UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

GABRIELA CREMASCO

METODOLOGIA SUSTENTÁVEL E BIOMIMÉTICA PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DE ALTO VALOR AGREGADO EM RESÍDUOS AGRÍCOLAS DE AMÊNDOA

ARARAQUARA

2024

Gabriela Cremasco

Metodologia sustentável e biomimética para extração de compostos de alto valor agregado em resíduos agrícolas de amêndoa

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Daniel Rinaldo

Araraquara

2024

C915m

Cremasco, Gabriela
Metodologia sustentável e biomimética para extração de compostos de alto valor agregado em resíduos agrícolas de amêndoa / Gabriela Cremasco. -- Araraquara, 2024
73 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Daniel Rinaldo

1. Extração (Química). 2. Taninos. 3. Química verde. 4. Planejamento experimental. 5. Sustentabilidade. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A utilização de resíduos agrícolas alinhada aos princípios da Química Verde desempenha um papel crucial na busca por soluções sustentáveis. Uma abordagem voltada para a minimização do impacto ambiental nas atividades químicas, representa uma ótica integrada e holística para enfrentar desafios ambientais, sociais e econômicos.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The use of agricultural waste in accordance with the principles of Green Chemistry plays a crucial role in the search for sustainable solutions. An approach aimed at minimizing the environmental impact of chemical activities represents an integrated and holistic approach to facing environmental, social and economic challenges.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Desenvolvimento de metodologia sustentável e biomimética para extração e análise de compostos de alto valor agregado em resíduos agrícolas de amêndoa"

AUTORA: GABRIELA CREMASCO

ORIENTADOR: DANIEL RINALDO

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

gov.br
Documento assinado digitalmente
DANIEL RINALDO
Data: 23/02/2024 13:27:19-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. DANIEL RINALDO (Participaçao Virtual)
Departamento de Quimica / Faculdade de Ciencias - Unesp - Bauru

Profa. Dra. KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA (Participaçao Virtual)
Departamento de Engenharia, Fisica e Matematica / Instituto de Quimica - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. CLAUDIA QUINTINO DA ROCHA (Participaçao Virtual)
Departamento de Química / Universidade Federal do Maranhão - UFMA - São Luís

Araraquara, 23 de fevereiro de 2024

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Gabriela Cremasco

Nome em citações bibliográficas: CREMASCO, G; CREMASCO, GABRIELA

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Bacharel em química ambiental e tecnológica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Bauru – SP, concluído em 2022.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

01. Estágio docência 2022: Disciplina de Orgânica II, curso de Química, Faculdade de Ciências, UNESP, Câmpus Bauru

02. Estágio docência 2023: Disciplina de Orgânica II, curso de Química, Faculdade de Ciências, UNESP, Câmpus Bauru

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos para submissão

01. Cremasco, G.; Sutton,A; Funari, C. S.; Arrua, D.; Dussán, K. J; Hilder, E. F.; Bolzani, V. da S.; Rinaldo, D. Development of sustainable and biomimetic methodology for extraction and analysis of high value-added compounds in almond hulls. Artigo em processo final de revisão da língua inglesa para submissão a revista Sustainable Chemistry and Pharmacy. Anexado em outros documentos.

02. Ranzeti, M. T. F.; Cremasco, G.; Bueno, V. H.; Rinaldo, D. Método cromatográfico verde para determinação de compostos de interesse industrial em resíduos de laranja. Artigo em processo final de revisão para submissão a revista Química Nova.Anexado em outros documentos.

Apresentações de trabalho

01. CREMASCO, G.; Sutton, A ; FUNARI, C. S. ; ARRUA, D. ; HILDER, E. F. ; DUSSÁN, K. J.; BOLZANI, V. S. ; RINALDO, D. . Green extraction of compounds from Prunus dulcis residues. Apresentação oral e em forma de pôster na 46a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, maio de 2023.

02. CREMASCO, G.; Sutton, A ; FUNARI, C. S. ; ARRUA, D. ; HILDER, E. F. ; DUSSÁN, K. J.; BOLZANI, V. S. ; RINALDO, D. . Sustainable method for extracting fenolic compounds from almond hull. Apresentação de pôster na Brazil-Spain Workshop On Organic Chemistry 7th Edition, julho 2023.

03. RANZETI, M. T. F. ; CREMASCO, G. ; RINALDO, D. . Development of a green chromatography method for the determination of compounds by industrial interest in orange residues. Apresentação de pôster na Brazil-Spain Workshop On Organic Chemistry 7th Edition, julho 2023.

04. CREMASCO, G.; Sutton, A ; FUNARI, C. S. ; ARRUA, D. ; HILDER, E. F. ; DUSSÁN, K. J.; BOLZANI, V. S. ; RINALDO, D. . Extrato sustentável e enriquecido com substâncias bioativas para síntese de nanopartículas com aplicações em biomateriais. Apresentação oral na 5ª Reunião Técnica do Programa de Pós- graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, novembro de 2023.

05. RANZETI, M. T. F. ; CREMASCO, G. ; RINALDO, D. . Método cromatográfico verde para identificação de compostos fenólicos polares em resíduos de laranja. Apresentação de pôster no XXXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp-FC/Bauru, outubro de 2023.

06. SANTOS, L. M. B. ; CREMASCO, G. ; RINALDO, D. . Desenvolvimento de metodologias sustentáveis e biomiméticas para extração dos compostos polifenólicos de Passiflora edulis sims. Apresentação de pôster no XXXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp-FC/Bauru, outubro de 2023.

07. BUENO, V. H. ; CREMASCO, G. ; RINALDO, D. . Choline chloride-based natural deep eutectic solvent (NADES) for extraction of volatile compounds of high added value in orange residues. Apresentação de pôstrer no

08. CREMASCO, G.; RINALDO, D. . Desenvolvimento de metodologias sustentáveis e biomiméticas para extração e análise de compostos de alto valor agregado em resíduos agrícolas de amêndoa. Apresentação de pôster no XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp-FC/Bauru, outubro de 2021.

09. CREMASCO, G.; RINALDO, D. . Desenvolvimento de metodologias sustentáveis e biomiméticas para extração e análise de compostos de alto valor agregado em resíduos agrícolas de amêndoa. 2021. Apresentação de pôster na XIV Semana da Química "Ressignificando a Ciência", promovido pelo curso de Química da Faculdade de Ciências, UNESP- Câmpus Bauru, novembro de 2021.

10. CREMASCO, G.; OLIVEIRA, M. E. ; RINALDO, D. . Método verde e de baixo custo para análise de pata-de-vaca por HPLC. Apresentação de pôster no XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp-FC/Bauru, outubro de 2020.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS

01. RINALDO, D.; CREMASCO, G.; GOLIA, N. F. N.. Participação em banca de Cássia Yumi Kubo.Desenvolvimento de método verde para a extração de hesperidina em resíduos de laranja. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

02. RINALDO, D.; CREMASCO, G.; ROSÁRIO, I. S.. Participação em banca de Victor Hugo Bueno. Combinação de NADES na extração de compostos voláteis a partir de resíduos de Citrus sinensis. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

01. 46a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (RASBQ). Green extraction of compounds from Prunus dulcis residues. 2023.

02. 5ª Reunião Técnica do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais.Extrato sustentável e enriquecido com substâncias bioativas para síntese de nanopartículas com aplicações em biomateriais. 2023.

03. Brazil-spain workshop on organic chemistry 7th edition. Sustainable method for extracting fenolic compounds from almond hull. 2023.

04. Congresso de Iniciação Científica. Desenvolvimento de metodologias sustentáveis e biomiméticas para extração de compostos de alto valor agregado presentes nos resíduos de amêndoa. 2021.

05. Semana da Química.Desenvolvimento de metodologias sustentáveis e biomiméticas para extração de compostos de alto valor agregado presentes nos resíduos de amêndoa. 2021.

06. Congresso de Iniciação Científica. Método verde e de baixo custo para análise de pata-de-vaca por HPLC. 2020.

ORIENTAÇÕES

01. Orientação acadêmica na disciplina de Orgânica I no curso de Química da Faculdade de Ciências, UNESP, Câmpus Bauru, 2023.

02. Orientação acadêmica na disciplina de Orgânica II no curso de Química da Faculdade de Ciências, UNESP, Câmpus Bauru, 2023.

OUTROS

Prêmios

01. Melhor trabalho na categoria Biomateriais: CREMASCO, G.; RINALDO, D., pela apresentação do trabalho “Extrato sustentável e enriquecido com substâncias bioativas para síntese de nanopartículas com aplicações em biomateriais” na 5a Reunião Técnica do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais. Ano: 2023.

02. Melhor trabalho de Iniciação Científica do curso de graduação: DOS SANTOS, L. M. B.; CREMASCO, G.; RINALDO, D., pela apresentação do trabalho “Desenvolvimento de metodologias sustentáveis e biomiméticas para extração dos compostos polifenólicos de Passiflora edulis Sims” no XXXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp-FC/Bauru. Ano: 2023.

03. Segundo melhor trabalho de Iniciação Científica do curso de graduação: RANZETI, M.F.; CREMASCO, G.; RINALDO, D., pela apresentação do trabalho “Métodocromatográfico verde para identificação de compostos fenólicos polares em resíduos de laranja” no XXXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp-FC/Bauru. Ano: 2023.

04. Prêmio Mendeleev – Domínio do Conteudo, pela apresentação do trabalho: “Desenvolvimento de metodologias sustentáveis e biomiméticas para extração e análise de compostos de alto valor agregado em resíduos agrícolas de amêndo” na XIV Semana da Química "Ressignificando a Ciência", promovido pelo curso de Química da Faculdade de Ciências, UNESP- Câmpus Bauru. Ano: 2021.

Organização de eventos

01. Organização da XIII Semana da Química da Faculdade de Ciências, UNESP, Câmpus Bauru, 2019.

02. Organização da XII Semana da Química da Faculdade de Ciências, UNESP, Câmpus Bauru, 2018.

Avaliação de trabalhos científicos

01. Avaliadora de trabalhos científicos no XXXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP – Campus Bauru, 2023.

02. Avaliadora de trabalhos científicos no XXXIV Congresso de Iniciação Científica da UNESP – Campus Bauru, 2022.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todas as pessoas que tornaram possível a conclusão desta tese.

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Daniel Rinaldo, pela orientação dedicada e valiosas sugestões ao longo deste trabalho. Sua expertise e apoio foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

À minha família, que sempre me apoiou incondicionalmente, quero expressar meu profundo agradecimento. Seu amor, paciência e incentivo foram fundamentais para minha jornada acadêmica.

Agradeço também aos professores Marina Piacenti, Fenelon Martinho Lima Pontes, Dario Arrua, Emily Hilder e Luiz Carlos Silva Filho e colegas do Greenbiotech e LSOP pela troca de conhecimento e pelas discussões enriquecedoras que contribuíram para o aprimoramento das ideias apresentadas neste trabalho.

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos à banca da minha qualificação e defesa Cláudia Quintino da Rocha, Isabele Rodrigues Nascimento e Kelly Johana Dussán. Agradeço sinceramente pela atenção, tempo e dedicação que cada membro dedicou à análise cuidadosa do meu trabalho. Agradeço pela oportunidade de apresentar minha pesquisa diante de uma equipe tão qualificada e experiente que contribuíram significativamente para o aprimoramento do meu trabalho.

Às instituições e agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP que financiaram de alguma forma esta pesquisa, e aos parceiros do laboratório INCT – BioNat, IEAMar – UNESP, pela disponibilazação de quipamentosmeu sincero agradecimento. O suporte financeiro foi crucial para a realização deste projeto.

Aos amigos e colegas que compartilharam suas experiências e conhecimentos, muito obrigado. Suas contribuições foram inestimáveis para o desenvolvimento desta tese.

Por fim, dedico um agradecimento especial a todos que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho, mesmo que indiretamente. Cada gesto de apoio e incentivo foi significativo e não passou despercebido.

Este trabalho representa não apenas minha dedicação, mas também o resultado de uma rede de apoio incrível. A todos vocês, meu profundo agradecimento.

RESUMO

A produção de amêndoa gera uma grande quantidade de resíduos, muitos dos quais não são reaproveitados. Este estudo teve como objetivo agregar valor aos resíduos agrícolas de *Prunus dulcis* por meio da extração sustentável e análise quimiométrica dos metabólitos presentes em sua casca. A triagem foi realizada com 10 solventes eutéticos naturais (NADES), sendo ácido lático:glicerol:água selecionado como o melhor solvente extrator. Posteriormente, o método foi otimizado utilizando uma técnica de extração miniaturizada, Extração Assistida por Microondas (MAE), em conjunto com o NADES escolhido. O modelo calculado mostrou-se adequado e foi comparado com métodos da literatura, apresentando rendimento 2,4 vezes superior ao melhor método avaliado. Além disso, utilizando as métricas Analytical Greeness Metric (AGREE) e Green Analytical Process Index (GAPI), foi possível quantificar o impacto ambiental do método desenvolvido, que obteve pontuação superior em relação aos da literatura, abrangendo diversos princípios da Química Analítica Verde e, portanto, classificável como método verde, de acordo com as métricas utilizadas. Por fim, o extrato mostrou-se eficiente na síntese de nanopartículas metálicas, com potencial aplicação em biomateriais.

Palavras chave: NADES; *Prunus dulcis;* Química Analítica Verde; Planejamento experimental.

ABSTRACT

The production of almonds generates a large amount of waste, much of which goes unused. This study aimed to add value to agricultural residues from Prunus dulcis by conducting sustainable extraction and chemometric analysis of metabolites present in its husk. Screening was performed with 10 Natural Deep Eutectic Solvents (NADES), with lactic acid:glycerol:water selected as the best extracting solvent. Subsequently, the method was optimized using a miniaturized extraction technique, Microwave-Assisted Extraction (MAE), in conjunction with the chosen NADES. The calculated model proved to be suitable and was compared to methods from the literature, showing a 2.4-fold higher yield than the best method evaluated. Additionally, by utilizing Analytical Greeness Metric (AGREE) and Green Analytical Process Index (GAPI) metrics, it was possible to quantify the environmental impact of the developed method, which scored higher compared to those in the literature, encompassing various principles of Green Analytical Chemistry and thus classifiable as a green method, according to the metrics used. Finally, the extract proved to be efficient in the synthesis of metallic nanoparticles, with potential applications in biomaterials.

Keywords: NADES; *Prunus Dulcis;* Green Analitycal Chemistry; Design of experiments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Partes da amêndoa.....20
Figura 2 - Diagrama de fases de uma representação de uma mistura eutética.....22
Figura 3 - Ligações de hidrogênio dos DES.....23
Figura 4 - Número de pesquisas usando IL, DES e NADES publicados de 2000 a 2023 de acordo com a plataforma de dados SCOPUS.....24
Figura 5 - Formação de NPs metálicas a partir de extratos vegetais.....29
Figura 6 - Sistema experimental para síntese de NPs metálicas.....36
Figura 7 - NPs Pt, NPs Ag, NPs Au respectivamente.....37
Figura 8 - Comparação das extrações dos compostos bioativos no *hull* e *shell*.....38
Figura 9 - Cromatograma do extrato hidroetanólico da casca da amêndoa (*hull*), monitorado à 254 nm e espectro UV dos compostos (condições descritas na seção 3.6).....40
Figura 10 - Cromatogramas de LC-HRMS do hull da amêndoa do Extrato Hidroetanólico: a) corrente de íons totais; b) monitorado em m/z 289; c) monitorado em m/z 577; d) monitorado a m/z 865 e e) monitorado a m/z 1153 (condições de CLAE-DAD, 3.6).....41
Figura 11 - Estruturas químicas da catequina e proantocianidinas diméricas tipo B: 1 epicatequina-(4→8)-catequina, 2 epicatequina-(4→6)-catequina e proantocianidina dimérica tipo A, 3 epicatequina-(2→7;4→8)- epicatequina.....42
Figura 12 - Estrutura dos ácidos *o*-cafeiolquinicos.....43
Figura 13 - Solventes eutéticos naturais (NADES) preparados (1) MA: SOR (1:1); (2) MA: GLU: FRU (1:1:1); (3) LA: SUC (2:1); (4) LA: GLU (2:1); (5) CL: SOR (1:2); (6) CL: GLU (1:1); (7) PRO: MA (1:1); (10) GLY: CL (2:1); (11) LA: GLY (1:1); (13) THY:MEN (1:1).....44
Figura 14 - Comparação entre as extrações com os diferentes NADES.....45
Figura 15 - Gráfico de pareto dos efeitos nas variáveis no planejamento fatorial completo 2^3.....48
Figura 16 - Superfície de resposta das variáveis significativas do planejamento fatorial completo 2^3 49
Figura 17 - Gráfico de pareto do CCD.....52
Figura 18 - Superfície de resposta obtina para o CCD.....53
Figure 19 - Desejabilidade.....55
Figura 20 - Comparação da eficiência de extração dos métodos.....56
Figura 21 - Pictogramas das pontuações obtidas na métrica AGREE para os métodos de extração: (a) Pinelo et al, 2004; (b) Rubilar et al, 2007; (c) Meshkini, 2016; (d) Fextrato hidroetanólico; (e) método desenvolvido.....57
Figura 22 - Pictogramas obtidos pela ferramenta GAPI para os métodos de extração: (a) pictogrma referência; (b) Pinelo et al, 2004; (c) Rubilar et al, 2007; (d) Meshkini, 2016; (e) extrato hidroetanólico; (f) método desenvolvido.....58
Figure 23 - Espectro UV das NPs metálicas formadas.....59
Figura 24 - DRX das NPs metálicas formadas.....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos solventes eutéticos naturais (NADES) preparados.....34
Tabela 2 - Variáveis independetes planejamento fatorial completo 2^3.....35
Tabela 3 - Compostos referentes aos íos observados.....42
Tabela 4 - Valores codificados (reais entre parêntesis) e resposta obtida para o planejamento fatorial completo 2^3.....47
Tabela 5 - Análise Variância (ANOVA) para o modelo estimado no planejamento fatorial completo 2^3.....50
Tabela 6 - Deslocamento de máxima inclinação para o modelo da figura 17.....51
Tabela 7 - Valores codificados (reais entre parêntesis) e resposta obtida para o planejamento composto central.....51
Tabela 8 - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo estimado no planejamento composto central 2^2.....54
Tabela 9 - Área de extração dos diferentes NADES.....71
Tabela 10 - Área dos diferentes métodos de extração.....72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AGREE	*Analytical GREEnness Metric Approach and Software*
ANOVA	Análise de Variância
CCD	*Central Composite Design* (planejamento composto central)
CL	*Choline Chloride* (cloreto de colina)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de fotoDiodos
DES	*Deep Eutectic Solvents* (solventes eutéticos)
DoE	*Design of Experiments* (planejamento experimental)
DRX	Difração de Raios-X
ESI	*Electrospray Ionization* (ionização por eletrospray)
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
FAO	*Food and Agriculture Organization*
FCC	*Face Centered Cubic* (cúbica de face centrada)
FDA	*Food and Drug Administration*
FRU	*Fructose* (frutose)
GAC	*Green Analytical Chemistry* (química analítica verde)
GAPI	*Green Analytical Procedure Index*
GCF	*Green Chromatographic Fingerprintig*
GCFR	*Green Chromatographic Fingerprintig Response*
GLU	*Glucose* (glicose)
GLY	*Glycerol* (glicerol)
GRAS	Geralmente Reconhecidos como Seguros
HBA	*Hydrogen Bond Acceptors* (receptor de ligação de hidrogênio)
HBD	*Hydrogen Bond Donors* (doador de ligação de hidrogênio)
HPLC	*High Performance Liquid Chromatographic*

