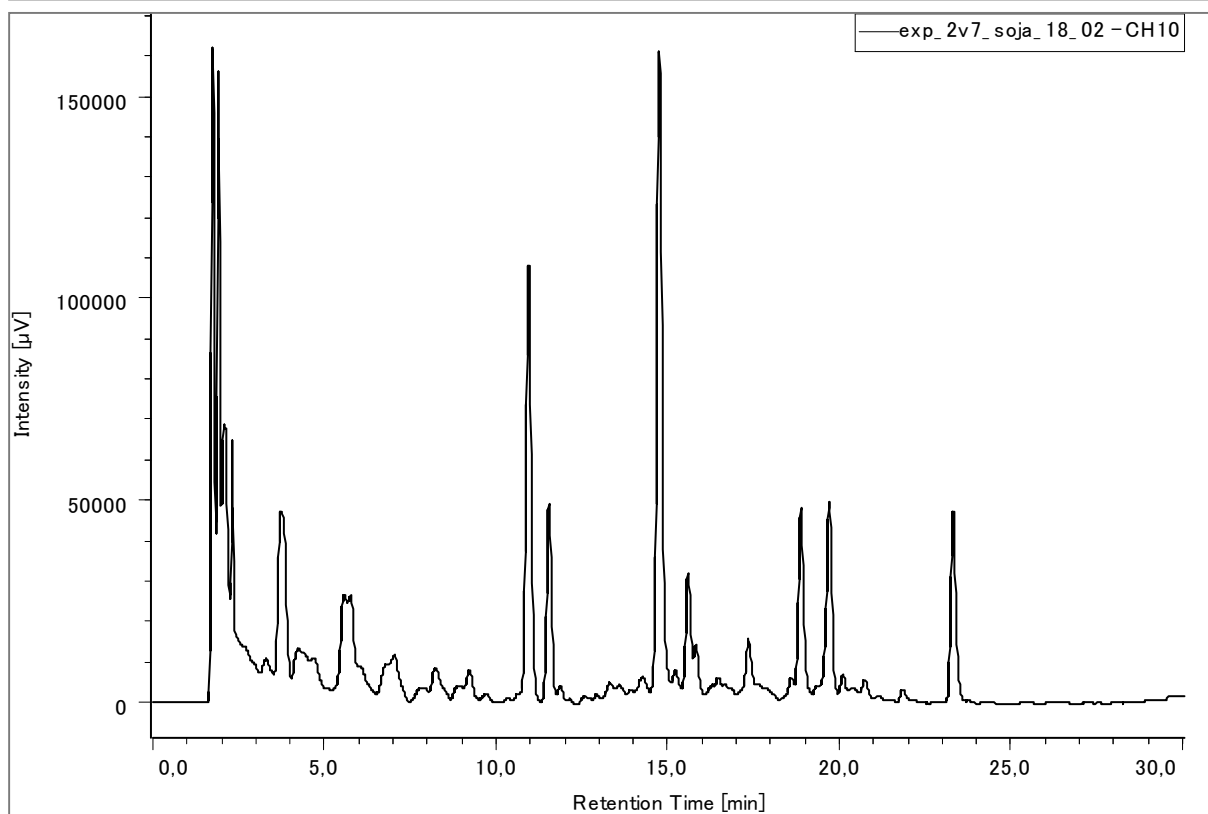
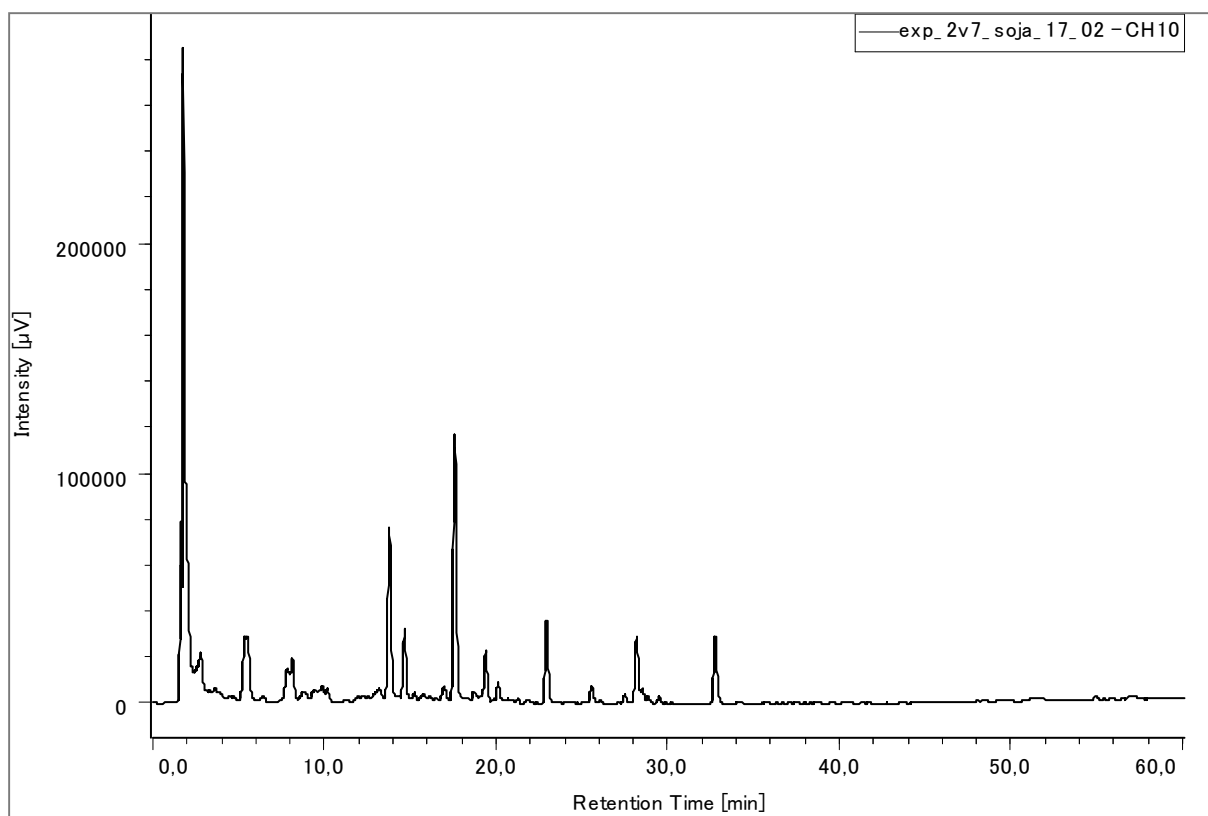