HRMS	*High Resolution Mass Spectrometry*
IL	*Ionic Liquids* (líquidos iônicos)
LA	*Lactic acid* (ácido lático)
LC	*Liquid Chromatographic* (cromatografia líquida)
LTTM	*Low Temperature Transition Mixtures* (misturas de baixa temperatura de transição de fase)
MA	*Malic acid* (ácido málico)
MAE	*Microwave Assisted Extraction* (extração assistida por microondas)
MEN	*Menthol* (mentol)
MS	*Mass Spectry* (espectro de massas)
NADES	*Natural Deep Eutectic Solvents* (solventes eutéticos naturais)
NDFC	*International Nuts and Dried Fruits Statistical Yearbook*
NFPA	*National Fire Protection Association*
NPs	Nanopartículas
MeOH	Metanol
OHAc	Ácido acético
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
pf	ponto de fusão
PRO	*Proline* (prolina)
SOR	Sorbitol
SPR	*Surface Plasmon Resonance* (ressonânica plasmônica de surperfície)
SRM	*Surface Response Methodology* (superfície de resposta)
SUC	*Sucrose* (sacarose)
TFA	Trifluoracético
THY	*Thymol* (timol)
UniSA	*University of South Australia*
UV	Ultravioleta

Vis	Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

λ	comprimento de onda
n	número total de picos de um determinado cromatograma
t	tempo de retenção do último composto de interesse
FP	seção do cromatograma com um número menor de picos
MP	seção do cromatograma que tem o maior número de picos
η	viscosidade
A	área total
X1	razão material vegetal/NADES
X2	temperatura de extração
X3	tempo de extração
D	tamanho médio dos cristalitos
K	constante que depende da forma das partículas (esfera = 0,94)
β	largura à meia altura de um pico de difração específico
θ	ângulo de difração

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....19
2. OBJETIVOS.....30
2.1 Objeivos específicos.....30
3. METODOLOGIA.....31
3.1. Reagentes e solventes.....31
3.2. Obtenção do material vegetal.....31
3.3. Preparação da amostra.....31
3.4. Extrações de referência.....32
3.5. Avaliação dos resíduos quanto à presença de compostos fenólicos.....32
3.6. Sistema CLAE - DAD.....32
3.7. Identificação dos compostos presentes no extrato hidroetanólico do casco da amêndoa.....33
3.8. Preparação dos Solventes Eutéticos Naturais (NADES).....33
3.9. Extração assistida por microondas (MAE).....34
3.10. Planejamento experimental.....34
3.12. Síntese de nanopartúclas metálicas.....36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....38
4.1. Comparação Hull e shell.....38
4.2. Identificação dos compostos presentes no extrato hidroalcoólico do casco da amêndoa.....39
4.3. Solventes Eutéticos Naturais (NADES).....43
4.4. Extração.....44
4.5. Planejamento Experimental.....47
4.6. Comparação de eficiência e impacto ambiental entre o método desenvolvido otimizado e os métodos de referência.....55
4.7. Síntese de nanopartículas metálicas.....58
5. CONCLUSÃO.....62
6. REFERÊNCIAS.....63

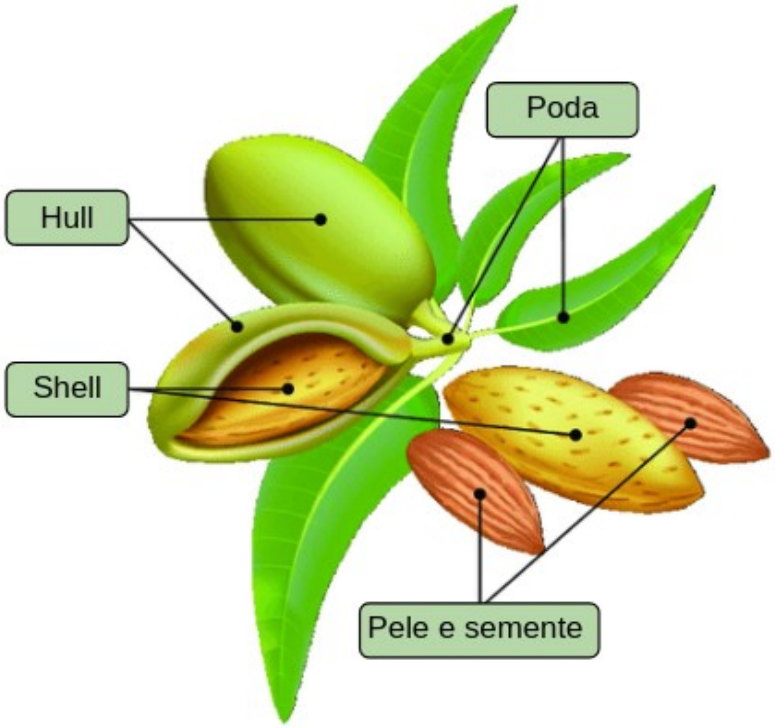
1. INTRODUÇÃO

A grande preocupação com a sustentabilidade, aliada às metas da Organização das Nações Unidas (ONU) para a Agenda 2030, tem levado pesquisadores a estudar práticas para reduzir a produção de lixo tóxico a fim de proteger desde o meio ambiente até a saúde humana (ONU, 2023). Além do avanço das técnicas de preservação ambiental, também vêm sendo estudados os resíduos vegetais agrícolas (produtos naturais), pois raramente são aprimorados ou reciclados, mas possuem princípios ativos de interesse econômico e prático, devido principalmente a sua alta atividade antioxidante, como é o caso dos resíduos agrícolas de *Prunus dulcis* (amêndoas) (Rubilar et al., 2007, Capasso, 2003).

A amendoeira é a árvore de noz mais cultivada no mundo, de acordo com o *International Nuts and Dried Fruits Statistical Yearbook* (NDFC, 2024) sua produção seguiu tendência crescente nos últimos dez anos tendo na temporada 2022/2023 uma produção de mais de 1,5 milhões de toneladas, uma queda em relação ao recorde da temporada 2020/2021, mas 50% maior que 10 anos antes. O maior produtor são os Estados Unidos, tendo a Califórnia com aproximadamente 1,1 milhões de toneladas, representando 76% da colheita mundial, seguida pela Austrália com 10% do mercado e a Espanha posteriormente com 4%. Assim, com o aumento da produção, destaca-se também o aumento na quantidade de resíduos. Portanto, informações relacionadas a funcionalidade e atividades destes resíduos, é de fundamental importância para alternativas de valorização, reduzindo o impacto negativo ao meio ambiente e sustentando a “economia de resíduos zero” (Salgado-Ramos, 2022).

A amêndoa, fruto da amendoeira, conhecida cientificamente como *Prunus dulcis*, pertencente à família Rosaceae e ao gênero *Prunus*. Seu crescimento caracteriza-se pela cultivação em áreas áridas e condições de escassez de água. Estruturalmente a amêndoa se divide em quatro partes como mostra a Figura 1: um invólucro de cor esverdeada chamado de casca (*hull*), uma casca intermediária dura e porosa (*shell*), e uma pele marrom que envolve a noz, protegendo-a e prevenindo sua oxidação e contaminação (*skin*). Em relação ao peso, cerca de 85% do peso das amêndoas está em seus resíduos, sendo 52% de *hull* (casco) e *shell* (casca) (Dammak,et al., 2018; Barral-Martinez, 2021; Salgado-Ramos, 2022).

Figura 1 - Partes da amêndoa



Fonte: Adaptado de Aguado (2021)

Há um enfoque especial nas características desses resíduos, principalmente em seus compostos bioativos. Compostos fenólicos são os principais grupos fitoquímicos encontrados em resíduos de amêndoas. Essas substâncias são antioxidantes relacionadas à prevenção de doenças ligadas ao estresse oxidativo, através da eliminação de radicais livres nas células. Dentre os compostos presentes nos resíduos da amêndoa já identificados, destacam-se os derivados da catequina, que possuem alta atividade antioxidante e efeito inibitório sobre inúmeras enzimas; e derivados do ácido cafeico com potencial atividade antioxidante, anti-inflamatória e antineoplásica. (Prgomet, et al., 2017; Barral-Martinez, 2021).

Essas propriedades estão relacionadas à concentração desses compostos no produto natural. Portanto, os compostos bioativos que desempenham essas funções geralmente precisam ser extraídos da matéria-prima para serem utilizados com a segurança e eficácia necessárias. Assim, a extração é uma operação unitária de fundamental importância, que busca, ao final do processo, determinadas propriedades mais ou menos importantes dependendo da aplicação desejada, por exemplo, seletividade e sensibilidade em processos analíticos ou rendimento e pureza em processos industriais (Cavalcanti, 2013; Dhanani, 2015). No entanto, considerar apenas essa eficiência de extração é uma visão reducionista, pois nesses casos não há preocupação com as consequências adversas que os reagentes e o processo como um todo trazem ao meio ambiente. Para a produção de

medicamentos, por exemplo, estima-se que a geração de resíduos seja 25 a 100 vezes maior, em massa, do que o produto efetivamente obtido, sendo grande parte desses resíduos tóxicos, persistentes e bioacumulativos (Zimmerman, 2020).

Geralmente esses compostos de interesse são extraídos utilizando solventes orgânicos como hexano, benzeno, metanol, clorofórmio, éter e acetona, que apresentam alta toxicidade, volatibilidade e inflamabilidade, podendo ser prejudiciais à saúde e ao meio ambiente. Assim foi proposto o uso se solventes Geralmente Reconhecidos como Seguros (GRAS), como alguns àlcoois com baixo ponto de ebulição, porém estes não são totalmente eficazes para solubilizar moléculas mais apolares (Benvenutti, Zielinski, Ferreira 2019).

Atualmente, há uma crescente preocupação em reduzir o consumo de energia, água, solventes e emissões de carbono, o que tem impulsionado a busca por processos ecologicamente corretos. Nesse sentido, têm surgido novas tecnologias de extração que visam aumentar a eficiência, melhorar a seletividade e reduzir o consumo energético.

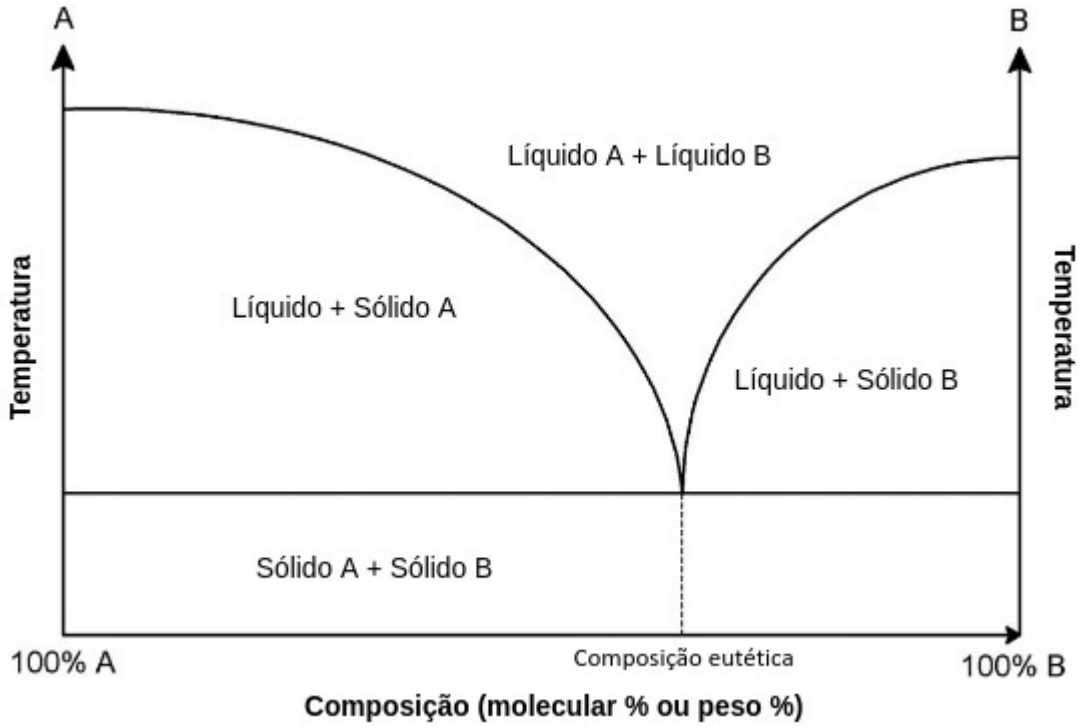
Entre as alternativas exploradas, destacam-se uma classe conhecida como misturas de baixa temperatura de transição de fase (*Low Temperature Transition Mixtures* - LTTM). A primeira subclasse são os líquidos iônicos (*Ionic Liquids* - IL), que são sais compostos por um cátion orgânico e um ânion orgânico ou inorgânico, possuindo pontos de fusão próximos a 100 °C, inferiores aos de seus constituintes originais. Os líquidos iônicos foram descobertos por Paul Walden em 1914 ao testar nitroglicerina em explosivos, e em 1934 foi publicada a primeira patente aplicada à industria para dissolver celulose (US nº 1943176, 1934) (Graenacher, 1934). Contudo, o uso de ILs como solvente extrator de substâncias bioativas ocorreu somente em 2007, no qual o 1-*n*-butil-3-metilimidazólio por meio de extração assistida por microondas (M*icrowave Assisted Extraction* - MAE) recuperou compostos de *Rhizoma polygoni Cuspidati* (erva medicinal chinesa), aumentando a partir deste ano um grande número de publicações sobre o tema (Benvenutti, Zielinski, Ferreira 2019).

Os líquidos iônicos apresentam diversas propriedades termodinâmicas vantajosas, como baixa pressão de vapor, estabilidade térmica, ajuste de viscosidade, miscibilidade e solubilidade, além de capacidade de extração para diversos compostos orgânicos e inorgânicos. Apesar dessas vantagens, a adoção dos líquidos iônicos na agroindústria enfrenta desafios devido à falta de regulamentação por órgãos importantes, como a *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA, o *Codex Alimentarius* (FAO/OMS) e a legislação europeia. Além disso, os efeitos desses compostos ainda não estão totalmente esclarecidos (Benvenutti, Zielinski, Ferreira 2019).

Os solventes eutéticos (Deep Eutectic Solvents – DES) representam uma alternativa aos líquidos iônicos, compartilhando propriedades termodinâmicas semelhantes, mas com vantagens

adicionais. O termo "eutético", que denomina esta categoria de solventes, refere-se a uma mistura de dois ou mais componentes que exibem um ponto mínimo de fusão em um diagrama de fases, notavelmente inferior aos pontos de fusão (pf) das substâncias isoladas (Figura 2), além de se comportar como uma subtância pura no pf, no qual a temperatura se mantém inalterável do início ao fim do processo (Durand; Lecomte; Villeneuve, 2016).

Figura 2 - Diagrama de fases de uma representação de uma mistura eutética

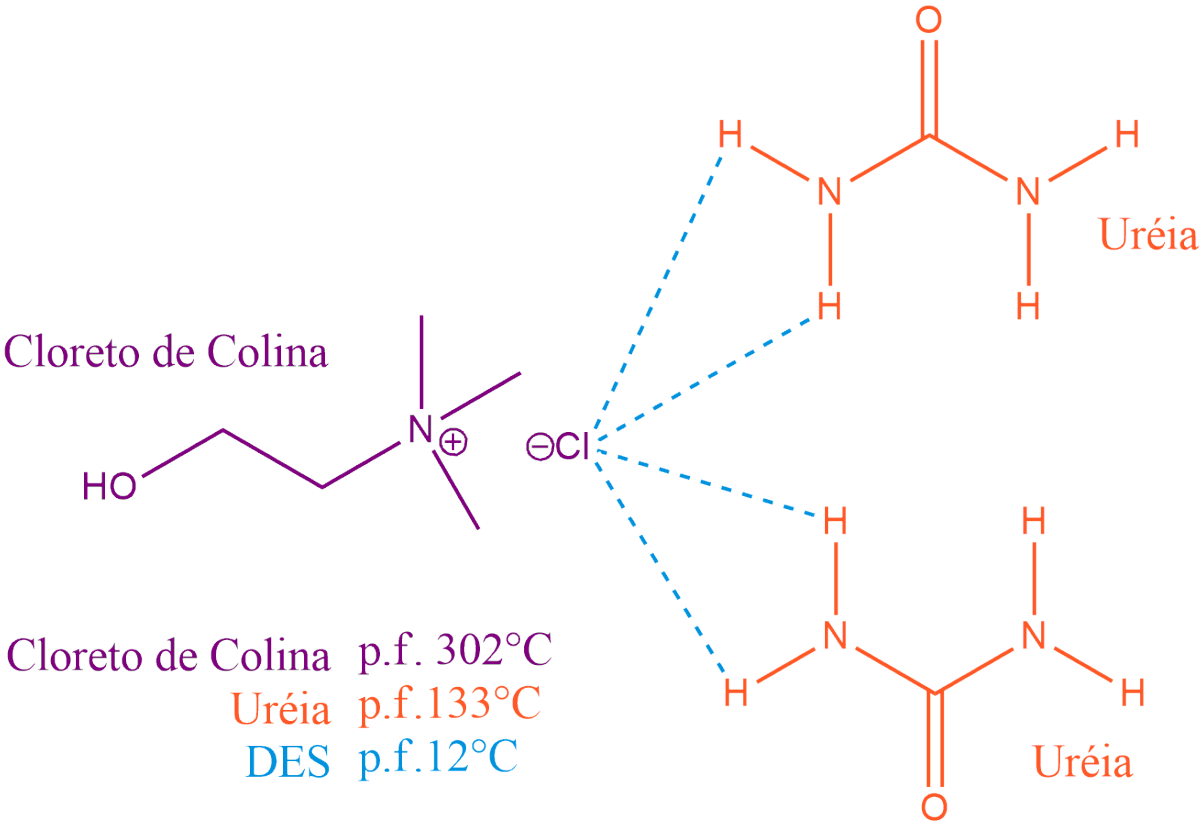


Fonte: Adaptado de Durand; Lecomte; Villeneuve (2016)

Os DES são facilmente sintetizados, menos prejudiciais ao meio ambiente e apresentam menor toxicidade em comparação aos IL. Esses solventes são formados pela combinação de um receptor de ligação de hidrogênio (*Hydrogen Bond Acceptors*, HBA), como o amônio quaternário, com um doador de ligação de hidrogênio (*Hydrogen Bond Donors*, HBD), como uréia, ácidos carboxílicos ou aminas (Figura 3). A principal razão para a redução do ponto de fusão da mistura está relacionada à formação das ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals entre os compostos. A associação dessas moléculas resulta em uma redistribuição energética na estrutura cristalina dos sólidos envolvidos, provocando um aumento na entropia durante a transição de fase. Esse fenômeno leva a uma considerável diminuição no ponto de fusão. A intensidade das ligações de hidrogênio formadas está diretamente ligada à temperatura. Em termos gerais, uma ligação de hidrogênio mais robusta resultará em uma redução mais significativa no ponto de fusão da mistura,

pois implica em uma estabilização mais pronunciada da estrutura formada (Cvjetko Bubalo *et al.*, 2018; Francisco; Van den Bruinhorst; Kroon, 2013).

Figura 3 - Ligações de hidrogênio dos DES

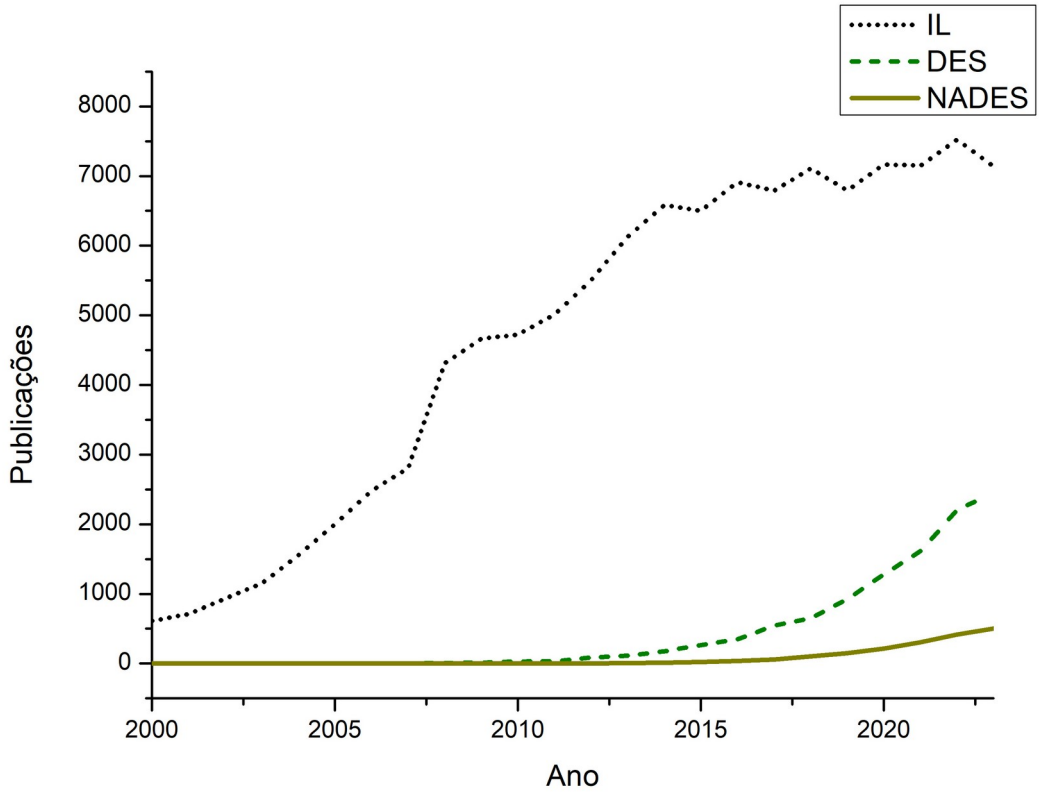


Fonte: Adaptado de Correia, 2021

Quando componentes naturais, como metabólitos primários de plantas (por exemplo, açúcares), são usados para a síntese de DES, eles são chamados de solventes eutéticos naturais (*Natural Deep Eutectic Solvents* - NADES). A terminologia NADES foi utilizada pela primeira vez por Choi et al. (2011) para representar misturas eutéticas de dois ou mais compostos naturais, entre cloreto de colina, ácido cítrico, ácido málico, ácido maleico, ácido acético, glicose, frutose, sacarose, trealose e água. Esses NADES têm menor impacto ambiental e toxicidade, emulando o caminho natural de solubilização de metabólitos primários e secundários insolúveis em água presentes nas plantas (Mehariya, et al., 2021; Benvenutti, Zielinski, Ferreira 2019).

A substituição dos meios tradicionais de recuperação de compostos bioativos por solventes emergentes, como IL, DES ou NADES, tem despertado interesse crescente, o qual é evidenciado pelo aumento do número de pesquisas sobre o tema nas últimas duas décadas, conforme indicado nos registros da plataforma de banco de dados SCOPUS (Figura 4, Apêndice A).

Figura 4 - Número de pesquisas usando IL, DES e NADES publicados de 2000 a 2023 de acordo com a plataforma de dados SCOPUS



Fonte: adaptado de SCOPUS (2024)

Inicialmente, as pesquisas com IL surgiram em 2003, resultando em mais de 100 trabalhos publicados. Posteriormente, em 2011, surgiram as primeiras publicações sobre NADES, demonstrando sua novidade e potencial abordagem verde em sua utilização.

Dai, *et al.* (2013a) foram responsáveis por uma notável pesquisa em que sintetizaram mais de 100 combinações de solventes eutéticos naturais. Em alguns casos, observaram que essas combinações apresentaram melhor solubilização de biomoléculas do que a água. Esse trabalho marcou um ponto de viragem na extração de compostos bioativos, despertando grande interesse na área.

Posteriormente, em 2018, a empresa Naturex® (U. S. Patent No. 0055904, 2018) depositou uma patente relatando o uso de um solvente eutético composto por moléculas naturais para a extração eficiente de materiais vegetais, demonstrando o potencial prático e comercial dos NADES.

Os NADES podem ser classificados em cinco categorias, dependendo da natureza dos compostos utilizados em sua síntese: i) Tipo líquido iônico, composto por um ácido e uma base; ii) Tipo neutro, formado por açúcares ou uma combinação de açúcar e poliálcool; iii) Tipo neutro-ácido, sintetizado a partir de açúcar ou poliálcool e um ácido orgânico; iv) Tipo neutro-básico, com

açúcar ou poliálcool e uma base orgânica; e v) Tipo aminoácidos, que contém aminoácidos combinados com açúcar ou ácido orgânico. Essa classificação reflete a diversidade de NADES disponíveis, possibilitando a seleção de solventes mais adequados para diferentes aplicações de extração de compostos bioativos. O avanço contínuo no conhecimento e a compreensão das características e aplicações dos NADES têm impulsionado a exploração desses solventes como alternativas promissoras e ecológicas para diversos fins industriais (Dai, et al., 2013a; Gonzalez, et al, 2017).

Em relação ao uso em formulações alimentícias e farmacêuticas, é importante destacar que os NADES devido à sua origem a partir de componentes naturais, têm sido considerados mais seguros e com menor impacto ambiental, o que facilita sua utilização em produtos alimentares e farmacêuticos. Eles já foram submetidos a avaliações e pesquisas que corroboram sua segurança e eficácia. No entanto, alguns DES e IL ainda demandam maiores investigações antes de serem amplamente aceitos nessas indústrias (Benvenutti, Zielinski, Ferreira 2019).

A análise dos metabólitos secundários extraídos também merece uma atenção em razão de sua versatilidade e eficácia na qual destaca-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detectores ultravioleta/visível (UV/Vis) ou espectrometro de massas (*mass spectrometry* - MS). Caracteristicamente, para separação dos compostos bioativos empregam-se acetonitrila e metanol como fases móveis nas análises. Embora tais solventes possuam propriedades físico-químicas desejáveis do ponto de vista cromatográfico, estes podem gerar resíduos de tratamento dispendioso, além de serem tóxicos à vida aquática e aos analistas. Diante desse contexto, há um grande potencial a ser explorado em termos de solventes e otimização de novas técnicas de extração verde e sustentável para a análise e caracterização química de substâncias polares em resíduos agrícolas de amêndoa. (Welch et al., 2010; Gaber et al., 2011; Hutchinson et al., 2012,Fritz, Ruth, Kragl, 2009, Funari et al., 2014).

A incongruência na utilização desses solventes tóxicos representa um obstáculo ao avanço integral da Química de Produtos Naturais. Isso ocorre porque essa área de estudo, que engloba principalmente organismos como plantas e fungos, ecossistemas em geral e as complexas relações bióticas e abióticas intrínsecas, corre o risco de sofrer danos potenciais decorrentes do emprego desses solventes prejudiciais. Além disso, o uso de produtos químicos e metodologias ambientalmente nocivos entra em clara contradição com os princípios da Química Analítica Verde (*Green Analytical Chemistry* – GAC). (Gałuszka, Migaszewski, Namieśnik, 2013; Kaljurand e Koel, 2011; Funari et al., 2014)

A GAC, cujos princípios são da Química Verde introduzida por Anastas e Warner, em 1989, é uma abordagem que busca integrar princípios sustentáveis e ambientalmente conscientes nas

técnicas e metodologias analíticas. Seu objetivo é minimizar ou eliminar impactos negativos no meio ambiente, promovendo práticas analíticas mais ecoeficientes. A GAC abrange uma variedade de aspectos, desde a escolha de solventes e reagentes até o descarte de resíduos, visando otimizar a eficiência analítica enquanto reduz o impacto ambiental, propondo 12 princípios: *(1) Técnicas de análises diretas devem ser aplicadas para se evitar o tratamento de amostras; (2) Quantidades mínimas de amostras devem ser avaliadas; (3) Medidas in situ são preferíveis; (4) Integração de processos analíticos e operações gastam menos recursos energéticos e devem ser perfomados ante a análises isoladas; (5) Processos automatizados e miniaturizados devem ser desenvolvidos; (6) A derivação da amostra deve ser evitada; (7) Geração de grandes quantidades de resíduos em processos analíticos devem ser evitados, e todo resíduo deve ser tratado corretamente; (8) Métodos multi-analito e multi-variável são preferíveis; (9) O uso de recursos energéticos deve ser o mínimo; (10) Reagentes obtidos de fontes renováveis devem ser preferidos; (11) Reagentes tóxicos devem ser substituídos ou eliminados; (12) A segurança do operador deve ser aumentada*. A adoção desses princípios não apenas contribui para a sustentabilidade ambiental, mas também pode resultar em economias de custos a longo prazo, tornando a Química Analítica Verde uma abordagem vantajosa tanto para a comunidade científica quanto para a sociedade em geral.

Portanto, é proveitoso e coerente empregar metodologias completamente sustentáveis e dotadas de eficiência e robustez para desenvolver um método de extração eficiente de compostos de alto valor agregado dos resíduos de amêndoas. Além dos solventes verdes como substitutos aos tradicionalmente utilizados, destaca-se também a técnica de extrações assistidas por micro-ondas (Wang, Ding e Ren, 2016).

A Extração Assistida por Micro-ondas (MAE) é uma técnica miniaturizada de extração que utiliza radiação micro-ondas para facilitar a transferência eficiente de analitos de uma matriz para um solvente, apresentando alto rendimento de produto extraído, curto tempo de extração e redução dos resíduos gerados (Tsukui, Rezende, 2014).

A radiação micro-ondas aquece seletivamente o solvente e a matriz, promovendo a quebra das interações entre os analitos e a matriz, facilitando assim a sua transferência para o solvente de extração. Além disso ela permite o controle preciso de parâmetros como temperatura, pressão e tempo de irradiação, proporcionando condições otimizadas para diferentes tipos de amostras e analitos (Gómez et al., 2018; Li; Ngadi; ma, 2014; Wakte et al., 2011).

Em comparação com métodos tradicionais, a MAE é geralmente mais rápida, permitindo a obtenção de resultados em questão de minutos, o que é particularmente útil em pesquisas que exigem alta produtividade. Ademais esta técnica frequentemente requer volumes menores de

solventes em comparação com métodos convencionais, o que a torna mais sustentável e alinhada aos princípios da química analítica verde. O consumo energético pode ser significativamente menor do que em métodos tradicionais, tornando-a uma opção mais eficiente em termos energéticos (Gómez et al., 2018; Li; Ngadi; ma, 2014; Wakte et al., 2011).

A técnica é versátil e além de ser uma abordagem avançada e eficiente para a extração de compostos de diferentes matrizes, também é empregada eficientemente no preparo rápido de NADES, contribuindo para a análise de compostos específicos.

O consumo energético da MAE chega a ser 650 vezes menor do que o consumo das técnicas de agitação para preparo dos NADES, sendo uma técnica que está de acordo com os princípios da química analítica verde (Gomez et al., 2018). Além disso, devido a precisão nos parâmetros como potência, temperatura e tempo, a MAE permite otimizações que potencializam a eficiência da técnica para um determinado fim.

Assim, metodologias eficientes de extração e análise conforme recomendações da *US Food and Drug Administration* (2004), devem ser desenvolvidas sob uma perspectiva que englobe todos os parâmetros que possam interferir na eficiência do processo. A utilização de Planejamento de Experimento (*Design of Experiments*, DoE), aliada a medições, que priorizem a eficiência, pode ser muito útil para atingir esse objetivo (Funari, 2014).

O DoE é uma abordagem sistemática utilizada para otimizar a coleta de dados, maximizando a eficiência e a obtenção de informações valiosas. Este processo envolve a manipulação deliberada de variáveis independentes para observar suas influências sobre uma ou mais variáveis dependentes, com o objetivo de entender melhor o sistema em estudo (Breitkreitz, 2014; Galuszka, 2013).

O planejamento experimental envolve: as variáveis independentes (aquelas que o pesquisador manipula durante o experimento para observar seus efeitos), as variáveis dependentes (medidas ou observações que refletem os efeitos das variáveis independentes), os fatores (as variáveis independentes escolhidas para serem investigadas), os níveis (representam os diferentes valores que cada fator pode assumir), a ordem em que os experimentos são conduzidos é aleatória para reduzir a influência de fatores não controlados e utiliza métodos estatísticos para analisar os resultados e inferir conclusões sobre as relações entre as variáveis (Breitkreitz, 2014; Galuszka, 2013).

Assim, o DoE permite obter informações significativas com o menor número possível de experimentos, controla variáveis indesejadas, aumentando a confiabilidade dos resultados, reduz custos e tempo, concentrando esforços nas variáveis mais relevantes, facilita a busca por condições

ideais para um processo ou sistema e possibilita extrapolar resultados para diferentes condições ou cenários (Breitkreitz, 2014; Galuszka, 2013).

Portanto, o uso de solventes sustentáveis, técnicas miniaturizadas e planejamentos fatoriais, indubitavelmente caracterizam um avanço para a Química de Produtos Naturais e para a Química Analítica Verde. Além disso, tais metodologias abrem caminho para novas perspectivas acerca da ideia de eficiência analítica, considerando as concepções atuais sobre desenvolvimento sustentável.

Nesse sentido, a nanotecnologia representa um campo crucial na pesquisa moderna, dedicado à síntese, design e manipulação da estrutura de partículas com tamanhos variando de aproximadamente 1 a 100 nanômetros (Salem e Fouda, 2011). Nessa faixa de tamanho, as propriedades químicas, físicas e biológicas do material sofrem alterações significativas em comparação com sua forma a granel, permitindo sua aplicação em diversas áreas tecnológicas, como eletrônica, energia, remediação ambiental e medicina (Abbasi et al., 2023; Szczyglewska et al., 2023).

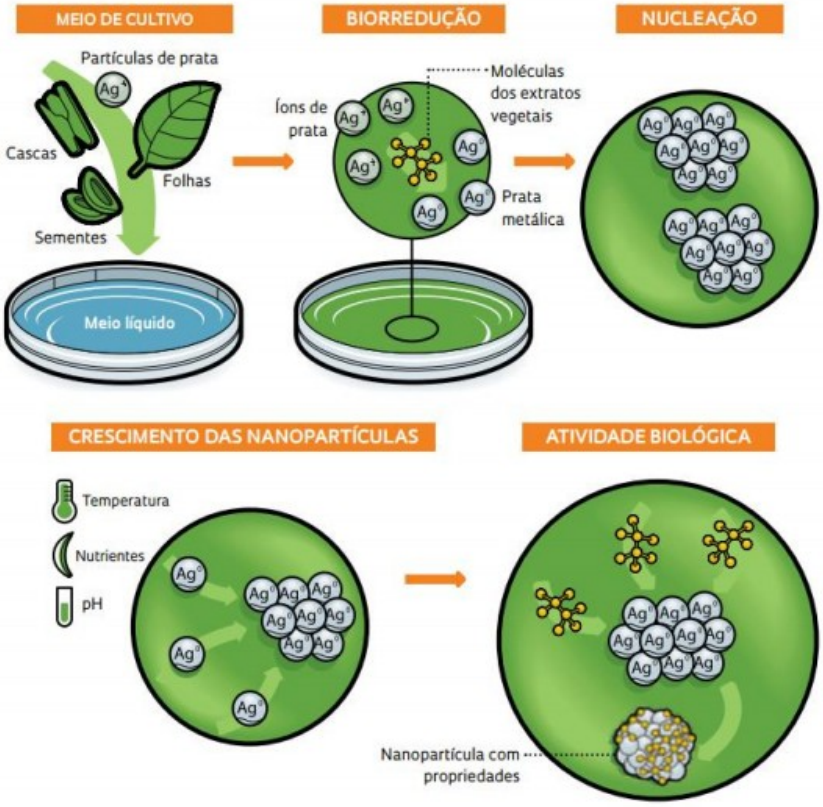
As abordagens atuais para a síntese de nanopartículas (NPs) são dispendiosas e podem gerar substâncias potencialmente tóxicas, exigindo a redução do risco de contaminação. Diante dessas limitações, a pesquisa se volta para métodos ecológicos e sustentáveis, destacando a síntese verde (Khan et al., 2022).