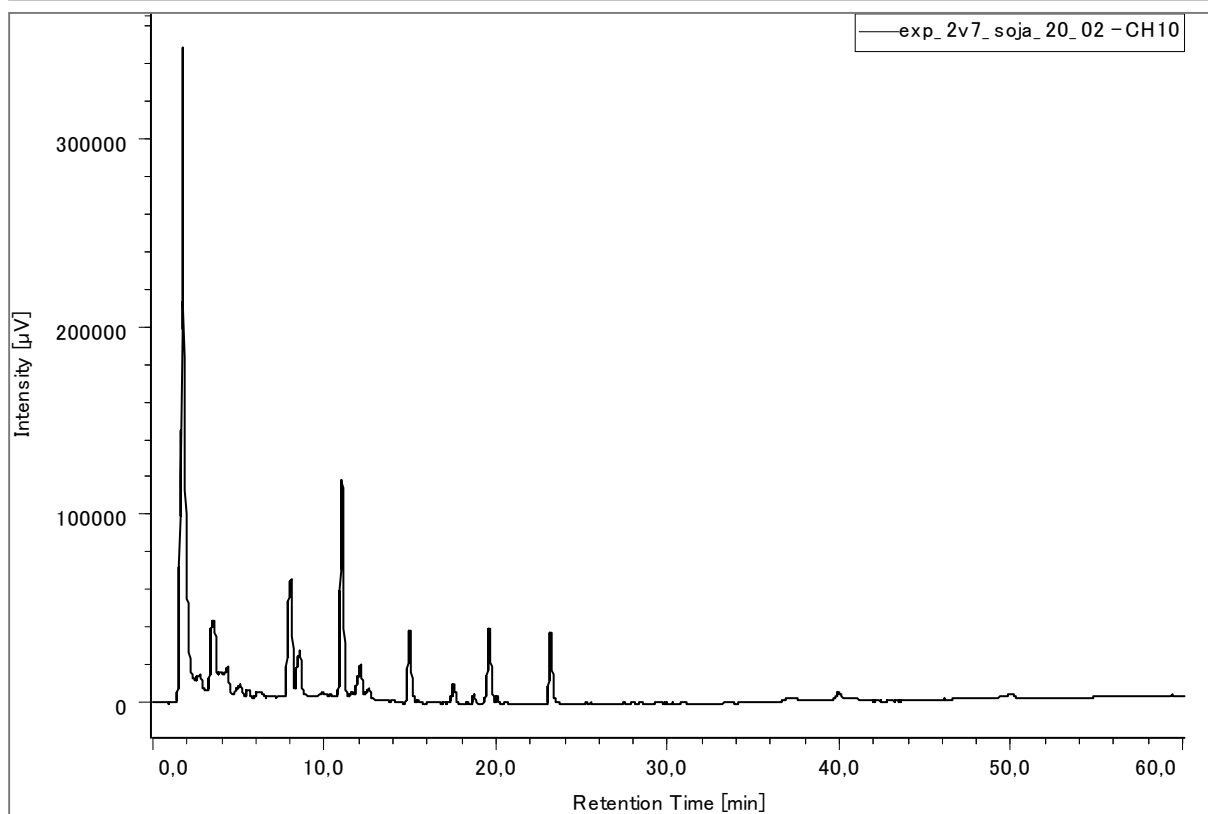
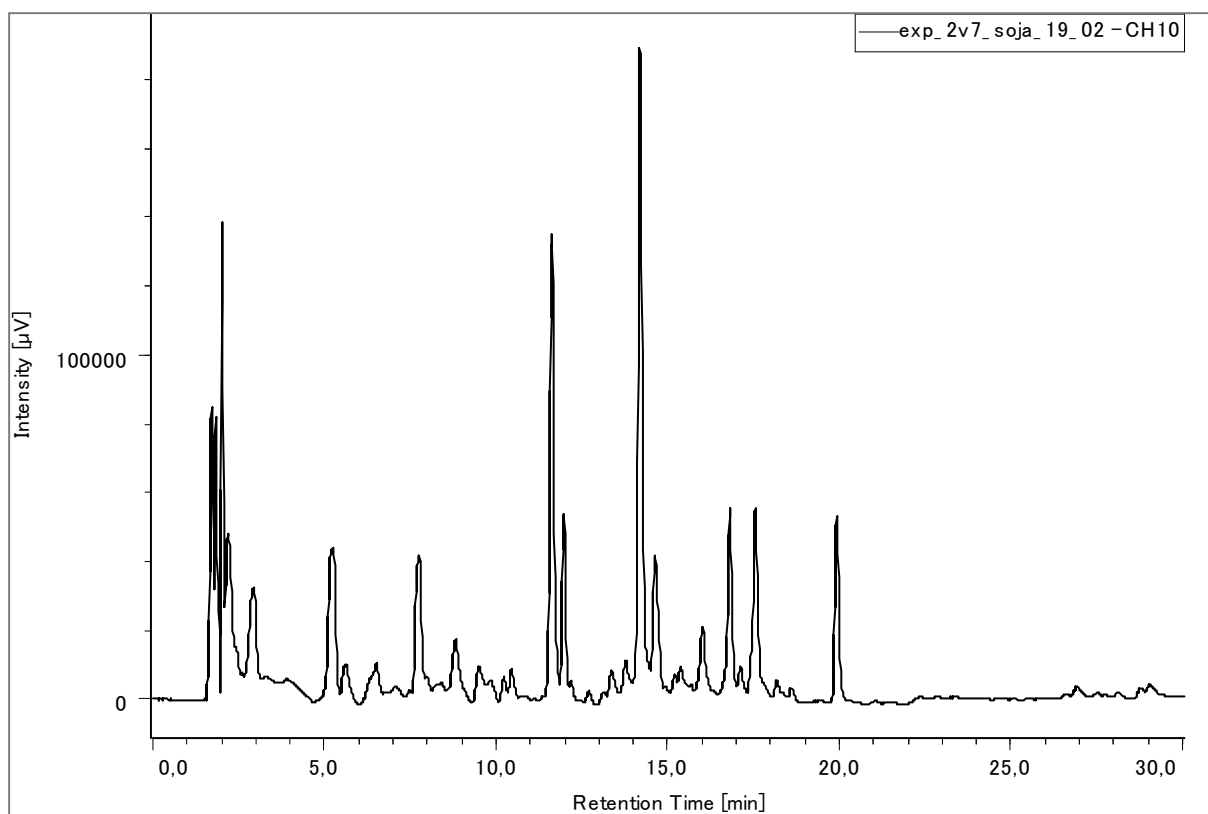


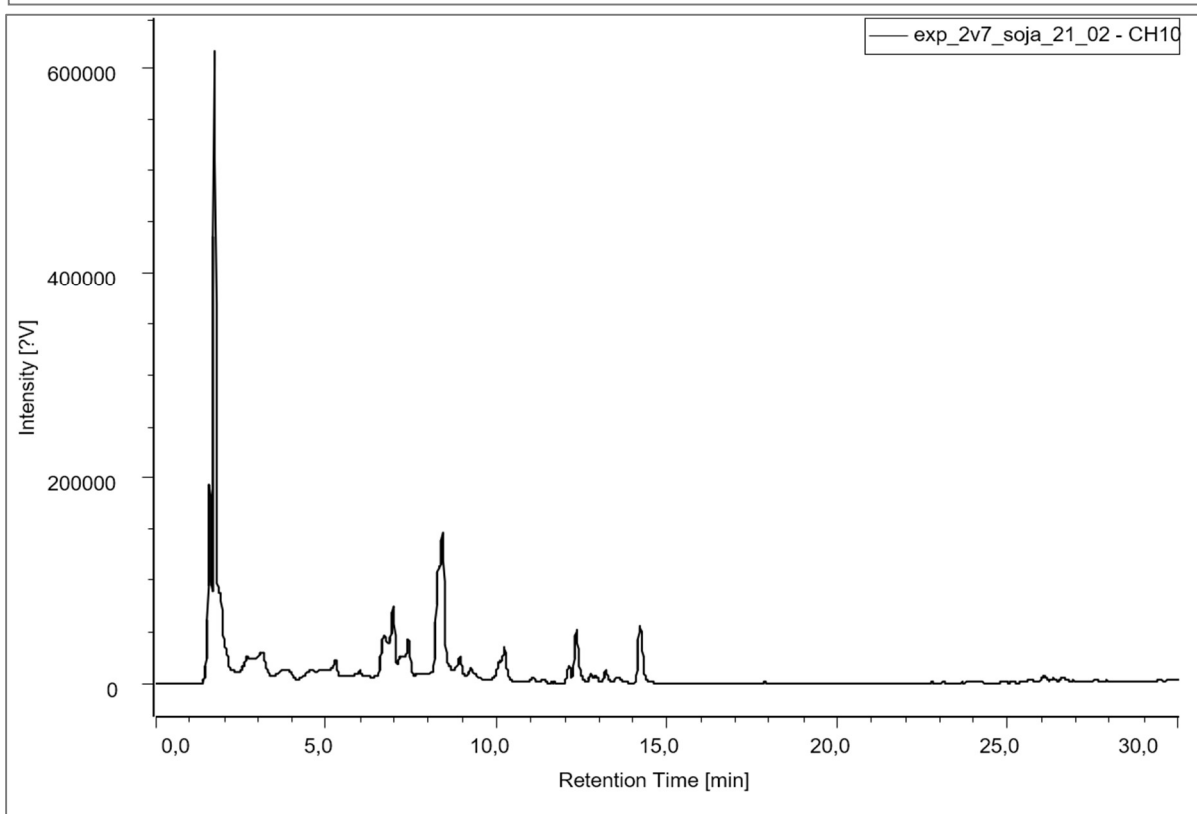
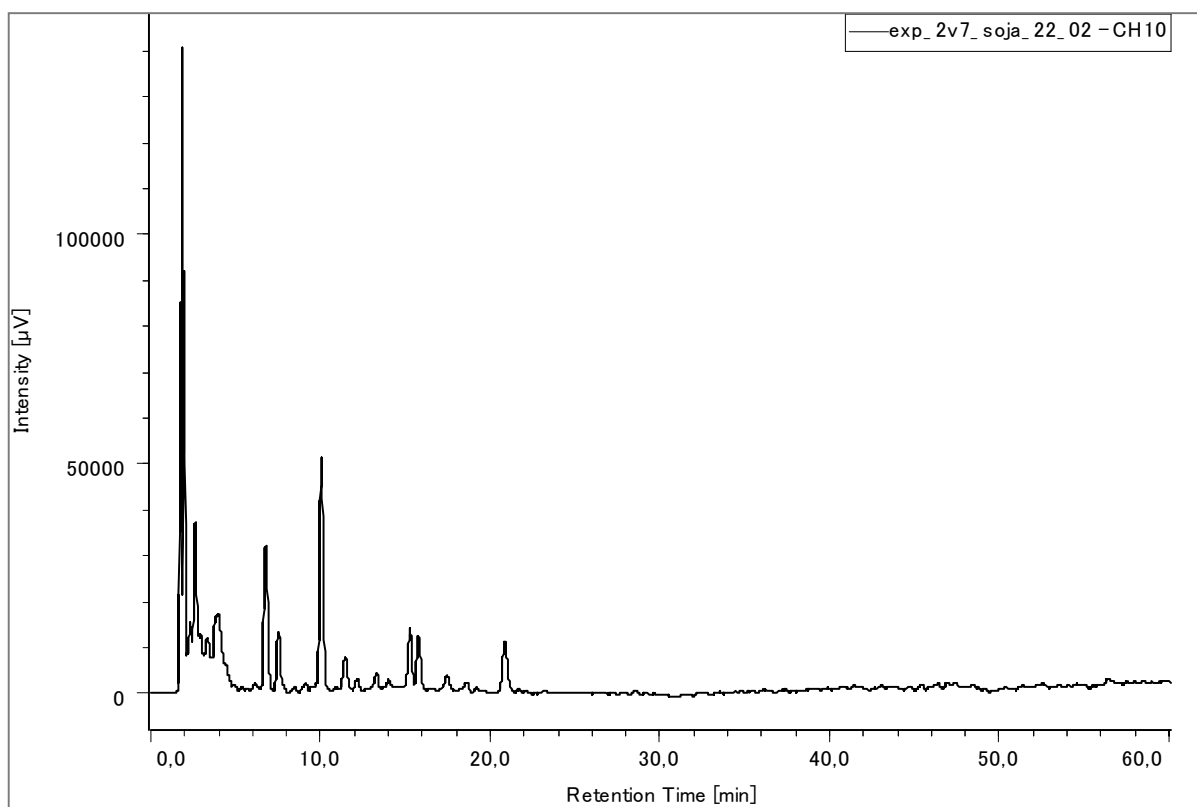