A síntese verde de NPs metálicas utiliza precursores biológicos, como fungos, bactérias, algas e plantas (Singh, et al., 2018). Entre os métodos verdes, a utilização de extratos vegetais ganha destaque devido à sua simplicidade, eficiência de produção, escalonamento fácil e viabilidade econômica, sendo considerado o método mais vantajoso para aplicações industriais em comparação com sínteses mediadas por bactérias e/ou fungos (Khan et al., 2022).

Em reações utilizando os resíduos vegetais, os fitoquímicos presentes nos extratos da cana-de-açúcar, flavonóides, terpenóides, açúcares, cetonas, aldeídos e ácidos carboxílicos são responsáveis pela biorredução dos íons metálicos e estabilização das NPs formadas durante o processo e sua estabilização via solvatação (Ebrahiminezhad et al., 2018; Singh, Harjeet et al., 2023).

Nestas sínteses, o extrato vegetal é misturado a uma solução precursora contendo o sal metálico desejado e de acordo com os fitoquímicos presentes em solução, concentração das soluções precursoras, pH, temperatura e tempo de reação pode-se promover alterações na taxa de nucleação/ formação das NPs resultando em materiais de diferentes formas e tamanhos, bem como aumento de rendimento e estabilidade dos produtos formados (Shafey, 2020). A Figura 5 representa o processo de formação de NPs metálicas mediadas por extratos vegetais.

Figura 5 - Formação de NPs metálicas a partir de extratos vegetais



Fonte: Silva (EMBRAPA-CENARGEN), Revista Pesquisa Fapesp, 2014

Portanto, fica evidente a importância de empregar metodologias sustentáveis e dotadas de eficiência e robustez para desenvolver um método eficiente de extração e caracterização de compostos antioxidantes para síntese de nanopartículas, com potencial aplicação em biomateriais.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de extração para a obtenção dos compostos de alto valor presentes nos resíduos agrícolas de *P. dulcis* com a aplicação de princípios da Química Analítica Verde, utilizando NADES como solvente extrator.

2.1 Objeivos específicos

Realizar uma vasta revisão bibliográfica para a escolha dos 3 trabalhos mais citados na base SciFinder que descrevem estratégias para a extração via maceração dinâmica de compostos bioativos em resíduos de amêndoa. Reproduzir com adaptações dos trabalhos de referência para analisar os compostos presentes no casco (*hull*) e casca (*shell*) de *P. dulcis.*

Elaborar uma triagem das extrações por MAE, utilizando os NADES, previamente preparados, para determinar o solvente de melhor seletividade e eficiência para extração dos compostos fenólicos presentes nas matrizes citadas. Após a escolha do melhor NADES, desenvolvolver um planejamento experimental para otimização do método utilizando Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), avaliado em um nível de confiança de 95% e através da Análise de Variância (ANOVA) para confirmar o ajuste dos modelos multivariados propostos e sua capacidade preditiva.

Quantificar e comparar a performance extratora do método desenvolvido com os métodos de referência; e por fim, aplicar o extrato na síntese de nanopartículas metálicas.

3. METODOLOGIA

3.1. Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados neste estudo estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 - Reagentes e solventes

	Pureza (≥ %)	**Marca**	**País**
Acetona	Grau analítico	Synth	Brasil
Etanol (EtOH)	Grau HPLC	LiChrosolv	Alemanha
Metanol (MeOH)	Grau HPLC	LiChrosolv	Alemanha
Água Mili-Q	ultrapurificada	Millipore	EUA
Glicerol (GLY)	99,5	Sigma Aldrich	EUA
Glicose (GLU)	99,5	Sigma Aldrich	EUA
Sacarose (SUC)	99,5	Sigma Aldrich	EUA
Ácido Lático (LA)	85	Sigma Aldrich	EUA
Sorbitol (SOR)	98	Sigma Aldrich	EUA
Ácido Málico (MA)	98	Sigma Aldrich	EUA
Cloreto de Colina (CL)	98	Sigma Aldrich	EUA
Frutose (FRU)	99	Sigma Aldrich	EUA
Prolina (PRO)	99	Sigma Aldrich	EUA
Mentol (MEN)	99	Sigma Aldrich	EUA
Timol (THY)	99	Sigma Aldrich	EUA
Acetonitrila (ACN)	Grau HPLC	LiChrosolv	Alemanha
Ácido Trifluoracético (TFA)	Grau HPLC	Sigma Aldrich	EUA

Fonte: elaborado pelo autor (2024)

3.2. Obtenção do material vegetal

As amêndoas *in natura* foram fornecidas pelo Prof. Dario Arrua e Profª. Emily Hilder da *University of South Australia* (UniSA), campus de Adelaide-SA.

3.3. Preparação da amostra

O *hull* e o *shell* foram separados, limpos, dispostos em porções iguais e congelados a uma temperatura de -20°C. Posteriormente foram liofilizados em um liofilizador Christ (modelo Alpha 12LDplus) por um período de 7 dias. Após a liofilização, o material resultante foi pulverizado em moinho de facas e separado em partículas de tamanhos entre 250 a 850 μm, faixa de tamanho geralmente recomendada para as preparações relatadas na Farmacopeia Brasileira (2010).

3.4. Extrações de referência

Para comparação entre a quantidade de compostos fenólicos presentes nos resíduos (*hull* e *shell*), foram reproduzidos, com adaptações, os 3 métodos de extração de metabólitos secundários de resíduos de amêndoas mais citados na literatura que utilizaram extração por maceração dinâmica: Pinelo e col. (2004) utilizam metanol e água em pH ácido como solventes extratores, Rubilar e col. (2007) utilizam etanol e Meshkini (2016) utiliza acetona/H_2O. Além disso, foi realizada uma extração hidroetanólica (7:3, v/v) (método mais comum para compostos fenólicos recomendados pela Farmacopeia Brasileira). As extrações foram adaptadas para microescala e realizadas utilizando um agitador magnético Heidolph® com temperatura controlada, de acordo com as temperaturas informadas nos trabalhos.

Após a maceração dinâmica os extratos foram centrifugados em mini-centrífuga a uma velocidade de 7200 RPM (BioPet®). Cerca de 1 mL de sobrenadante foi filtrado em microfiltro de PTFE de 0,45 m (Phenomenex®) em vials de 2mL para posterior análises no sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a Detector de Arranjo de fotoDiodos (CLAE-DAD).

3.5. Avaliação dos resíduos quanto à presença de compostos fenólicos

A análise dos resíduos *hull* e *shell* foi realizada por meio da interpretação de cromatogramas e espectros UV em diversos métodos de extração. Adicionalmente, foi realizada análise em CLAE acoplado ao espectômetro de massas, além de consultas na literatura científica para identificar e caracterizar os compostos presentes nesses resíduos.

A análise cromatográfica permitiu a identificação de padrões de retenção característicos, fornecendo informações valiosas sobre a composição química dos resíduos. Os espectros UV e Massas, por sua vez, foram essenciais para a confirmação e caracterização de compostos específicos, oferecendo insights sobre as propriedades moleculares dos componentes presentes.

Além das análises instrumentais, a revisão da literatura desempenhou um papel crucial na contextualização e identificação de compostos previamente relatados em resíduos *hull* e *shell*. Essa abordagem integrada, combinando métodos analíticos avançados e conhecimento prévio da literatura, proporcionou uma avaliação abrangente e precisa dos compostos presentes nos resíduos em estudo.

3.6. Sistema CLAE - DAD

As análises por CLAE-DAD foram inicialmente realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (mistura a baixa pressão) da marca Shimadzu (bomba LC-20AT, de gaseificador

DGU-20A5R, amostrador SIL-20HT, forno de coluna CTA-10AS VP e interface CBM-20A), equipado com uma coluna Luna (2) C_{18} - Phenomenex (250x4.6m), e um detector de arranjo de fotodiodos (DAD, SPD-M20A), utilizando como fase móvel água+0,5% TFA e acetonitrila, nos canais A e B respectivamente. As amostras foram analisadas em sistema gradiente exploratório com variação de B de 5% a 100% em 60 minutos, vazão de 1 mL min^{-1} e temperatura do forno de 30°C (método adaptado de Snyder; Kirkland; Glajch, 1997).

3.7. Identificação dos compostos presentes no extrato hidroetanólico do casco da amêndoa

Os compostos foram identificados por espectros UV obtidos no sistema CLAE-DAD (citados na seção anterior) e por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS).

As análises de LC-HRMS foram realizadas em cromatografia líquida de alta eficiência Agilent 1200 LC-6520 QTOF com ionização por eletrospray (ESI), fonte em modo negativo, tensão capilar de 3,5 kV, fluxo de gás de secagem de 10 L/h; nebulizador era de 45 psig; a temperatura do gás de dessolvatação foi de 280 °C e a voltagem do fragmentador de 155 V. O N_2 foi usado como gás de dessolvatação; o argônio foi usado como gás de colisão. A versão do MassHunter O software B.07 (Agilent ®) foi utilizado para adquirir e processar os dados experimentais.

3.8. Preparação dos Solventes Eutéticos Naturais (NADES)

A preparação dos NADES foi baseada na metodologia de Gomez et al. (2018) via micro-ondas que consiste em submeter a mistura a radiação micro-ondas, variando e otimizando parâmetros como o tempo, temperatura e potência. Dois ou três componentes de partida com razões molares específicas (Tabela 1) foram colocados em vials de borossilicato (4 cm d.i., 5 mL), introduzidos em tubos de Teflon (24,5cm x 5cm) do sistema de digestão e as misturas correspondentes foram submetidas à irradiação microondas (Ethos Easy, Milestone SrL, Itália) em baixa potência (200 W) em ciclos de 5 minutos (3 minutos de rampa para atingir a temperatura programada de 40 ou 50 graus seguidos por 2 minutos de irradiação com a temperatura estável). Os ciclos foram repetidos para cada uma das misturas eutéticas até que uma solução homogênea e transparente fosse obtida. A porcentagem de água em massa nos solventes eutéticos foi de 20% (m/m), pois a adição de água em quantidades superiores a informada pode acarretar a quebra das ligações de hidrogênio presentes, isso, por sua vez, leva à dissolução da estrutura supramolecular da mistura eutética, conforme observado em estudos anteriores (Dai et al., 2016; Gutiérrez et al., 2009). Além disso, Wei et al. (2015) também observaram que a adição de 20% de água a um NADES resultou em um significativo aumento na capacidade de extração de metabólitos de

diferentes polaridades devido a redução da viscosidade dos NADES, possibilitando uma melhor difusão nos poros celulares e, consequentemente, melhorando as extrações (Fraige et al., 2018; Dai et al., 2015; Bonacci et al., 2020). Por essa razão, neste estudo, optou-se por adicionar 20% de água em relação à massa total dos NADES hidrofílicos avaliados.

Tabela 1 - Composição dos solventes eutéticos naturais (NADES) preparados

NADES	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Razão molar	% H_2O
N1	MA	SOR		1:1	20
N2	MA	GLU	FRU	1:1:1	20
N3	LA	SUC		2:1	20
N4	LA	GLU		2:1	20
N5	CL	SOR		1:2	20
N6	CL	GLU		1:1	20
N7	PRO	MA		1:1	20
N8	GLY	CL		2:1	20
N9	LA	GLY		1:1	20
N10	THY	MEN		1:1	-

Fonte: elaborado pelo autor (2024)

3.9. Extração assistida por microondas (MAE)

Visando identificar o NADES com maior capacidade extratora, todas as misturas eutéticas estudadas (Tabela 1) foram utilizadas para extração de metabólitos secundários presentes nos resíduos de amêndoas por MAE em triplicatas. Para cada 0,1 g de extrato do casco de *P. dulcis* foi adicionado 1mL de NADES em vial de borossilicato (4 cm d.i., 5 mL) e introduzido em tubos de Teflon (24,5cm x 5cm) do sistema de digestão. Todas as extrações foram irradiadas por 60 minutos (10 minutos de rampa para atingir a temperatura programada seguidos por 50 minutos de irradiação com a temperatura estável), a 50ºC e 500W. Os extratos foram centrifugadas em microcentrífuga (Biopet Technologies, Brasil) por 3 minutos em 7200 rpm; esse processo foi realizado 2 vezes para se obter um sobrenadante mais homogêneo. Após a centrifugação, 500 µL de sobrenadante foram coletados, filtrados em microfiltro de 0,45 µm PTFE (Phenomenex, USA). Devido à alta viscosidade da maioria dos NADES, os extratos foram diluídas em EtOH:H_2O (7:3, v/v) de forma que todas apresentassem a mesma concentração final, e foram injetados 50 µL no sistema CLAE nas condições descritas na seção 3.6.

3.10. Planejamento experimental

Um planejamento fatorial completo 2^3 com repetições no ponto central foi realizado para avaliar as variáveis significativas e realizar o teste de curvatura para posterior otimização (Tabela 2).

Tabela 2 - Variáveis independetes planejamento fatorial completo 2^3

	Variáveis	**Níveis**		
		-1	**0**	**1**
X1	Razão material vegetal/NADES (m/v)	0,04	0,07	0,1
X2	Temperatura(°C)	40	51	62
X3	Tempo (min)	15	40	65

Fonte: elaborado pelo autor (2024)

A resposta utilizada neste estudo foi a soma das áreas dos picos cromatográficos referentes aos compostos fenólicos identificados nas análises por CLAE-DAD em λ = 254 nm. Essa mesma resposta foi avaliada com nível de significância de 95%. Em seguida, uma otimização com o planejamento composto central (CCD), utilizando as variáveis significativas, foi realizado para otimizar globalmente as condições de extração.

Os cálculos de análise de variância (ANOVA), e os gráficos de superfície de resposta foram realizados usando o software Statistica 10 (Stat-Ease, Inc, EUA), Excel 2013 (Microsoft, EUA) e Origin 8.5 (OriginLab, EUA).

3.11. Convergência dos métodos estudados com os princípios da Química Analítica Verde

A convergência dos métodos de extração estudados e do desenvolvido neste trabalho foi avaliada, em cada um dos 12 princípios da Química Analítica Verde, de acordo com a métrica AGREE (*Analytical GREEness*) que estipula uma escala de 0 a 1 como pontuação final para os métodos avaliados, sendo que pontuações próximas de 1 (representado pela coloração verde escura) indica que o método possui maior convergência com os princípios da GAC, enquanto que pontuações próximas de 0 indicam menor convergência (Pena-Pereira et al, 2020).

Outro método utilizado foi a métrica GAPI (*Green Analytical Process Index*), que também utiliza pictogramas para classificar o impacto ambiental de cada etapa de um procedimento analítico por meio de uma escala de cores, com três níveis de avaliação para cada etapa. Esta ferramenta traz cinco pentagramas para avaliar e quantificar como baixo, médio e alto impacto ambiental envolvido em cada etapa da metodologia, utilizando as cores verde, amarelo e vermelho, respectivamente. Cada campo reflete um aspecto diferente do procedimento analítico descrito e é preenchido em verde se determinados requisitos forem atendidos conforme os princípios da GAC (Płotka-Wasylka, 2018; Płotka-Wasylka, Wojnowski, 2021).

3.12. Síntese de nanopartúclas metálicas

As nanopartículas metálicas foram preparadas pelo Prof. Dr. Fenelon Martinho Lima Pontes, do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Unesp, a partir de uma mistura que engloba a solução aquosa dos precursores metálicos ($AgNO_3$, H_2PtCl_4 e $HAuCl_4$), juntamente com uma solução aquosa contendo o extrato da casco da amêndoa. A mistura foi agitada à temperatura ambiente, em um reator, com sistema de refrigeração à 23°C, catalisada pela lâmpa de LED 467 nm (Figura 6), visando obter nanopartículas metálicas com elevada cristalinidade, dispersão e estabilidade (Figura 7).

Figura 6 - Sistema experimental para síntese de NPs metálicas

Fonte: elaborado pelo Prof. Dr. Fenelon M. L. Pontes (2024)

Figura 7 - NPs Pt, NPs Ag, NPs Au respectivamente

Fonte: elaborado pelo Prof. Dr. Fenelon M. L. Pontes (2024)

A formação das NPs metálicas foram determinadas por meio de medidas de absorbância em um espectrofotômetro UV-Vis Agilent/HP 8453, na faixa de 300-900 nm e medidas de DRX realizadas utilizando o método do pó, em um equipamento RIGAKU, modelo Mineflex 600, operado nas condições 40 kV e 15 mA cuja fonte de radiação é um cátodo de Cu (λ = 1,54056 Å) a uma velocidade de 5º/min entre os ângulos de 10º a 80º em 2θ.

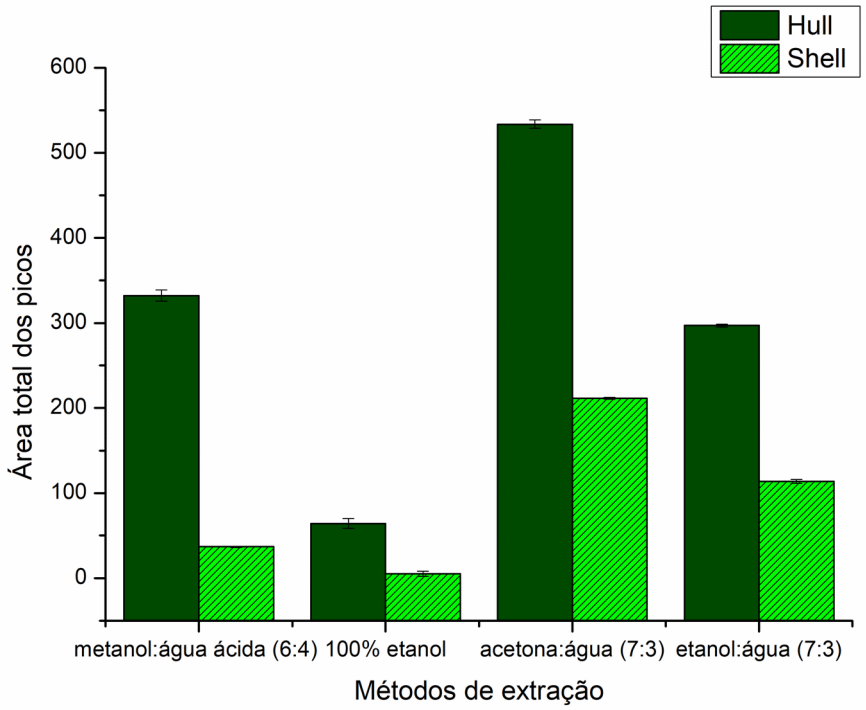
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Comparação Hull e shell

Os extratos preparados baseado nas referências foram analisados por CLAE-DAD, conforme as condições descritas na seção 3.6, a área total das bandas cromatográficas dos compostos fenólicos identificados foi obtida com o objetivo de comparar a extração mais eficiente da literatura e assim nortear o desenvolvimento do método de extração com NADES. O método de integração realizado descontou o os picos referentes aos solventes.

A partir dos resultados obtidos nas análises, observou-se que o *hull* apresentou maior área total de integração dos picos cromatográficos do que o *shell* (Figura 8, apêncide B e C) em todos os métodos extração replicados. Como o método de extração é direcionado para compostos fenólicos, esse pode ser um indicativo de que o *hull* apresenta maior quantidade de compostos de interesse neste estudo do que o *shell*. Entre as extrações da liteartura, a de Meshkini (2016), que utiliza acetona/H_2O como solução extratora foi a que apresentou maior área total das bandas cromatográficas (Figura 8).

Figura 8 - Comparação das extrações dos compostos bioativos no *hull* e *shell*



Fonte: elaborado pelo autor no software Origin 8.5 (2024)

Esses resultados corroboram com relatos da literatura que descrevem que a casca (*shell*) apresenta um alto teor de xilana, que pode ser fracionado em celulose, pentosanos e lignina, além da própria holocelulose, lignina e cinzas que juntamente com suas propriedades físicas (inchaço de

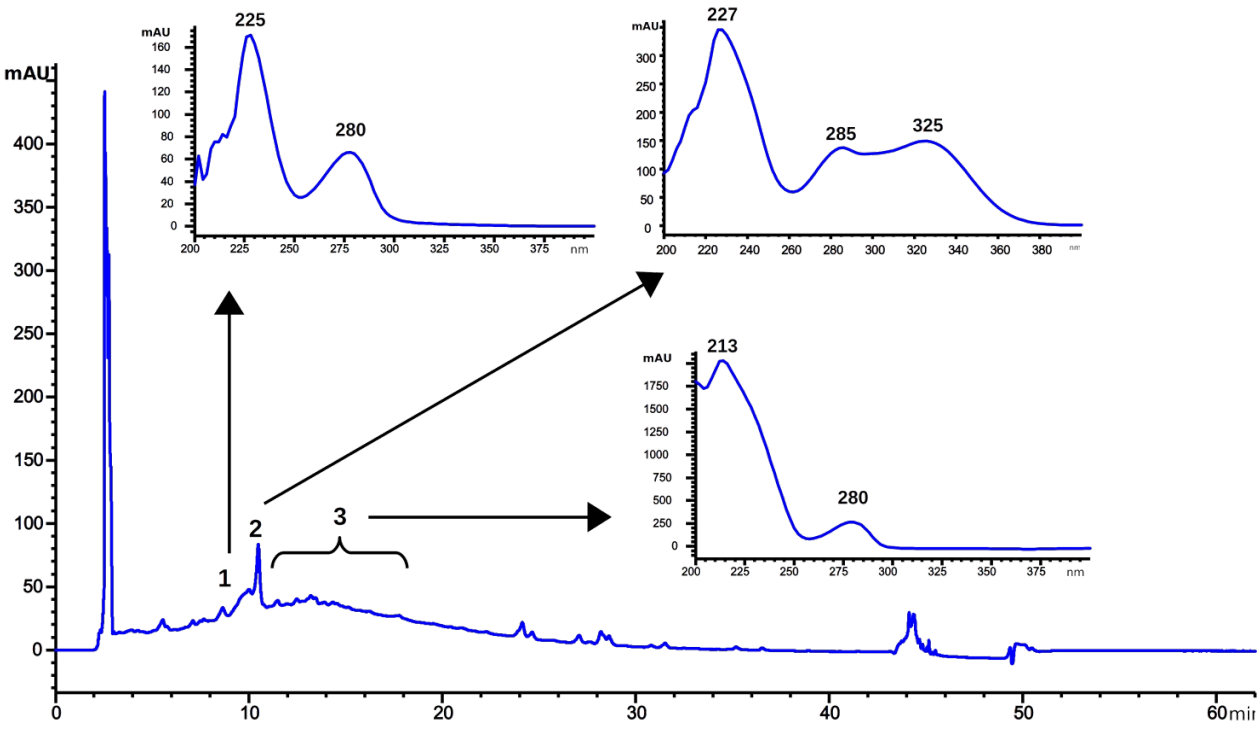
espessura e absorção de água), vem sendo estudado para resistência à água, em que a adição de partículas de casca de amêndoa em madeira aumenta a impermeabilidade dos painéis (Pirayesh; Khazaeian, 2012). Outro papel importante para essa biomassa lignocelulósica presente no *shell* da amêndoa é na síntese na bioenergia e biodiesel, pois essa biomassa é conhecida como carbono orgânico renovável e sua combustão em comparação com derivados do petróleo emite menor quantidade de hidrocarbonetos e monóxidos (Salgado-Ramos,2022).

O casco (*hull*), comparado a seus parentes botânicos, apresenta uma quantidade incomum de flavonoides e taninos. Um fator que pode ter contribuído para tal fato é a sua submissão a calor intenso, radiação ultravioleta e infestação por pragas, uma vez que os compostos fenólicos nas plantas possuem a função de proteção. Em estudos em que esses compostos presentes no *hull* foram extraídos com metanol, a análise CLAE-DAD possibilitou identificar derivados do ácido *O*-cafeoilquínico e estes também apresentaram alta atividade antioxidante. Também foram identificados taninos condensados, com estrutura constituída principalmente por unidades de (+)-catequina e (-)-epicatequina ligadas como dímeros ou trímeros, podendo também chegar a oligômeros maiores (Barral-Martinez, 2021).

4.2. Identificação dos compostos presentes no extrato hidroalcoólico do casco da amêndoa

A partir da análise por CLAE-DAD da extração hidroetanólica do casco da amêndoa foi possível identificar classes de compostos-alvo (fenólicos) para avaliar o rendimento das extrações. A identificação foi realizada por comparação de espectros UV e tempo de retenção dos picos presentes no cromatogramas com os dados de padrões autênticos de nossa biblioteca de padrões. As classes identificadas foram: (1) derivado de catequina, (2) derivado de ácido cafeico e (3) taninos condensados (Figura 9).

Figura 9 - Cromatograma do extrato hidroetanólico da casca da amêndoa (*hull*), monitorado à 254 nm e espectro UV dos compostos (condições descritas na seção 3.6)



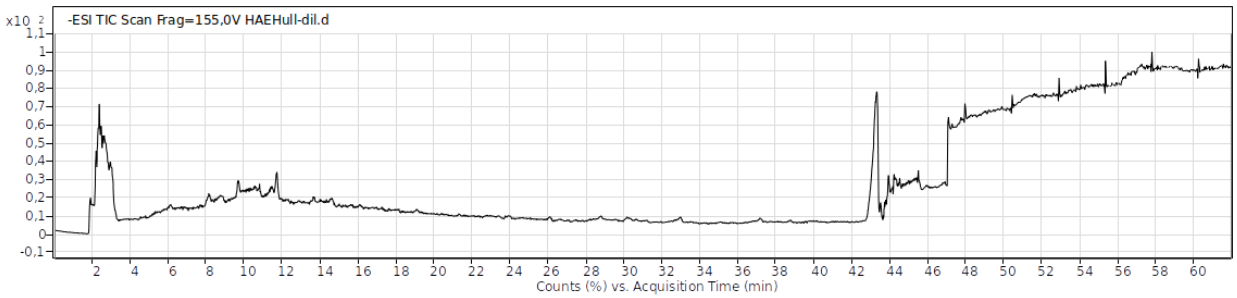
Fonte: elaborado pelo autor (2024)

Os espectros de massa obtidos nas análises realizadas por LC-HRMS foram analisados para identificação dos compostos, cujas classes foram observadas por análise por CLAE-DAD.

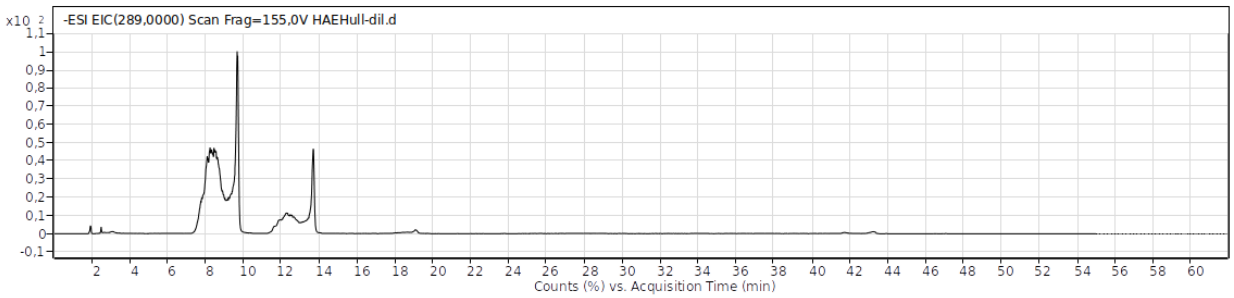
É possível observar nos cromatogramas dos íons extraídos em modo negativo (Figura 10) que na ativação de baixa voltagem capilar, as moléculas desprotonadas ($[M - H]^-$), usando dissociação induzida por colisão, pertencem a uma série homóloga de Proantocianidinas do tipo B com grau de polimerização de 1 a 5 unidades interligadas de catequina (Figura 11, Rodrigues et al., 2007).

Figura 10 - Cromatogramas de LC-HRMS do hull da amêndoa do Extrato Hidroetanólico: a) corrente de íons totais; b) monitorado em m/z 289; c) monitorado em m/z 577; d) monitorado a m/z 865 e e) monitorado a m/z 1153 (condições de CLAE-DAD, 3.6)

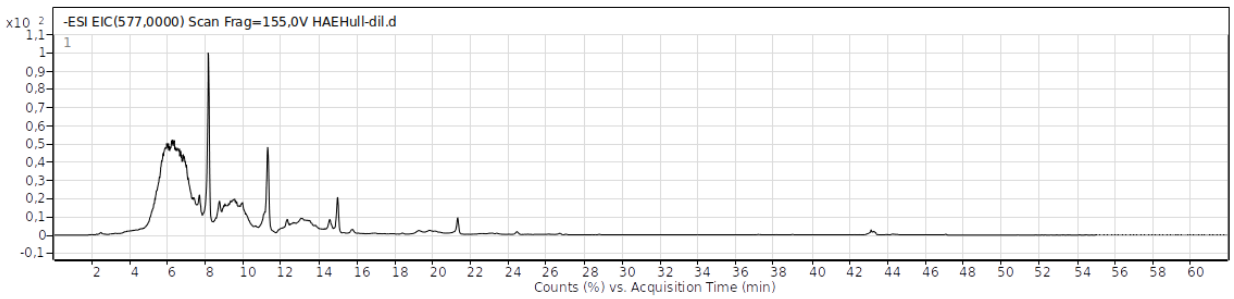
a)



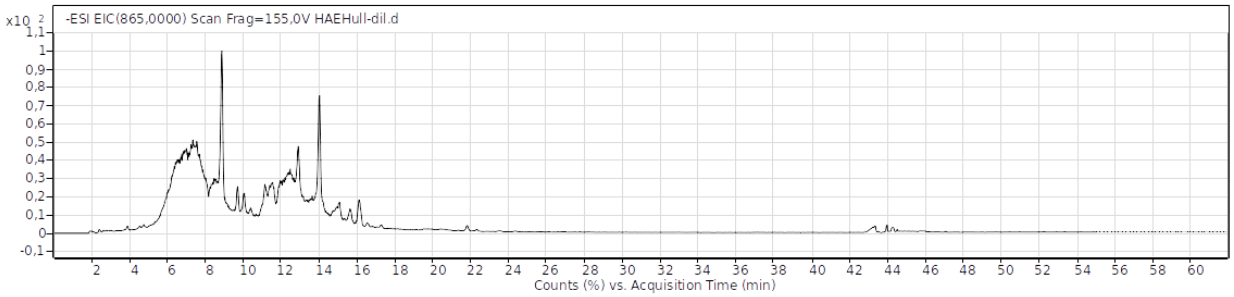
b)



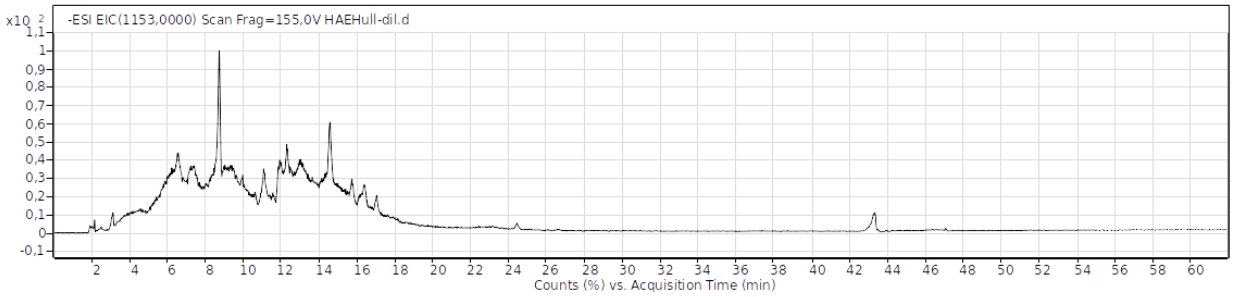
c)



d)

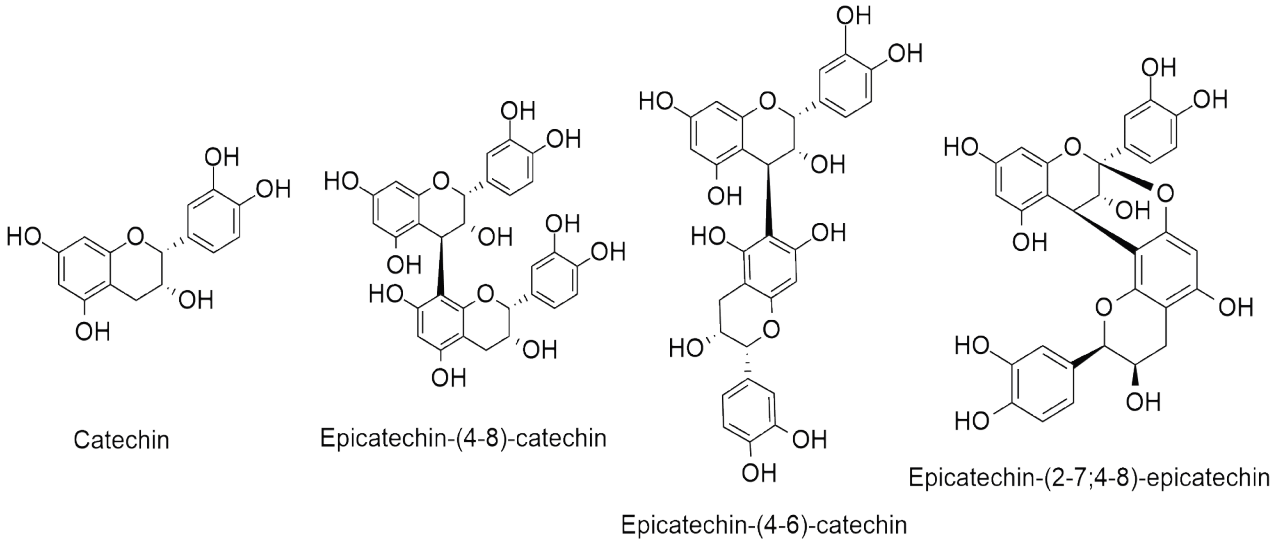


e)



Fonte: elaborado pelo autor (2024)

Figura 11 - Estruturas químicas da catequina e proantocianidinas diméricas tipo B: 1 epicatequina-(4→8)-catequina, 2 epicatequina-(4→6)-catequina e proantocianidina dimérica tipo A, 3 epicatequina-(2→7;4→8)-epicatequina



Fonte: adaptado de Rodrigues et al., 2007

O íon m/z 289 (monômero de catequina) está presente com maior intensidade relativa no tempo de retenção de 9 min, o que pode sugerir a presença do monômero de catequina ou epicatequina. Como o número de unidades de polimerização aumenta, há um aumento no tempo de retenção, o que sugere que os taninos estão presentes nas regiões de 4 a 20 min. O número de unidades monoméricas foi observado nos espectros das respectivas picos cromatográficos de acordo com a Tabela 3 e apêndices D e E.

Tabela 3 - Compostos referentes aos íos observados

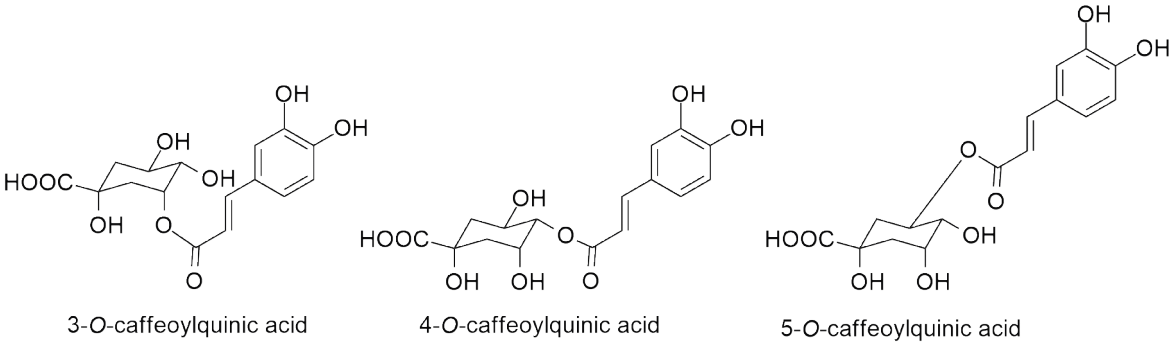
Fragmento (m/z)	Composto
289.0715	Monômero catequina/epicatequina
577.1346	Dímero catequina/epicatequina
865.1979	Trímero catequina/epicatequina
1153.2609	Tetrâmero catequina/epicatequina
1441.3240	Pentâmero catequina/epicatequina
353.0872	Ácido cafeiolquínico

Fonte: elaborado pelo autor (2024)

Portanto, o pico cromatográfico 1 (9 min) pode pertencer a uma catequina/epicatequina monômero e absorções de 4 a 20 min representam taninos de 2 a 5 unidades. No pico

cromatográfico 2, cujo espectro UV representa um derivado do ácido cafeico, foi observada a presença do íon m/z 353 ($[M - H]^-$), o que sugere a presença de ácido cafeoilquínico (Figura 12).