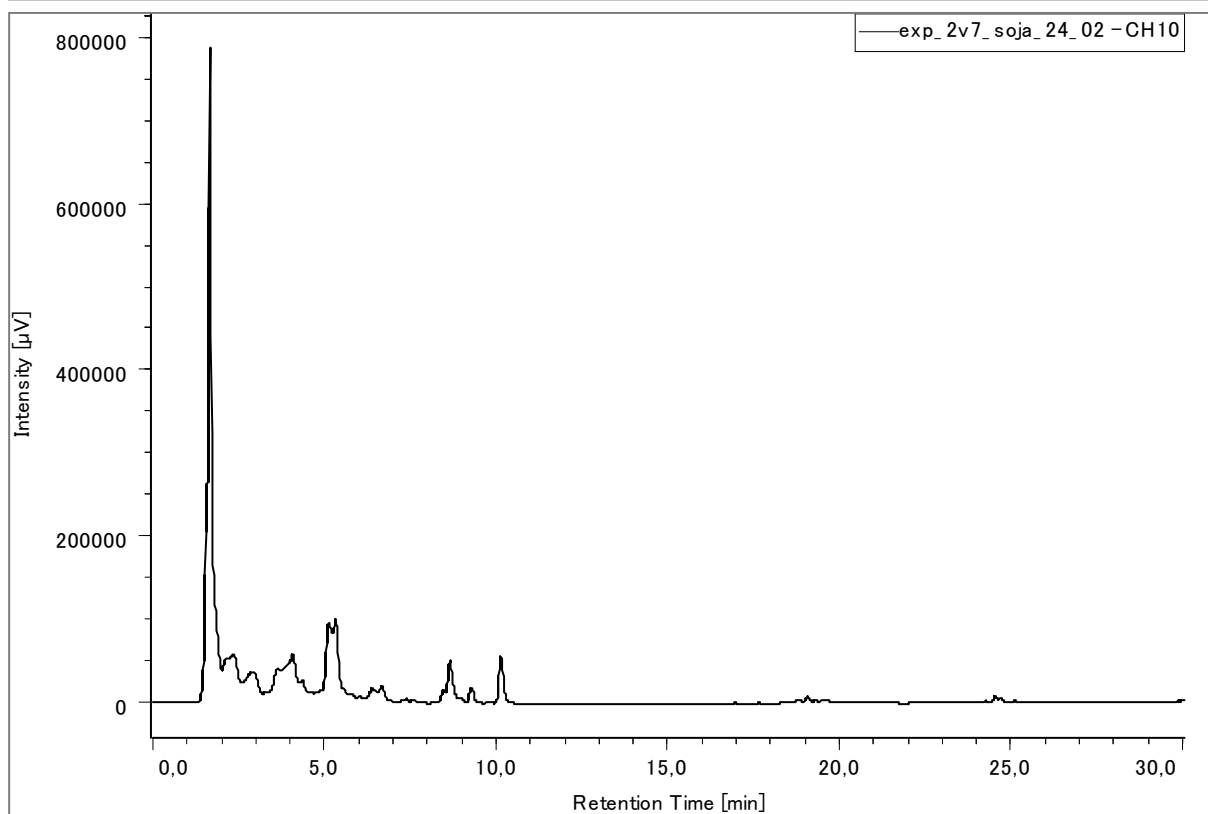
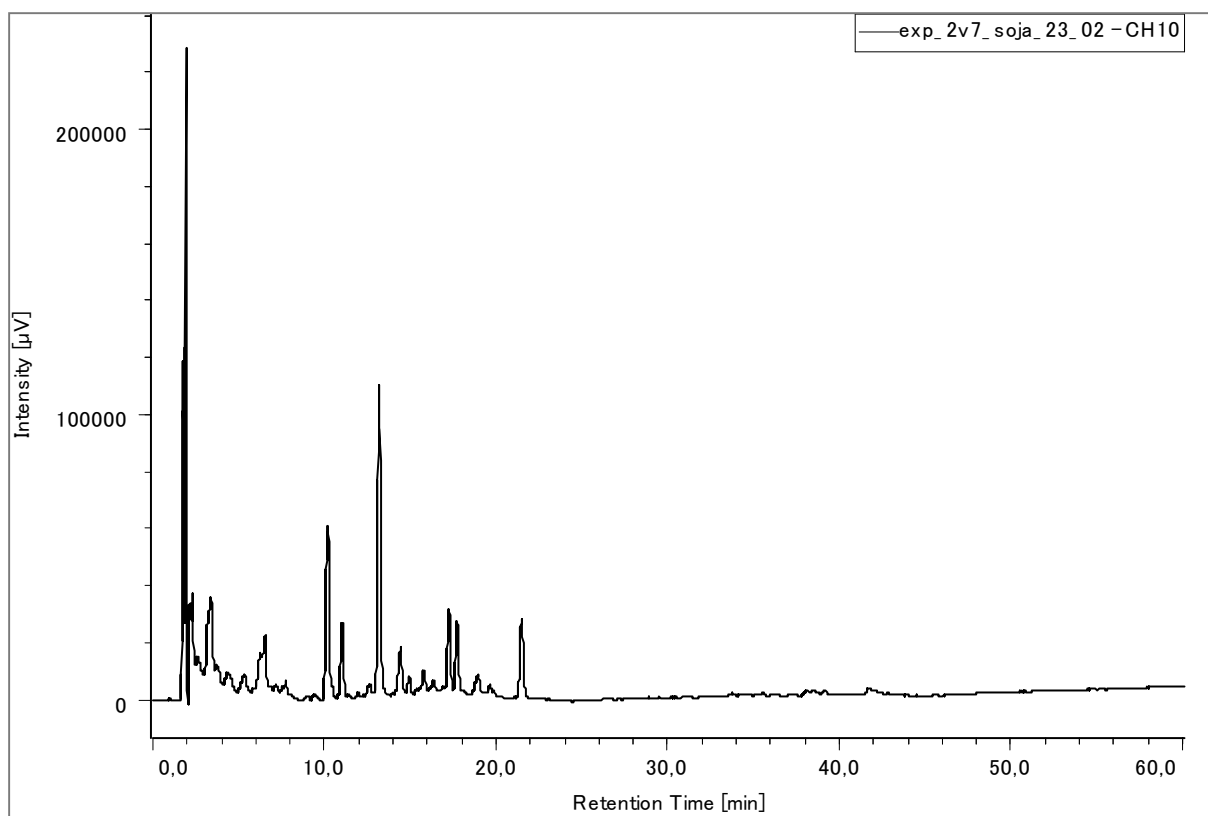