Figura 12 - Estrutura dos ácidos *o*-cafeiolquinicos



Fonte: elaborado pelo autor (2024)

4.3. Solventes Eutéticos Naturais (NADES)

Os solventes eutéticos preparados apresentaram diferentes aspectos (Quadro 2; Figura 13) devido às suas diferentes polaridades, viscosidades, composições e capacidades de solubilização. Majoritariamente, apresentaram moderada ou elevada viscosidade aparente (mesmo contendo 20% de água em massa), com exceção dos NADES compostos por glicerol (N8, glicerol e cloreto de colina 2:1; N9, ácido lático e glicerol 1:1) e o NADES hidrofóbico (N10), composto por timol e mentol (1:1).

Quadro 2 - Aspecto dos NADES preparados

NADES	Componentes	Viscosidade aparente	Coloração
N1	MA: SOR 1:1	Muito viscoso	Incolor
N2	MA: GLU: FRU 1:1:1	Muito viscoso	Levemente amarelado
N3	LA: SUC 2:1	Moderadamente viscoso	Levemente amarelado
N4	LA: GLU 2:1	Moderadamente viscoso	Incolor
N5	CL: SOR 1:2	Moderadamente viscoso	Incolor
N6	CL: GLU 1:1	Moderadamente viscoso	Incolor
N7	PRO: MA 1:1	Moderadamente viscoso	Levemente amarelado
N8	GLY: CL 2:1	Pouco viscoso	Incolor
N9	LA: GLY 1:1	Pouco viscoso	Incolor
N10	THY:MEN 1:1	Pouco viscoso	Levemente amarelado

Fonte: elaborado pelo autor (2024)

Figura 13 - Solventes eutéticos naturais (NADES) preparados (1) MA: SOR (1:1); (2) MA: GLU: FRU (1:1:1); (3) LA: SUC (2:1); (4) LA: GLU (2:1); (5) CL: SOR (1:2); (6) CL: GLU (1:1); (7) PRO: MA (1:1); (10) GLY: CL (2:1); (11) LA: GLY (1:1); (13) THY:MEN (1:1)

Fonte: elaborado pelo autor (2024)

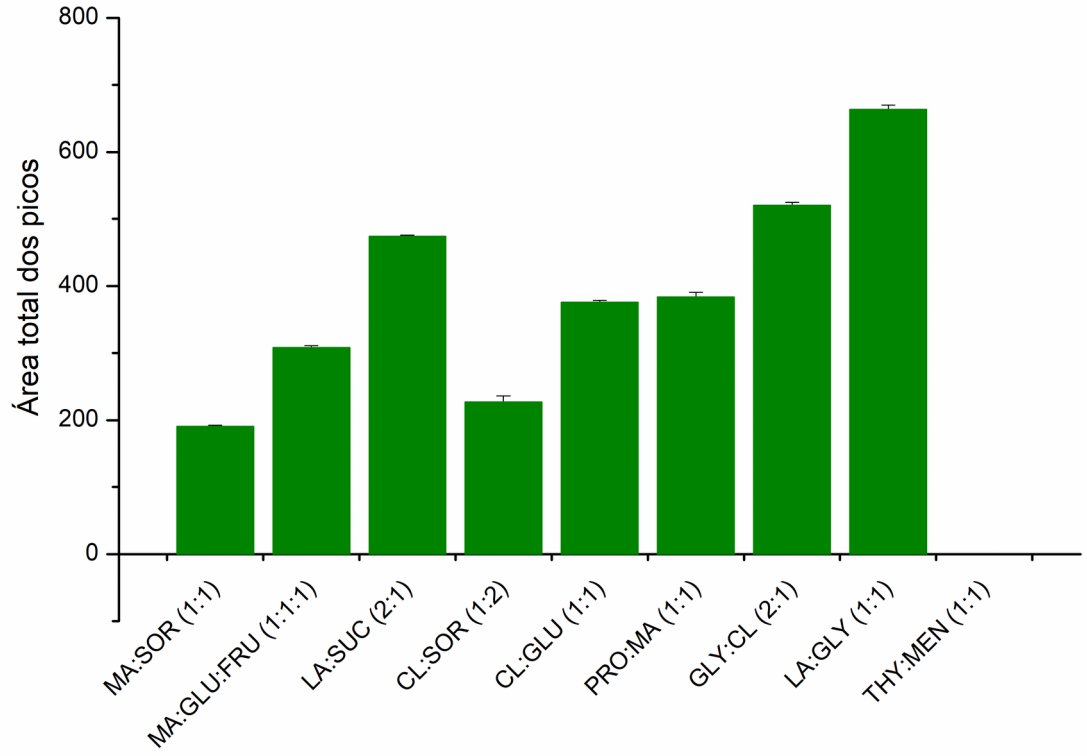
O NADES 4 (ácido lático:glicose 2:1) não apresentou estabilidade no estado líquido, pois após 7 dias voltou ao estado sólido (Figura 13), portanto, o N4 foi retirado do estudos posteriores.

4.4. Extração

O parâmetro norteador para mensurar a performance dos solventes eutéticos preparados, no que se refere à capacidade de extração dos metabólitos presentes nos resíduos de amêndoas foi a soma das áreas dos picos referentes aos compostos fenólicos, presentes nos cromatogramas relativos aos extratos. Com isso, relacionamos que quanto maior a soma das áreas, maior a quantidade dos metabólitos extraídos (Figura 14, apêndice F e G).

É importante ressaltar que para cada extrato analisado foi realizada a análise do NADES puros (branco) para identificar os picos correspondentes aos compostos dos NADES e subtraí-los, posteriormente, da somatória das áreas dos picos dos cromatogramas dos extratos.

Figura 14 - Comparação entre as extrações com os diferentes NADES



Fonte: elaborado pelo autor no software Origin 8.5 (2024)

Os NADES que apresentaram melhor rendimento de extração foram N8 e N9 (Figura 9). Esse resultado pode estar relacionado com o fato dessas misturas (glicerol:cloreto de colina 2:1 e ácido lático:glicerol 1:1) possuírem menor viscosidade do que as outras e ao se aplicar tais misturas como meio extrator, contrariamente aos outros solventes mais viscosos, se perfaz uma superior viabilização do transporte de massas envolvendo tais NADES e, como consequência, se tem uma maior capacidade extratora (Peng et al., 2016; Zainal-Abidin et al., 2017). Apesar de o NADES N10 (timol:mentol 1:1, Tabela 2) também ser pouco viscoso, este não extraiu os metabólitos fenólicos presentes nos cascos de amêndoas, como pode ser observado na Figura 14; tal fato pode estar relacionado com seu caráter hidrofóbico.

As propriedades físicas e químicas do NADES desempenham um papel crucial na sua capacidade de extrair compostos bioativos, bem como na determinação dos tipos de compostos que cada mistura é capaz de extrair. Sua estabilidade térmica permite que sejam utilizados em uma ampla faixa de temperatura em diversas aplicações. A degradação térmica desses solventes ocorre acima de 140°C, essa melhoria na estabilidade térmica pode estar relacionada à interação forte entre o HBA e o HDA, o que confere maior resistência ao sistema eutético (Freitas, 2022).

A viscosidade (η) de um solvente é uma propriedade física importante relacionada à resistência do fluido ao escoamento. Solventes com alta viscosidade têm menor velocidade de fluxo, o que pode torná-los inadequados para certos processos químicos devido à dificuldade de manuseio. A viscosidade também afeta a separação de fases em sistemas imiscíveis e a demanda de energia em processos de engenharia química. Assim, a busca por solventes com baixa viscosidade é essencial para garantir uma melhor processabilidade e eficiência em diversas aplicações industriais (Freitas, 2022).

Para os NADES, as densidades e viscosidades das misturas eutéticas são parâmetros ajustáveis por meio da adição de água. Essa capacidade de ajuste permite tornar as misturas mais fluidas e fáceis de serem manuseadas, o que é fundamental em diversos processos industriais (Wei et al., 2015; Li et al., 2015).

Portanto, a análise e o ajuste dessas propriedades físicas e químicas do NADES são fundamentais para otimizar o processo de extração de compostos bioativos e garantir sua eficácia em diversas aplicações industriais. A capacidade de modificar o pH e controlar a densidade e viscosidade tornam o NADES uma escolha promissora e flexível para aplicações específicas na indústria (Freitas, 2022).

Entre os NADES compostos por glicerol:cloreto de colina 2:1 e ácido lático:glicerol 1:1, o N9 foi o que apresentou resposta estatisticamente maior, portanto foi a mistura eutética utilizada no planejamento experimental.

O NADES 9 (GLY:LA) possui um ponto de fusão em torno de 53°C, o que permite seu uso em ambientes de temperaturas negativas sem congelamento, ampliando assim suas possibilidades de aplicação. Além do ponto de fusão, seu pH está de acordo com os valores esperados, uma vez que as misturas eutéticas contendo ácido lático tendem a ser mais ácidas. Estudos demonstram que a adição de uma base pode elevar o pH do NADES de 1 para 7 sem alterar seu estado físico. Essa capacidade de modificar o pH sem afetar a estrutura física das misturas é uma vantagem significativa para diversas aplicações em áreas como produtos farmacêuticos, cosméticos e extração. Ao conter ácido lático em sua composição, correlaciona-se a um processo de extração por catálise ácida, possibilitando a extração de significativas quantidades de compostos bioativos de alto valor agregado. Esse mecanismo de extração, baseado na catálise ácida, permite a liberação eficiente e seletiva desses compostos valiosos presentes na matéria-prima, como, por exemplo, na cortiça (Freitas, 2022).

As interações no NADES ácido lático:glicerol 1:1 foram estudas por Freitas (2022) que evidencia essa interação pela proximidade dos dois componentes da mistura, estabelecendo ligações de hidrogênio entre eles. O estudo demostra a interação espacial entre os prótons H-1 e H-2 da

molécula de glicerol com os prótons H-1' e H-2' do ácido DL-láctico. Essa interação foi complementada por cálculos teóricos DFT, os quais revelaram que a formação das interações de longa distância entre os prótons alifáticos dos dois compostos (por exemplo, H-1 e H-1') depende da presença das pontes de hidrogênio, o que, por sua vez, leva à formação dos solventes eutéticos profundos (NADES).

Essa análise experimental e teórica fornece uma compreensão clara das fortes interações intermoleculares que caracterizam os NADES, comprovando a importância das ligações de hidrogênio entre os constituintes da mistura para a formação desses solventes eutéticos. Essa interação espacial é fundamental para as propriedades e eficácia dos NADES na extração de compostos bioativos.

4.5. Planejamento Experimental

A resposta das análises do planejamento fatorial completo 2^3 com repetição no ponto central para avaliar as variáveis significativas foi a soma das integrações das áreas dos picos referentes aos compostos alvo presentes nos cromatogramas, avaliada a um nível de significância de 95%. O planejamento está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores codificados (reais entre parêntesis) e resposta obtida para o planejamento fatorial completo 2^3

Exp.	**Variáveis Independentes**			**Resposta**
	X_1[a]	**X_2[a]**	**X_3[a]**	**Area total[b] (x 10^5)**
1	-1 (0,04)	-1 (40°C)	-1 (15 min)	348,85
2	+1 (0,1)	-1 (40°C)	-1 (15 min)	184,79
3	-1 (0,04)	+1 (62°C)	-1 (15 min)	513,31
4	+1 (0,1)	+1 (62°C)	-1 (15 min)	128,56
5	-1 (0,04)	-1 (40°C)	+1 (65 min)	242,37
6	+1 (0,1)	-1 (40°C)	+1 (65 min)	184,08
7	-1 (0,04)	+1 (62°C)	+1 (65 min)	633,49
8	+1 (0,1)	+1 (62°C)	+1 (65 min)	108,49
9[c]	0 (0,07)	0 (51°C)	0 (40 min)	258,34
10[c]	0 (0,07)	0 (51°C)	0 (40 min)	194,59
11[c]	0 (0,07)	0 (51°C)	0 (40 min)	220,47
12[c]	0 (0,07)	0 (51°C)	0 (40 min)	212,69
13[c]	0 (0,07)	0 (51°C)	0 (40 min)	189,29

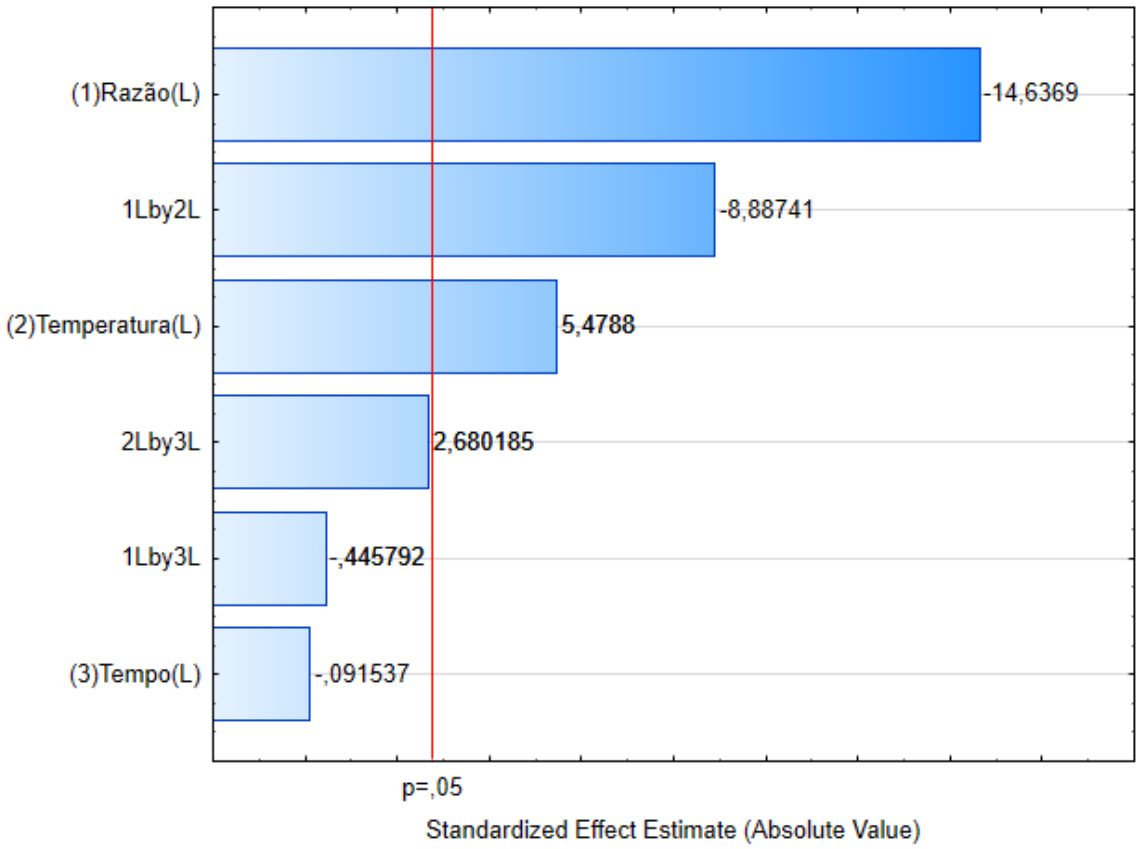
[a]X_1 (Razão planta: NADES, m/v); X_2 (tempretarura, °C); X_3 (tempo de extração, min)
[b]Valores correspondentes a 50 µL de volume de injeção no sistema CLAE
[c]Pontos centrais.

Fonte: elaborado pelo autor (2024)

A partir das respostas obtidas, foi plotado um gráfico de Pareto no programa Statistica 10, no qual foi possível observar os resultados dos efeitos entre os parâmetros estudados. No nível de

confiança avaliado de 95%, as variáveis Razão planta/NADES e Temperatura (X2) afetaram significativamente a resposta e devem estar em seus níveis mais baixo (-) e mais alto (+), respectivamente; a relação tempo (min) não afetou significativamente a resposta (Figura 15).

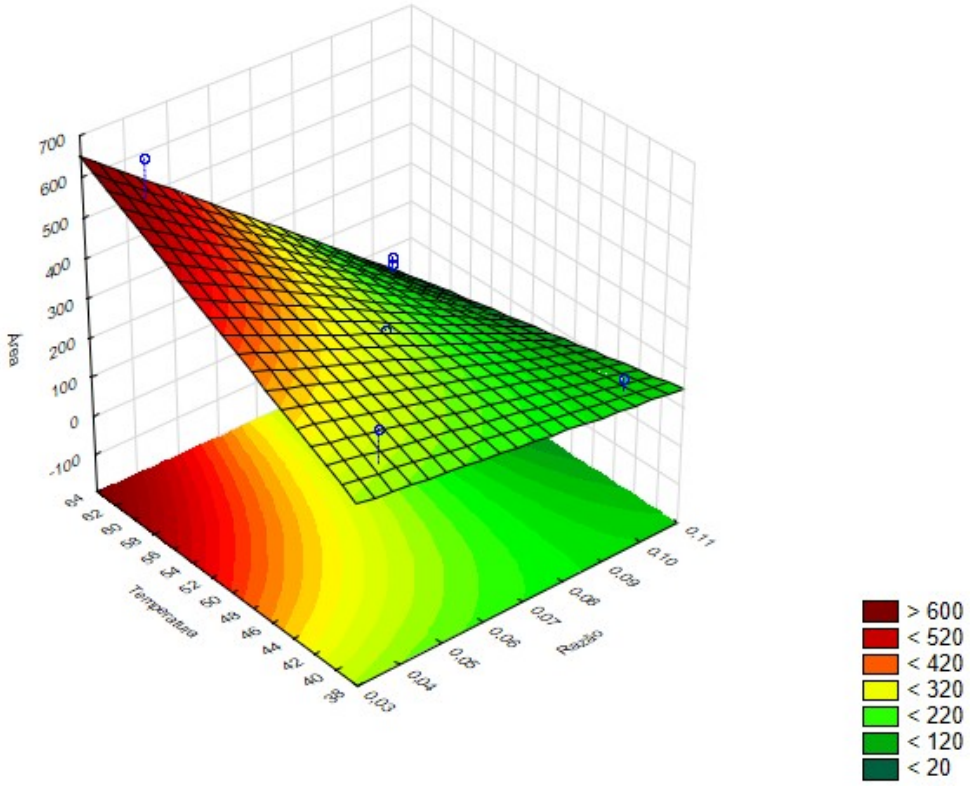
Figura 15 - Gráfico de pareto dos efeitos nas variáveis no planejamento fatorial completo 2^3 **Fonte:**



elaborado pelo autor no software Statistica 10 (2024)

Assim, a superfície de resposta (RSM; Figura 16) e o modelo (Eq. 2) foram calculados de modo que a variável não significativa foi fixada em seu menor valor, sendo a variável X3 fixada em 15 minutos (tempo de extração).