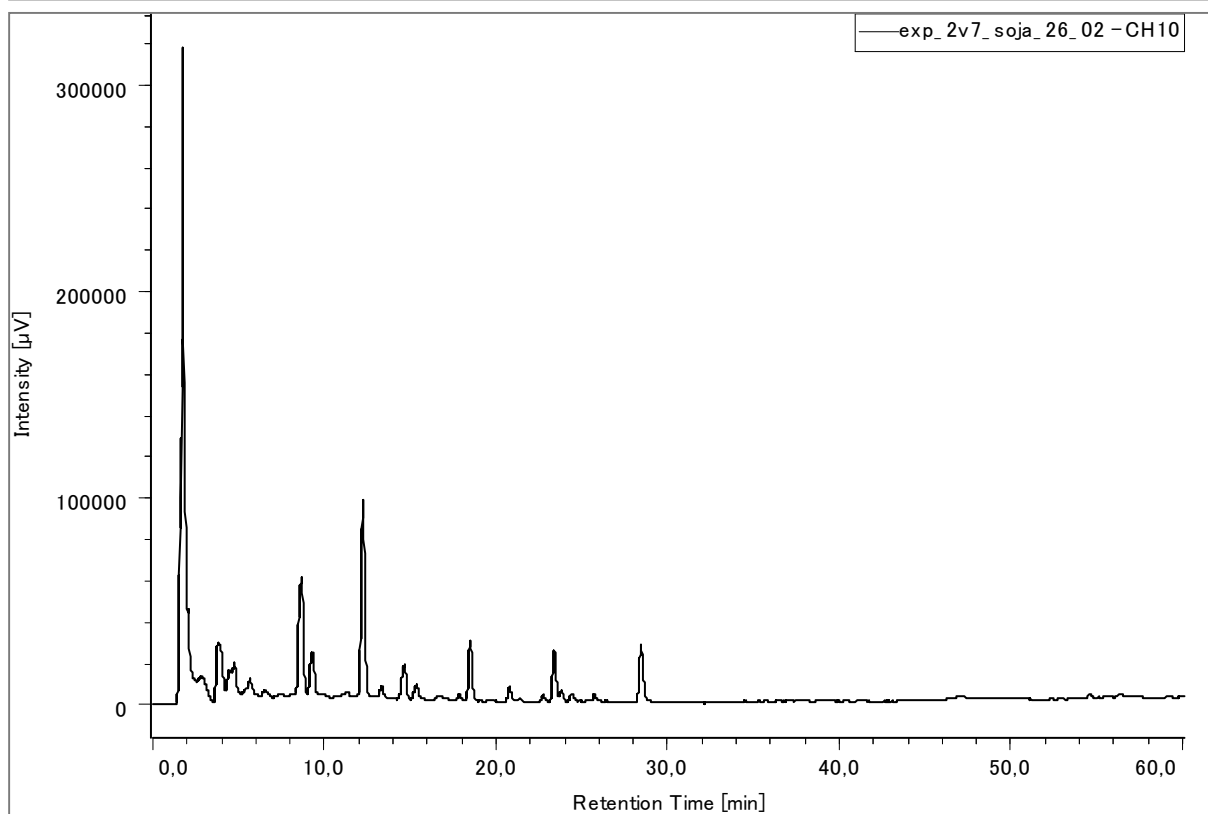
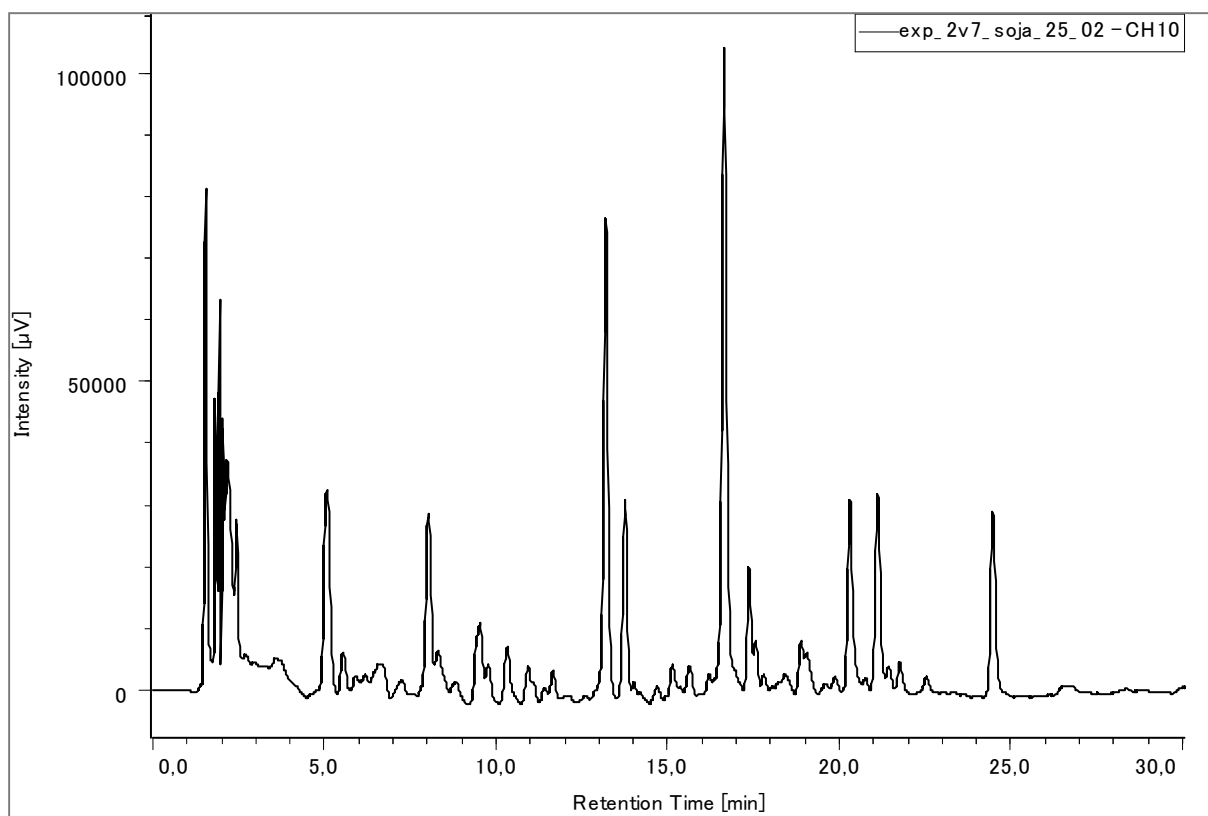


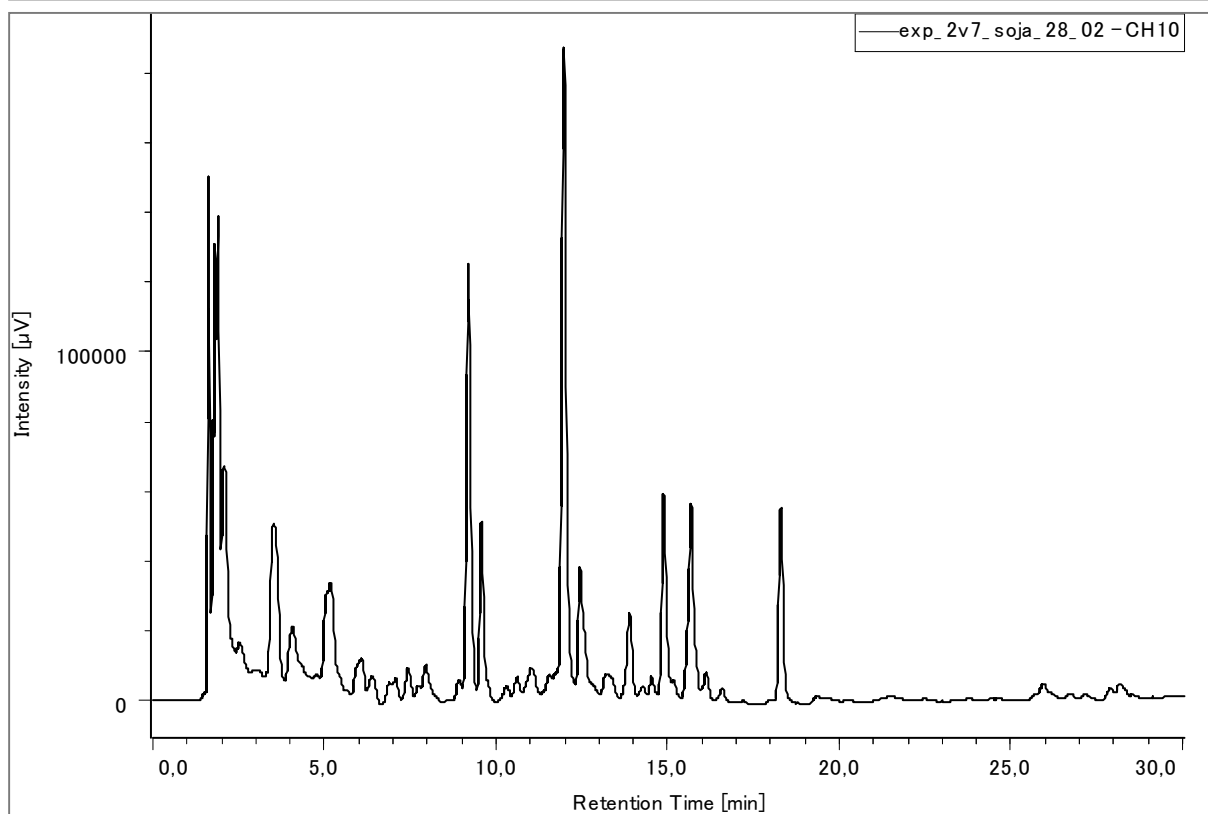
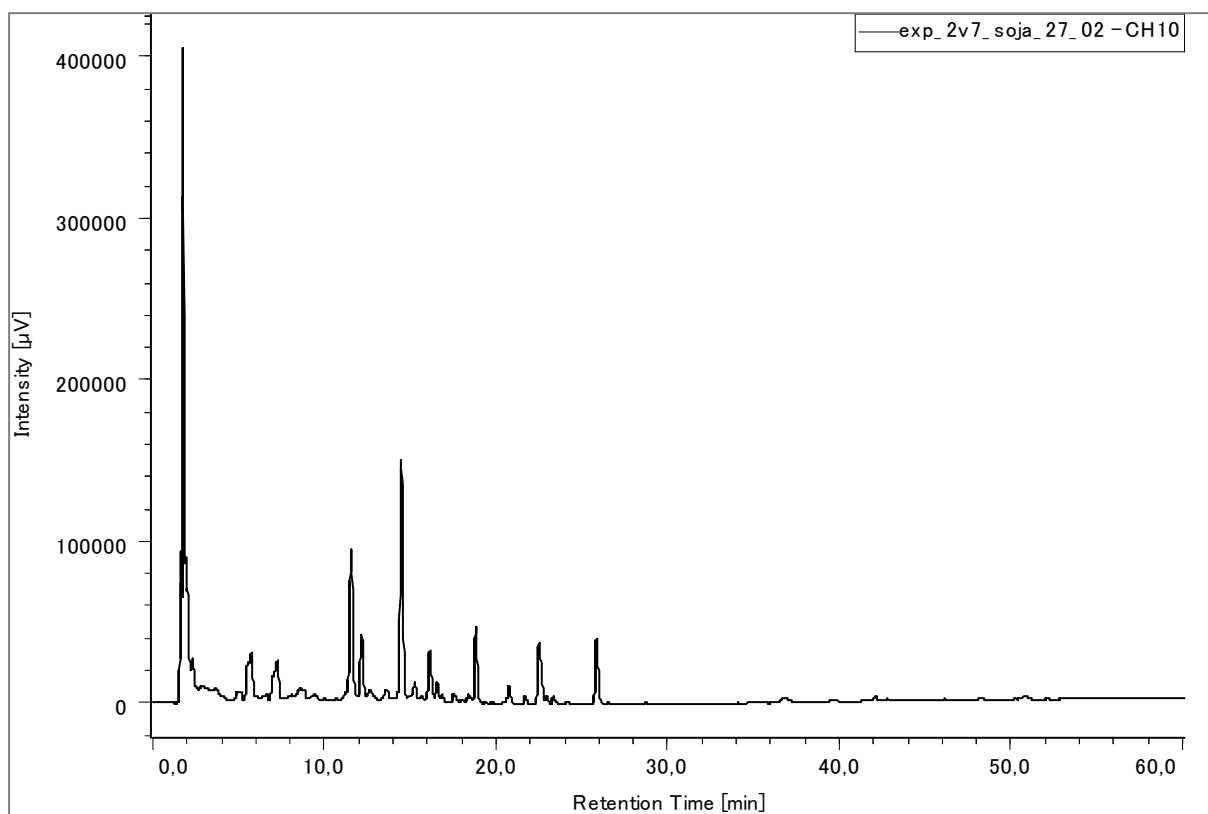


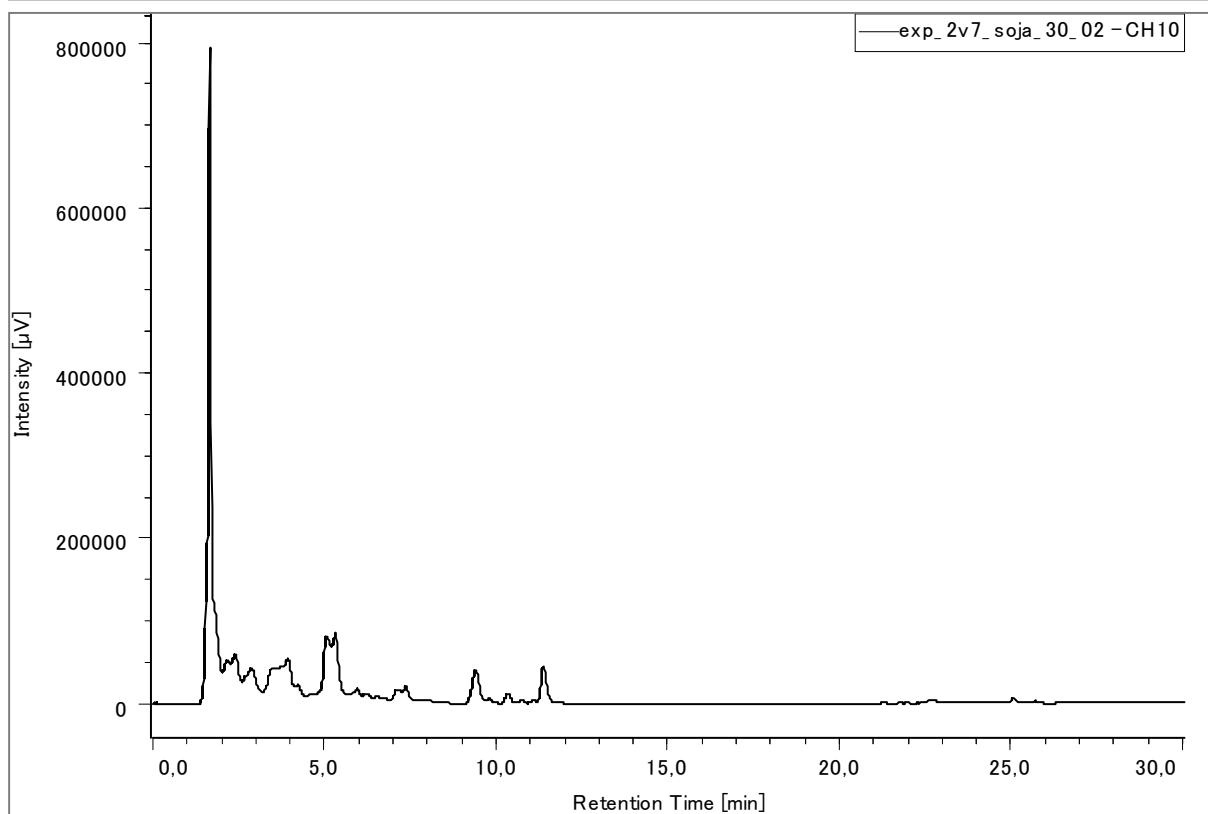
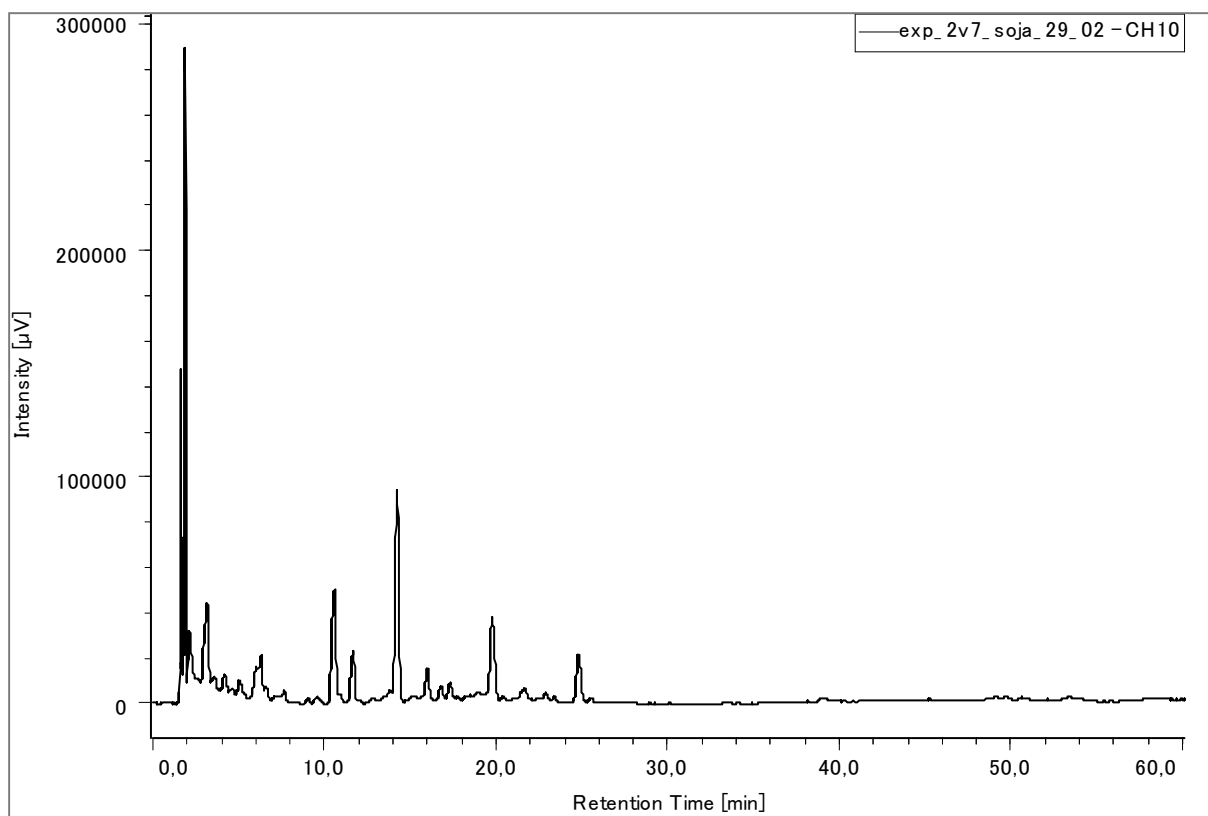