Figura 16 - Superfície de resposta das variáveis significativas do planejamento fatorial completo 2^3



Fonte: elaborado pelo autor no software Statistica 10 (2024)

A partir do gráfico obtido, foi possível calcular o modelo matemático com os valore reais correspondente (Eq. 2).

$$A = 2{,}63.10^7 - 1{,}41.10^7X_1 + 5{,}29.10^6X_2 - 8{,}59.10^7X_1X_2 \text{ (Eq.2)}$$

Onde A é a soma da área total dos picos, X1 é a razão planta:NADES e X2 é a temperatura.

A Análise de Variância (ANOVA) é uma ferramenta estatística essencial para avaliar se um modelo calculado é apropriado para descrever os dados observados experimentalmente. Essa análise compara a variação das respostas com os erros aleatórios, permitindo determinar a significância das relações entre as variáveis do modelo (Barros; Scarmínio; Bruns, 2001).

No caso específico apresentado, o objetivo foi verificar se o modelo de regressão linear é adequado para descrever os dados. A análise foi realizada através da ANOVA.

Na Tabela 5, as médias quadráticas são observadas relacionadas à regressão e aos resíduos. A partir desses valores, é aplicado o teste da Distribuição de Fisher em um nível de confiança de 95%. Os resultados revelaram que o valor do F calculado (8,40) é maior do que o valor do F tabulado (4,88), indicando significância para a regressão. Além disso, foi observado um F calculado (24,98) maior do que o F tabulado (7,71), o que aponta para uma forte significância para a falta de ajuste (Barros; Scarmínio; Bruns, 2001).

Tabela 5 - Análise Variância (ANOVA) para o modelo estimado no planejamento fatorial completo 2^3

ANOVA				Test F		
	Soma quadrática	**Graus de liberdade**	**Média quadrática**	**Calculado**	**Tabulado**	**p-value**
Regressão	$2{,}54x10^{15}$	7	$3{,}64x10^{14}$	8,40	4,88	0,0162
Residuo	$2{,}17x10^{14}$	5	$4{,}33x10^{13}$			
Falta de ajuste	$1{,}87x10^{15}$	1	$1{,}87x10^{14}$	24,98	7,71	0,0075
Erro puro	$2{,}99x10^{13}$	4	$7{,}48x10^{12}$			
Total	$2{,}76x10^{15}$	12				
R^2	0,92					
R^2 ajustado	0,81					
Teste de curvatura						
	Média	**Ec**	**Variância**	**s**	**(+)**	**(-)**
Fatorial	$2{,}93x10^{7}$	$7{,}79x10^{6}$	$2{,}43x10^{12}$	$1{,}56x10^{6}$	$9{,}35x10^{6}$	$6{,}23x10^{6}$
Ponto central	$2{,}15x^{7}$					

Fonte: elaborado pelo autor no software Excel (2024)

Essa falta de ajuste pode ser justificada pelo fato de que o modelo linear não descreve de forma exata os experimentos. Tal inadequação é demonstrada pelo teste de curvatura, o qual indica que há uma curvatura ou não linearidade nos dados que não é capturada pelo modelo de regressão linear. Isso sugere que um modelo mais complexo, que leve em consideração a curvatura presente nos dados, deve ser adotado para uma descrição mais precisa do fenômeno em estudo.

A metodologia de superfícies de resposta é dividida em duas etapas, as quais podem ser repetidas até que a região ótima da superfície investigada seja alcançada. Essas etapas são: modelagem, que envolve o ajuste de modelos simples, e deslocamento, em que a exploração é feita no sentido de máxima inclinação do modelo (Barros; Scarmínio; Bruns, 2001). A partir da superfície de resposta obtida e da análise de variância (ANOVA) realizada nesse planejamento, tornou-se relevante realizar o deslocamento na direção de máxima inclinação. Objetivo do deslocamento é otimizar a resposta, permitindo identificar a região ótima da superfície investigada. Através desses deslocamentos controlados, é possível obter informações relevantes sobre a relação entre as variáveis e a resposta do sistema, contribuindo para a tomada de decisões mais informadas e a melhoria dos resultados alcançados. Para essa finalidade, utilizou-se o modelo descrito na equação 2.

A partir da equação 2, calculou-se *b2/b1*, que resultou em $-1{,}41.10^{7}/5{,}29.10^{6} = -2{,}671$. Isso significa que, para cada recuo na variável X1, deve-se avançar 2.671 unidades na variável X2. Esses deslocamentos foram aplicados, resultando nos experimentos apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Deslocamento de máxima inclinação para o modelo da figura 17

Ensaio	X1	X2	Razão	Temperatura (°C)	Área total (x 10^5)
1	0	0	0,07	51,0	197,64
2	-1	2,671	0,06	60,6	266,65
3	-2	5,342	0,05	70,2	384,61
4	-3	8,013	0,04	79,8	343,91
5	-5	13,355	0,02	99,1	262,13

Fonte: elaborado pelo autor no software Excel (2024)

Com base nos resultados obtidos no deslocamento e no gráfico de Pareto (Figura 16), foi realizado um novo planejamento fatorial completo, utilizando apenas as variáveis significativas (razão e temperatura). Posteriormente, foram conduzidos os experimentos dos pontos axiais, transformando-o em um planejamento composto central (CCD) que considera o modelo quadrático.

Esse novo planejamento foi desenvolvido com o objetivo de aprimorar a compreensão das relações entre as variáveis relevantes e a resposta do sistema. Ao utilizar somente as variáveis que se mostraram significativas na análise anterior, busca-se reduzir a complexidade do experimento, focando nos fatores mais relevantes e economizando recursos. A inclusão dos pontos axiais no planejamento composto central possibilita a obtenção de informações adicionais sobre a curvatura da superfície de resposta, visto que o modelo quadrático é capaz de capturar não-linearidades nas relações entre as variáveis.

A Tabela 7 apresenta os detalhes dos experimentos planejados, os quais permitirão uma análise mais aprofundada da região de interesse da superfície de resposta, proporcionando uma melhor compreensão do comportamento do sistema em estudo. Essa abordagem metodológica visa otimizar a obtenção de informações relevantes, contribuindo para a tomada de decisões mais embasadas e a obtenção de melhores resultados na investigação em questão.

Tabela 7 - Valores codificados (reais entre parêntesis) e resposta obtida para o planejamento composto central

Exp.	Variáveis Independentes		Respostas
	X1[a]	X2[a] (°C)	Área Total [b] (x 10^5)
1	-1 (0,02)	-1 (45)	200,21
2	+1 (0,06)	-1 (45)	193,83
3	-1 (0,02)	+1 (65)	348,66
4	+1 (0,06)	+1 (65)	198,07
PC	0 (0,04)	0 (55)	277,01
PC	0 (0,04)	0 (55)	281,04
PC	0 (0,04)	0 (55)	310,13
5	-α (0,01)	0 (55)	256,82

6	+α (0,07)	0 (55)	197,90
7	0 (0,04)	-α (41)	168,80
8	0 (0,04)	+α (69)	238,92

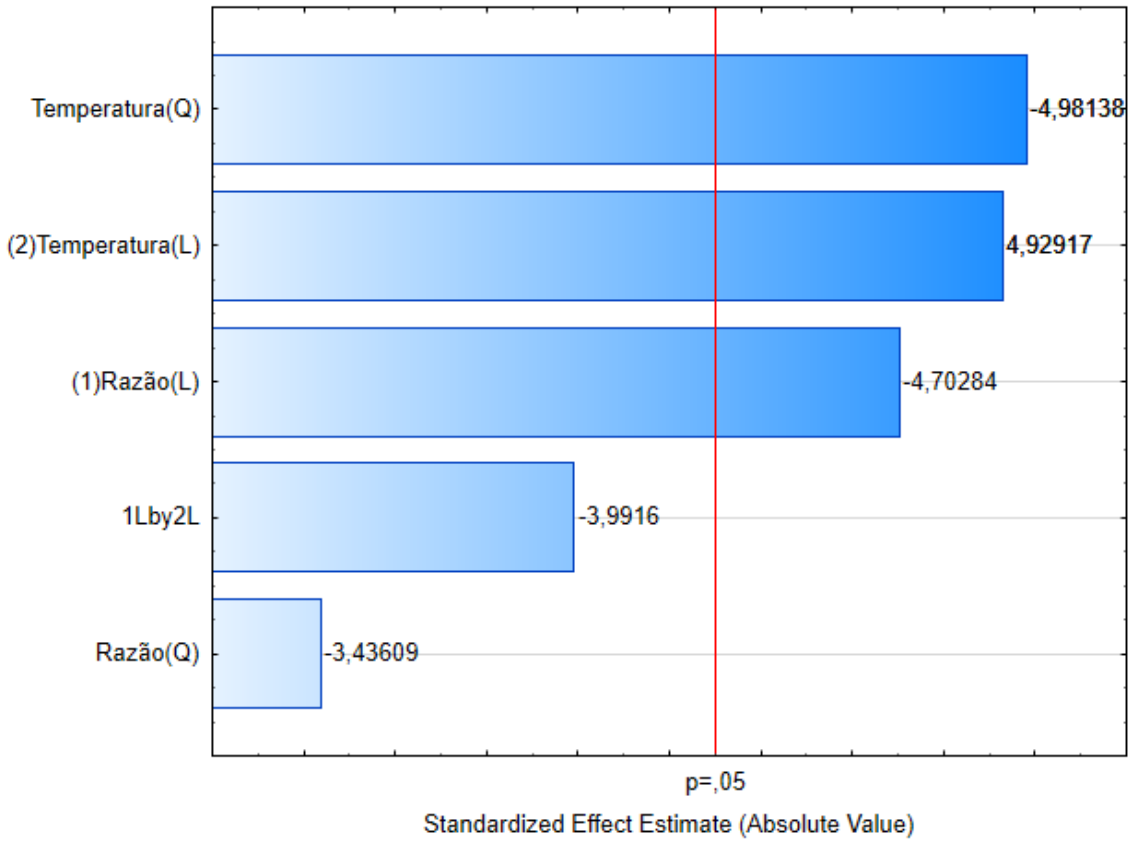
[a]X1 (Razão de material vegetal: NADES, m/m); X2 (Temperatura, °C)

[b]Valores referentes a volume de injeção de 50 µL no sistema CLAE)

Fonte: elaborado pelo autor no software Excel (2024)

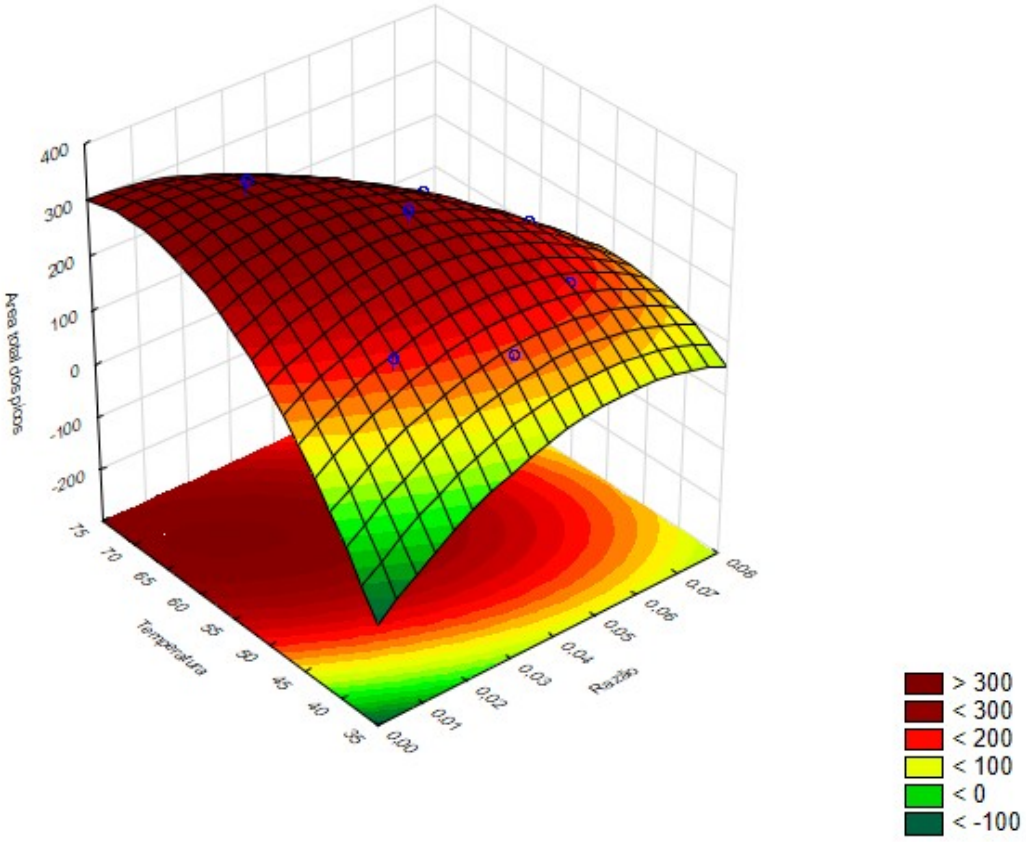
A partir dos resultados obtidos no planejamento composto central, novamente realizou-se a plotagem do gráfico de Pareto e superfície de resposta, apresentadas nas Figuras 17 e 18 respectivamente.

Figura 17 - Gráfico de pareto do CCD



Fonte: elaborado pelo autor no software Statistica 10 (2024)

Figura 18 - Superfície de resposta obtina para o CCD



Fonte: elaborado pelo autor no software Statistica 10 (2024)

A partir do gráfico obtido, foi possível calcular o modelo matemático correspondente (Eq. 3).

$$A = 2.89x10^{7} + 2.80x10^{6}X_1 – 2.65x10^{6}X_2 – 3.60x10^{6}X_{23} -3,04x10^{6}X_1^{2} -2,21x10^{6}X_2^{2} \text{ (Eq.3)}$$

Onde A é a soma da área total dos picos, X1 é a razão planta:NADES e X2 é a temperatura.

Ao realizar a ANOVA para o CCD (Central Composite Design) (Tabela 8), foram calculadas as médias quadráticas relacionadas à regressão e aos resíduos. Com base nesses valores, foi aplicado o teste da Distribuição de Fisher em um nível de confiança de 95%. Os resultados revelaram o seguinte: (1) O valor do F calculado (12.09) é maior do que o valor do F tabulado (5.05), indicando significância para a regressão. Isso significa que o modelo de regressão utilizado possui relação estatisticamente significativa com os dados observados. (2) O valor do F calculado (1.85) é menor do que o valor do F tabulado (19.16), não apontando significância para a falta de ajuste. Nesse caso, podemos inferir que o modelo se ajusta adequadamente aos dados experimentais, não havendo evidências estatísticas de falta de ajuste significativa.

Adicionalmente, o teste de curvatura foi realizado novamente e indicou a existência de não-linearidades nos dados. Junto com as informações obtidas pela ANOVA, concluiu-se que o modelo quadrático é mais apropriado para representar o comportamento do sistema em estudo, proporcionando uma compreensão mais precisa do sistema e, consequentemente, facilitando a busca pela condição ideal de extração. Portanto, com base nas análises realizadas, o modelo quadrático é considerado adequado para representar a relação entre as variáveis razão e temperatura e a resposta relacionada à extração. Essas informações possibilitam a otimização das variáveis, permitindo obter a melhor condição para o processo de extração.