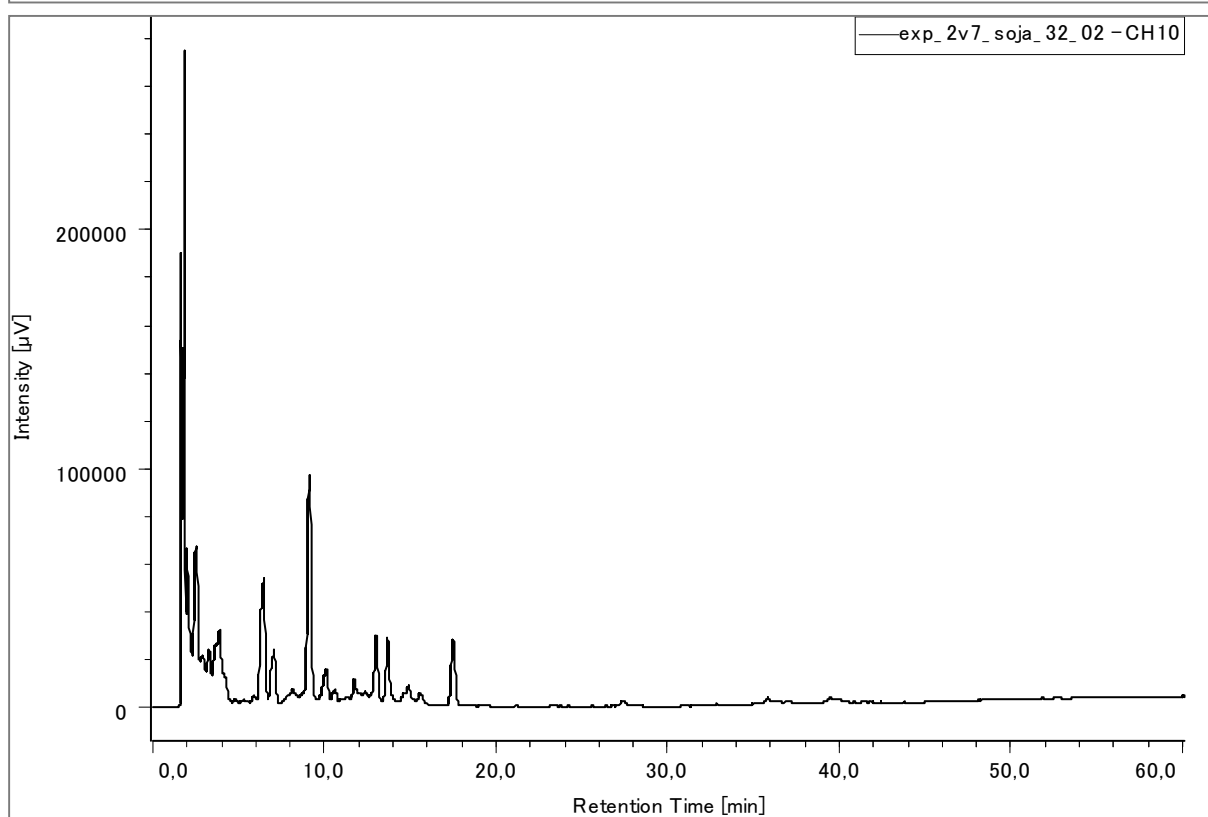
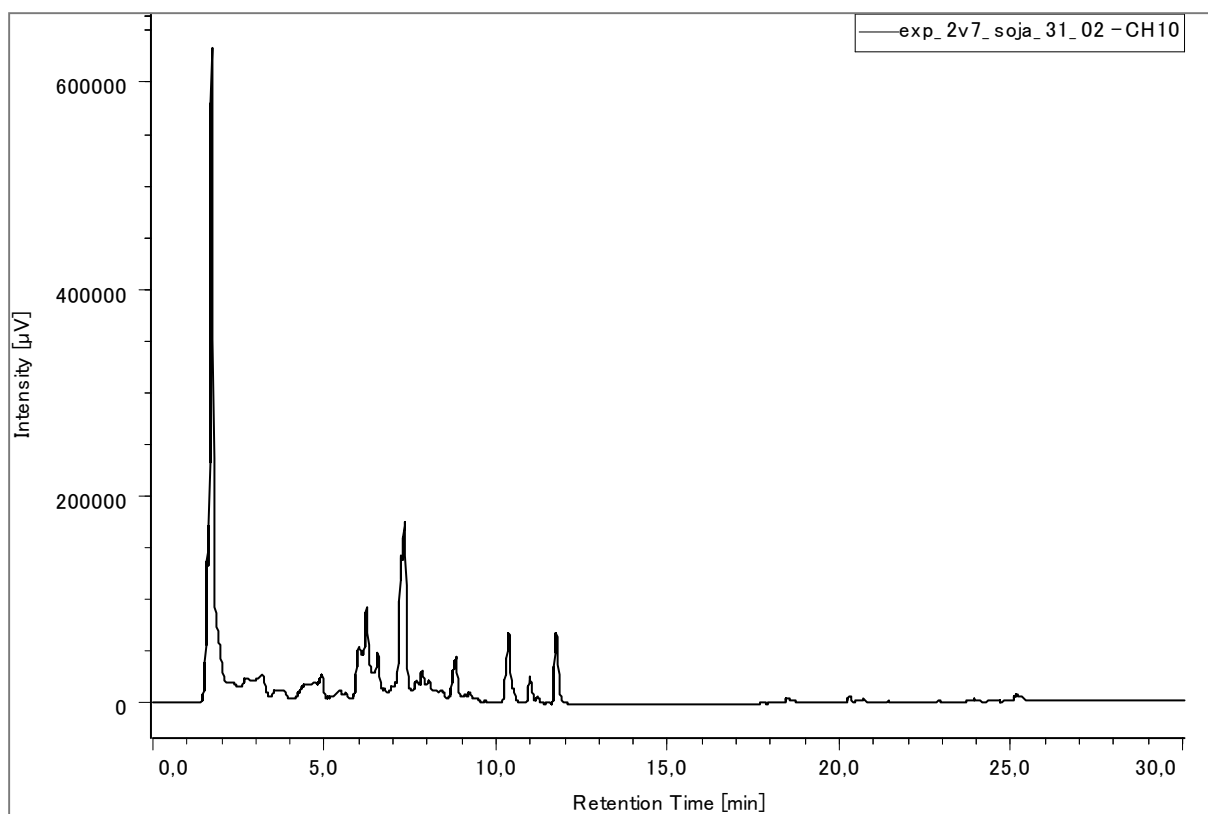


Figura S2. Espectros de massa de segunda ordem do íon precursor em m/z 195 (Ácido Glucónico).

Soja3_NEG_Grad10-55_40min#851 RT: 4.93 AV: 1 NL: 1.50E2
F: ITMS -c ESI d Full ms2 195.05@cid26.00 [50.00-210.00]

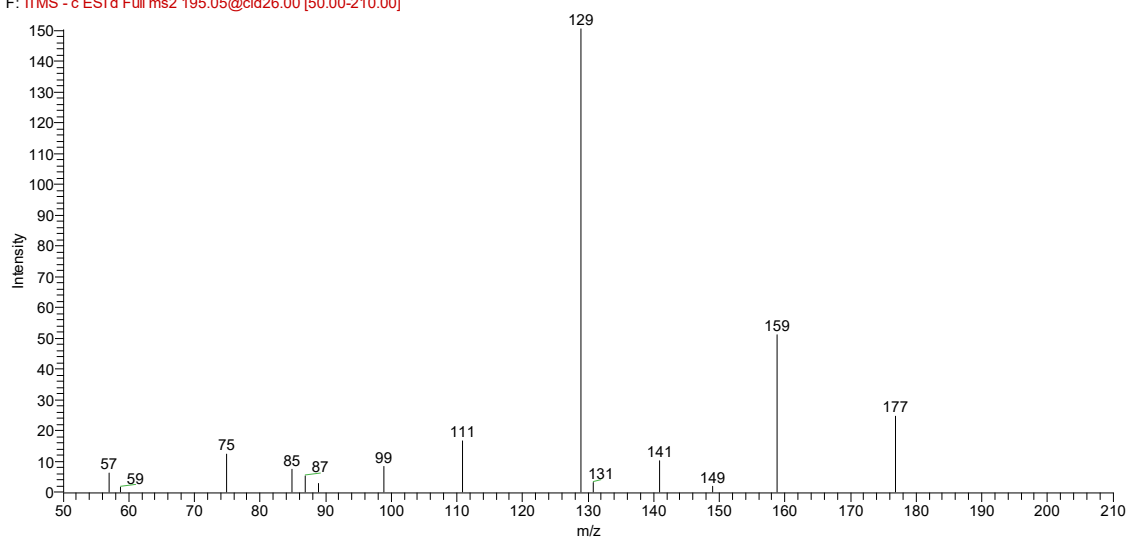


Figura S3. Espectros de massa de segunda ordem do íon precursor em m/z 191 (Ácido quínico).

Soja3_NEG_Grad10-55_40min#1061 RT: 6.30 AV: 1 NL: 3.62E2
F: ITMS -c ESI d Full ms2 190.94@cid26.00 [50.00-205.00]

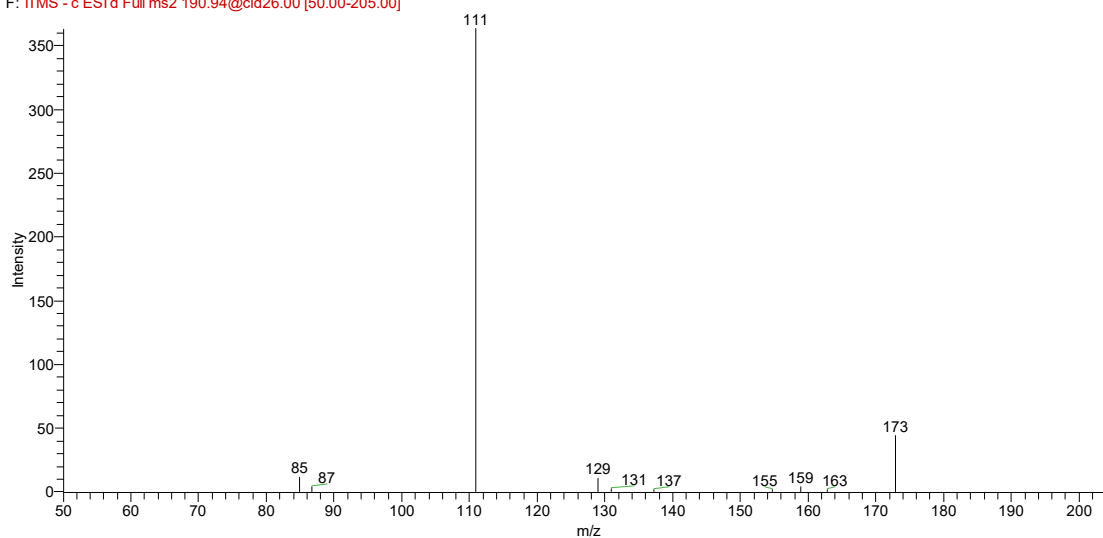
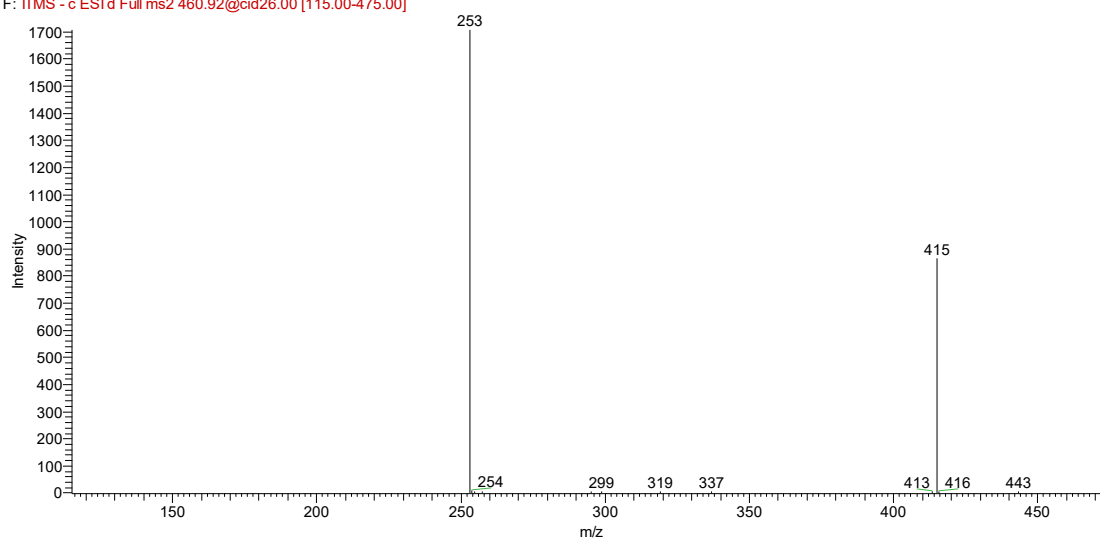


Figura S4. Espectros de massa de segunda ordem do íon precursor em m/z 415 (Daidzina).

Soja3_NEG_Grad10-55_40min#2312 RT: 14.27 AV: 1 NL: 1.70E3
F: ITMS -c ESI d Full ms2 460.92@cid26.00 [115.00-475.00]

**Figura S5.** Espectros de massa de segunda ordem do íon precursor em m/z 445 (Glicitina).

Soja3_NEG_Grad10-55_40min#2381 RT: 14.82 AV: 1 NL: 8.92E2
F: ITMS -c ESI d Full ms2 490.86@cid26.00 [125.00-505.00]

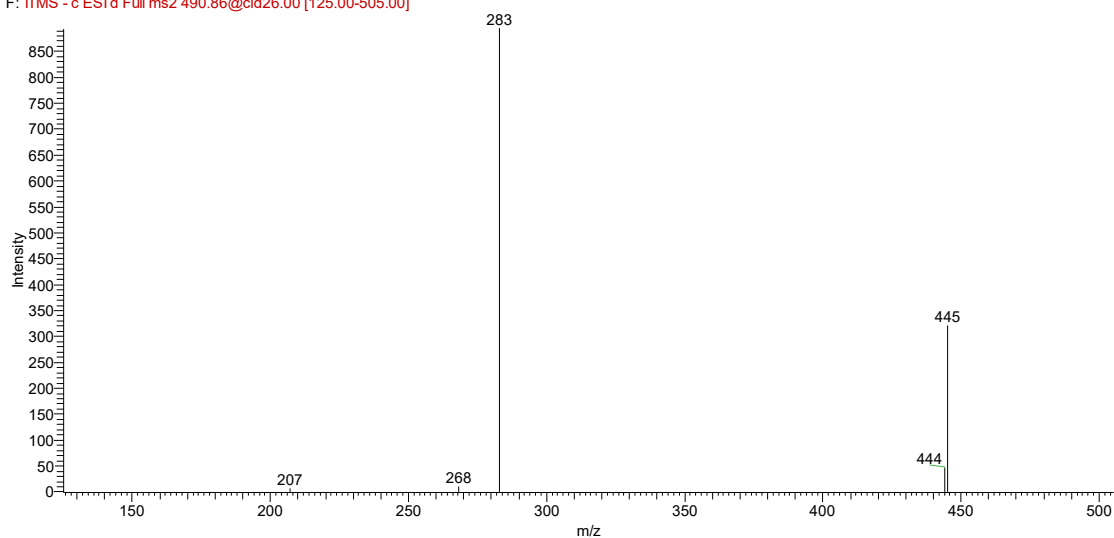


Figura S6. Espectros de massa de segunda ordem do íon precursor em m/z 431 (Genistina).

Soja3_NEG_Grad10-55_40min#3106 RT: 18.69 AV: 1 NL: 8.14E3
F: ITMS - c ESI d Full ms2 476.83@cid26.00 [120.00-490.00]

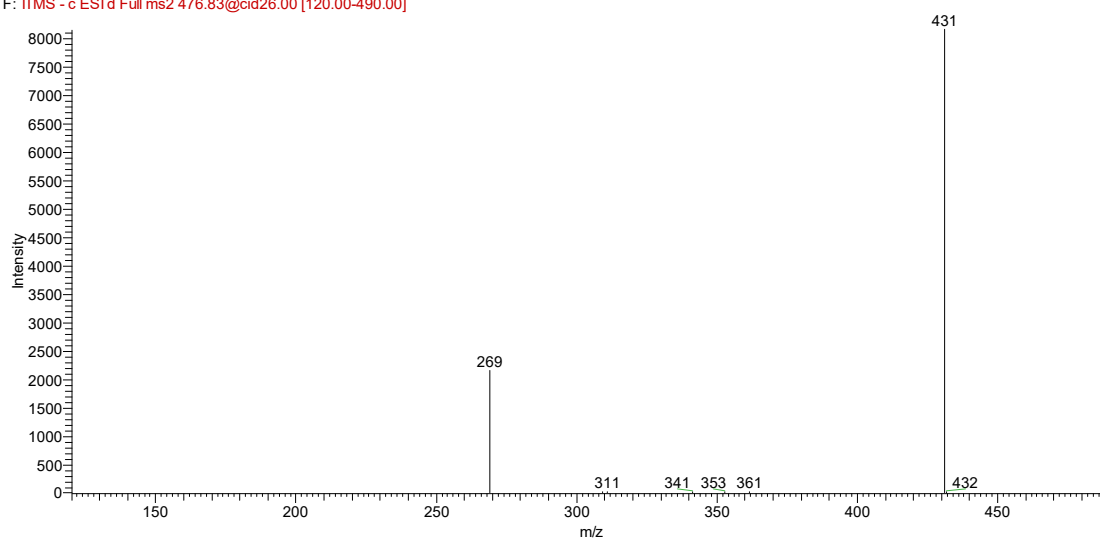


Figura S7. Espectros de massa de segunda ordem do íon precursor em m/z 473 (Acetilgenistina).

Soja3_NEG_Grad10-55_40min#3911 RT: 23.49 AV: 1 NL: 6.49E2
F: ITMS - c ESI d Full ms2 518.82@cid26.00 [130.00-530.00]

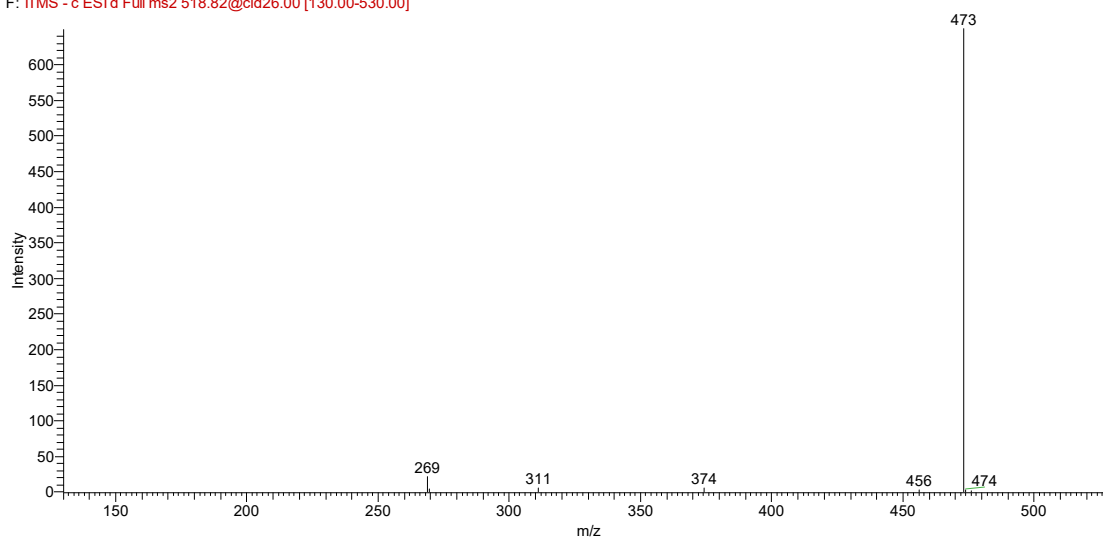
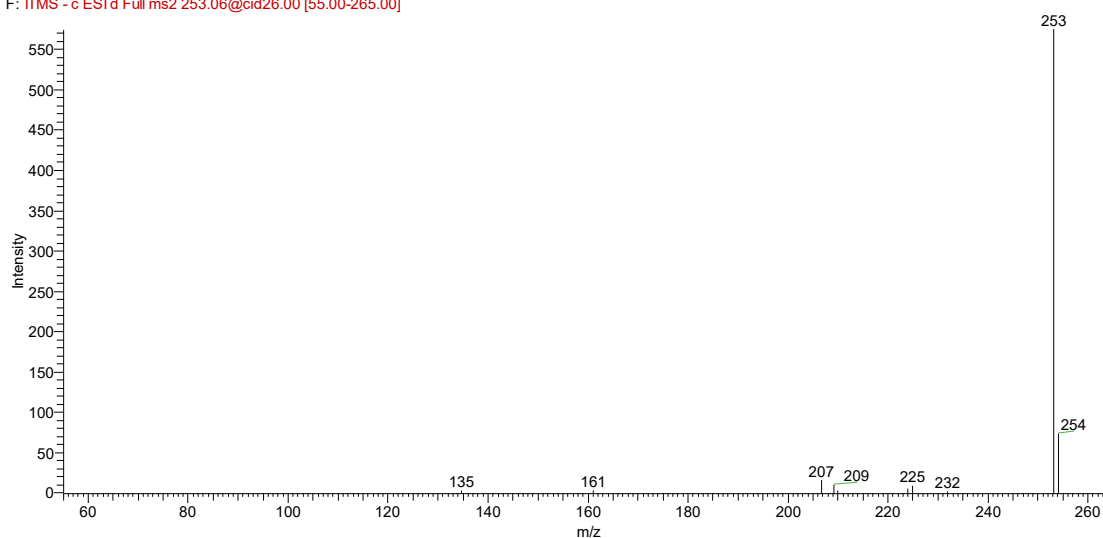


Figura S8. Espectros de massa de segunda ordem do íon precursor em m/z 253 (Daidzeína).

Soja3_NEG_Grad10-55_40min #4186 RT: 25.04 AV: 1 NL: 5.73E2
F: ITMS - c ESI d Full ms2 253.06@cid26.00 [55.00-265.00]

**Figura S9.** Espectros de massa de segunda ordem do íon precursor em m/z 269 (Genisteína)

Soja3_NEG_Grad10-55_40min #5249 RT: 31.31 AV: 1 NL: 7.88E2
F: ITMS - c ESI d Full ms2 269.08@cid26.00 [60.00-280.00]

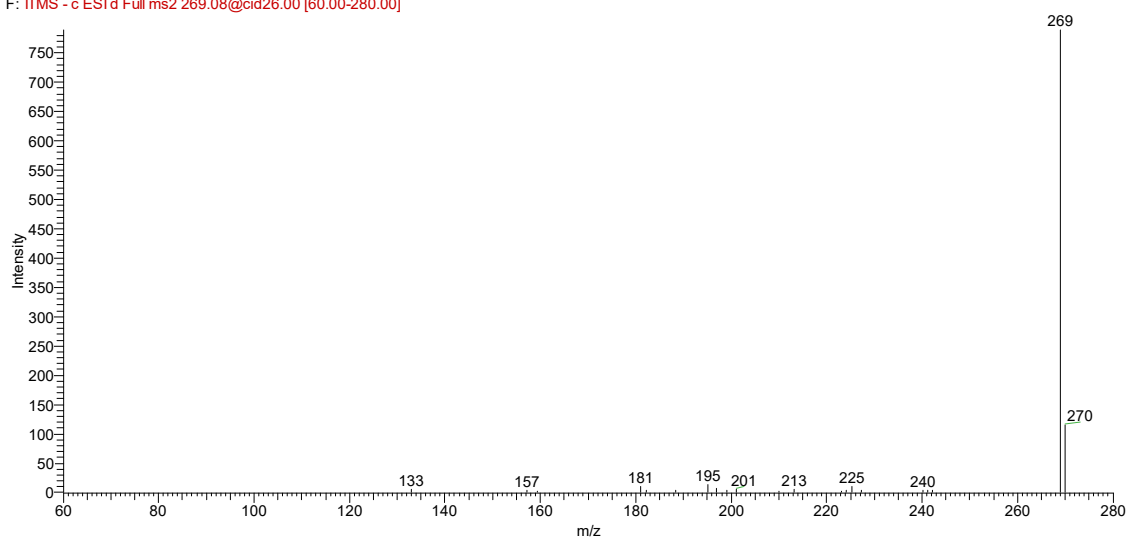


Figura S10. Espectros de FTIR 2D dos gases liberados durante a decomposição térmica das amostras.