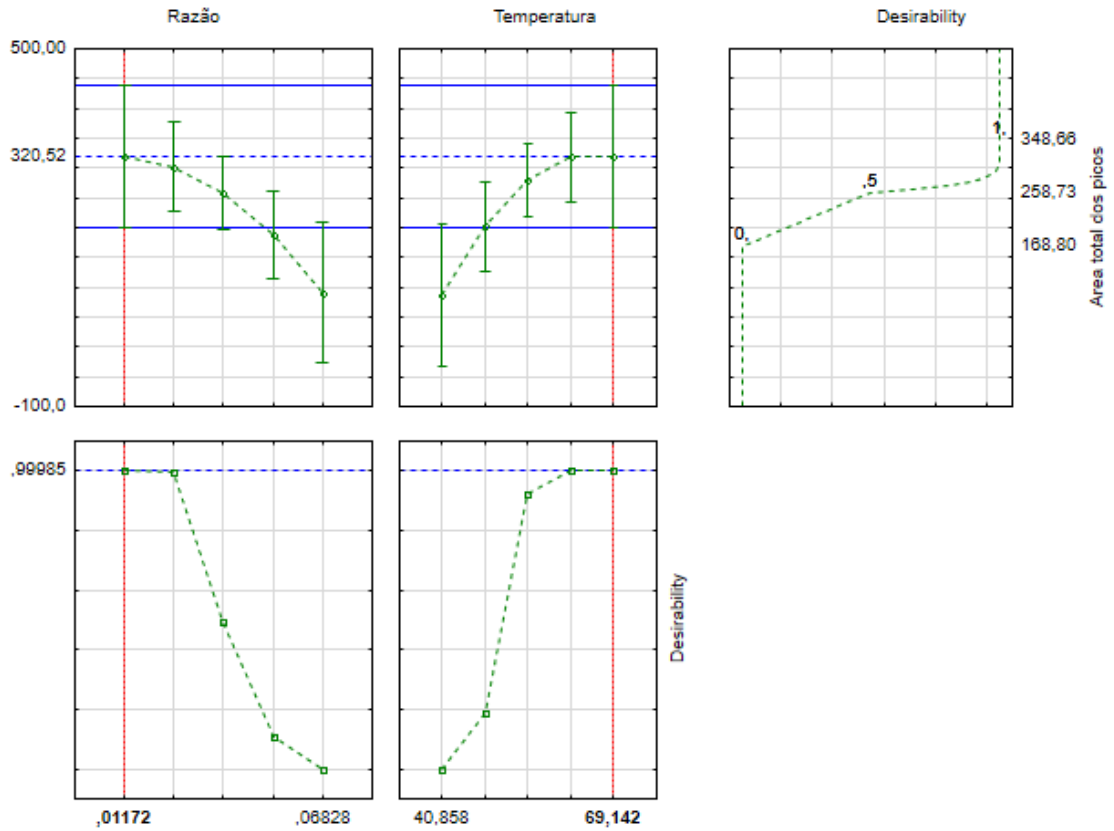
Tabela 8 - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo estimado no planejamento composto central 2^2

ANOVA				**Test F**		
	Soma quadrática	**Graus de liberdade**	**Média quadrática**	**Calculado**	**Tabulado**	**p-value**
Regressão	$2{,}98x10^{14}$	5	$5{,}96x10^{13}$	12,09	5,05	0,008
Resíduo	$2{,}46x10^{13}$	5	$4{,}93x10^{12}$			
Falta de Ajuste	$1{,}81x10^{14}$	3	$6{,}04x10^{12}$	1,85	19,16	0,3696
Erro puro	$6{,}53x10^{13}$	2	$3{,}26x10^{12}$			
Total	$3{,}23x10^{14}$	10				
R^2	0,92					
Teste de curvatura						
	Média	**Ec**	**Variância**	**s**	**(+)**	**(-)**
Fatorial	$2{,}25x10^{7}$	$8{,}48x10^{6}$	$1{,}49x10^{12}$	$1{,}22x10^{6}$	$-5{,}17x10^{6}$	$-7{,}62x10^{6}$
Ponto central	$2{,}89x^{7}$					

Fonte: elaborado pelo autor no software Excel (2024)

Com base na superfície de resposta do modelo quadrático e utilizando a função desejabilidade do software Statistica, foi determinada a melhor condição de extração via MAE, sendo a combinação de parâmetros mais favorável para obter o melhor resultado na extração utilizando o método: (1) Razão de 0,02 (ou seja, uma proporção de 1:50 m/m); (2) Temperatura de 65ºC; (3) Tempo de extração de 15 minutos (fixado anteriormente). Portanto, para a máxima eficiência na extração da substância de interesse, utilizando o NADES GLY:LA, é recomendado seguir essas condições específicas durante o processo de extração.

Figure 19 - Desejabilidade



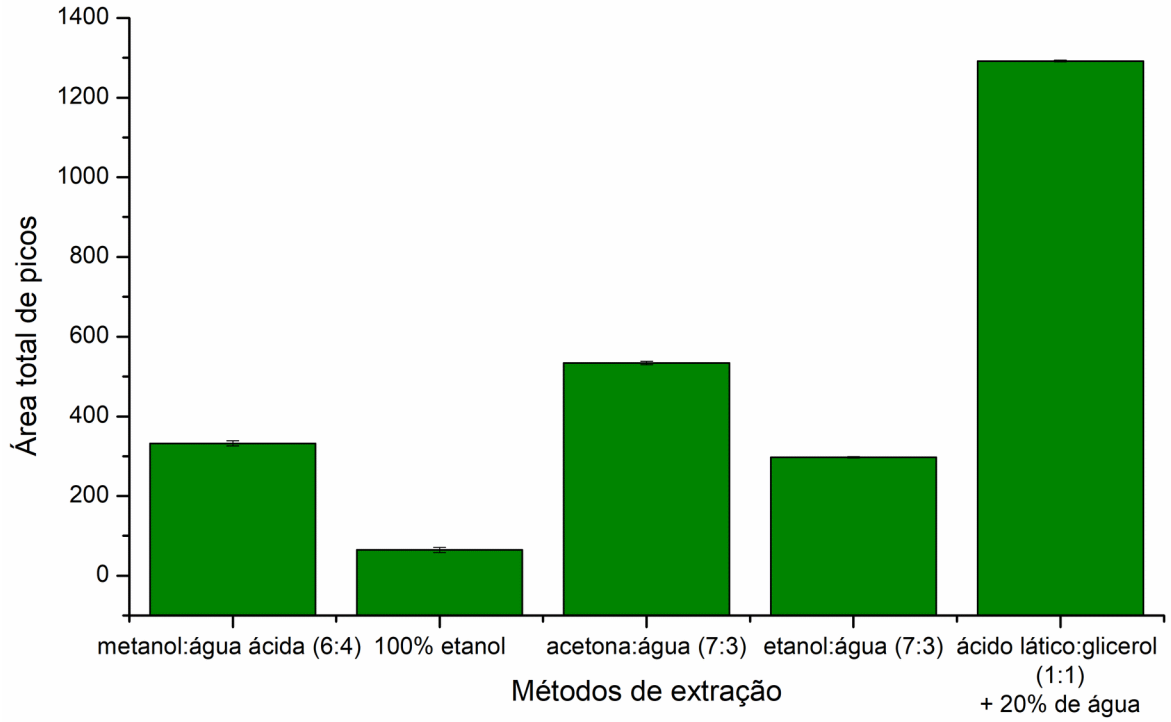
Fonte: elaborado pelo autor no software Statistica 10 (2024)

Para validar o método, foi realizada uma triplicada da extração via MAE utilizando o NADES ácido lático:glicerol (1:1) com 20% de água no qual, a média obtida foi de $343{,}29.10^5 \pm 5{,}46$, validando assim o método desenvolvido.

4.6. Comparação de eficiência e impacto ambiental entre o método desenvolvido otimizado e os métodos de referência

Os métodos da literatura foram comparados com o método desenvolvido utilizando MAE e NADES (N9, ácido lático:glicerol 1:1). Ao analisar o gráfico apresentado na Figura 20, apêndice H, constatou-se que o método desenvolvido se mostrou mais eficiente em relação à área total dos picos cromatográficos dos compostos fenólicos quando comparada às áreas totais do os métodos reproduzidos neste estudo. Embora o método de Meshikini (2016), entre os métodos da literatura, tenha sido o que apresentou maior eficiência, o método verde desenvolvido neste trabalho demonstrou ser aproximadamente 2,4 vezes mais eficiente.

Figura 20 - Comparação da eficiência de extração dos métodos



Fonte: elaborado pelo autor no software Origin 8.5 (2024)

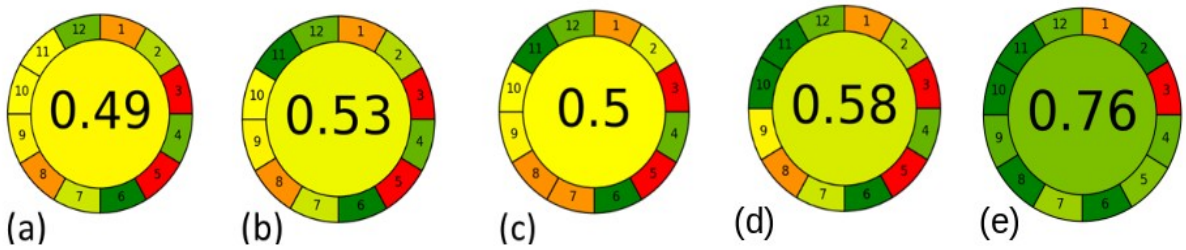
Isso indica que o método que combina MAE com NADES (N9) proporciona resultados superiores em relação à quantificação da área dos picos, tornando-o mais vantajoso em termos de eficiência analítica. A utilização dessa abordagem inovadora pode representar um avanço significativo na extração e quantificação de substâncias de interesse em comparação com os métodos tradicionais da literatura.

Esses resultados sugerem que o método desenvolvido é uma opção promissora e eficiente para análises futuras que envolvam a extração de compostos específicos, podendo ser aplicado em diversas áreas da ciência e da indústria. Contudo, é importante considerar que a escolha do método mais adequado dependerá das características específicas do composto em estudo e das necessidades analíticas do pesquisador.

A primeira métrica utilizada para quantificar o impacto ambiental do método desenvolvido e estabelecer comparações com os métodos de referência foi a AGREE (*Analytical GREenEss Metric*, Pena-Pereira, Wojnowski, Tobiszewski, 2020). A partir dos dados de entrada inseridos para as extrações, o método desenvolvido neste trabalho foi o que apresentou maior caráter verde (Figura 21, apêndice I), ou seja, esses resultados obtidos pela métrica AGREE indicam que o método desenvolvido para a extração de metabólitos nos resíduos de *P. dulcis* por NADES-MAE é o que

apresenta a maior abrangência dos princípios da Química Analítica Verde, podendo ser classificado como um método verde. As maiores pontuações obtidas pela métrica foram alcançadas devido ao fato de o método ser multivariável, ter utilizado solventes de baixa toxicidade e por ter utilizado MAE como técnica de extração, que proporciona uma baixa demanda energética e alta eficiência extratora. As penalidades aplicadas nos princípios 1 e 3 estão relacionadas a (1) tratamento da amostra no qual ocorre um pré-tratamento da amostra externa e posterior análise, quando os valores mais próximos a 1,0 neste princípio se dão por sensoriamento remoto, e amostragem em campo, o que não ocorre neste caso, devido a necessidade de levar a amostra para o laboratório para estudo; (3) trata das medições *in-situ*, no qual a amostra é analisada no modo *at-line* (preparo da amostra manual e extração automatizada) e as pontuações mais próximas a 1,0 são *in-line* (preparo da amostra e extração ocorre juntos e de modo completamente automatizado) e a *on-line* (preparo da amostra e extração também automatizados, mas não interligados).

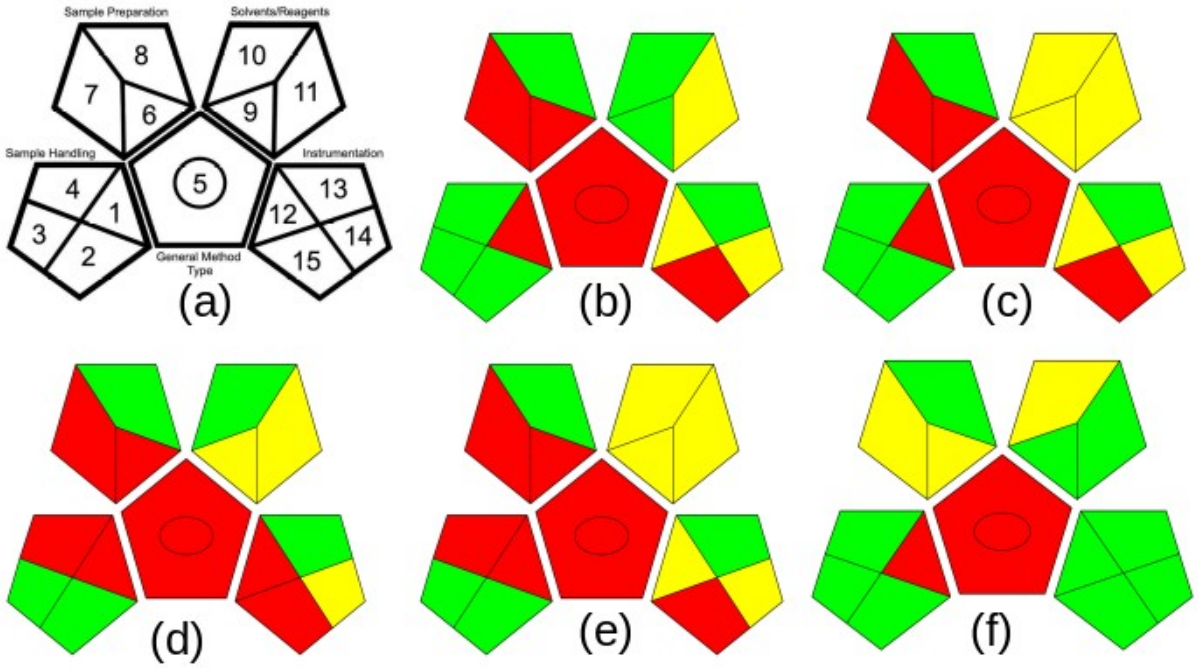
Figura 21 - Pictogramas das pontuações obtidas na métrica AGREE para os métodos de extração: (a) Pinelo et al, 2004; (b) Rubilar et al, 2007; (c) Meshkini, 2016; (d) Fextrato hidroetanólico; (e) método desenvolvido



Fonte: elaborado pelo autor no software AGREE (2024)

Ao analisar os pictogramas obtidos pelo GAPI (Figura 22, apêndice J), verificou-se que o método desenvolvido obteve o maior número de campos preenchidos em verde. Esses campos verdes estão relacionados ao uso de solventes mais ecológicos e seguros, o que torna o método mais sustentável e ambientalmente amigável. As pontuações em amarelo referem-se aos campos 6 (micro extração) que, apesar de ser amarelo por não ser uma nano extração, ainda causa menos impacto ao meio ambiente quando comparado a outros métodos que utilizam macro extração; 7 (solventes verdes) verde seria atribuído apenas em caso de não uso de solventes, portanto os NADES ainda são mais verdes que os outros solventes usados e, finalmente, 10 (saúde) porque o NFPA de um dos componentes do NADES é moderado. Em relação aos campos em vermelho, estes são devidos a (coleta off-line) e 5 (método extração) ambos iguais para todos os métodos porque é extração, 15 (tratamento de resíduos).

Figura 22 - Pictogramas obtidos pela ferramenta GAPI para os métodos de extração: (a) pictogrma referência; (b) Pinelo et al, 2004; (c) Rubilar et al, 2007; (d) Meshkini, 2016; (e) extrato hidroetanólico; (f) método desenvolvido



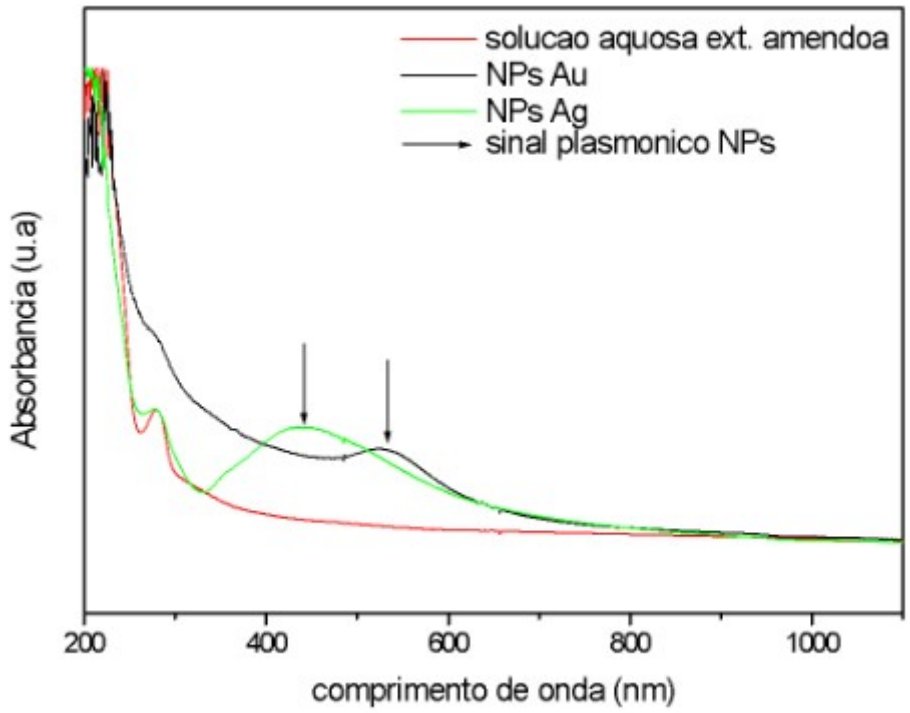
Fonte: elaborado pelo autor no software GAPI (2024)

4.7. Síntese de nanopartículas metálicas

Após a síntese das nanopartículas metálicas, a primeira caracterização foi feita através da análise UV. As nanopartículas interagem com a luz na faixa UV-visível devido ao espalhamento e à absorção. O espalhamento de luz pode ser utilizado para determinar o tamanho médio das nanopartículas, enquanto a absorção está relacionada às propriedades intrínsecas dos materiais constituintes. O tamanho das nanopartículas influencia diretamente as bandas de absorção na região UV-visível. Pequenas variações no tamanho podem resultar em deslocamentos nas bandas de absorção, fornecendo informações sobre a distribuição de tamanhos das nanopartículas. As nanopartículas de ouro e prata exibem bandas de absorção características devido à ressonância de superfície plasmônica. Essas bandas são sensíveis ao tamanho, forma e ambiente local das nanopartículas (Peralta et al., 2023). Assim, foi possível observar na Figura 23 detectada pelos picos de ressonância plasmônica de superfície (SPR) observados em aproximadamente 450 e 550 nm respectivamente. Analisando o deslocamento e a absorção das bandas, os picos de SPR foram ligeiramente deslocados para comprimentos de onda mais longos, o que indica um aumento no tamanho das Ag NPs sintetizados, enquanto as Au NPs indicam um tamanho menor. Além disso,

nos espectros UV-visíveis, o alargamento do pico SPR indicou que os Ag NPS eram polidispersos, e as Au NPs indicam maior uniformidade.

Figure 23 - Espectro UV das NPs metálicas formadas



Fonte: elaborado pelo Prof. Dr. Fenelon M. L. Pontes (2024)

Outra caracterização realizada foi a Análise de Difração de Raios X (DRX) uma técnica analítica para caracterizar nanopartículas em termos de sua estrutura cristalina, tamanho de cristalito, orientação cristalina e possíveis fases presentes. Ela se baseia no fenômeno de difração, onde a luz (raios X, neste caso) incide sobre uma amostra cristalina e produz padrões de difração que podem ser analisados para extrair informações sobre a disposição atômica no material. A equação de Scherrer (Eq. 4) é uma ferramenta matemática essencial na interpretação dos dados de DRX para determinar o tamanho médio dos cristalitos em um material (Peralta et al., 2023).

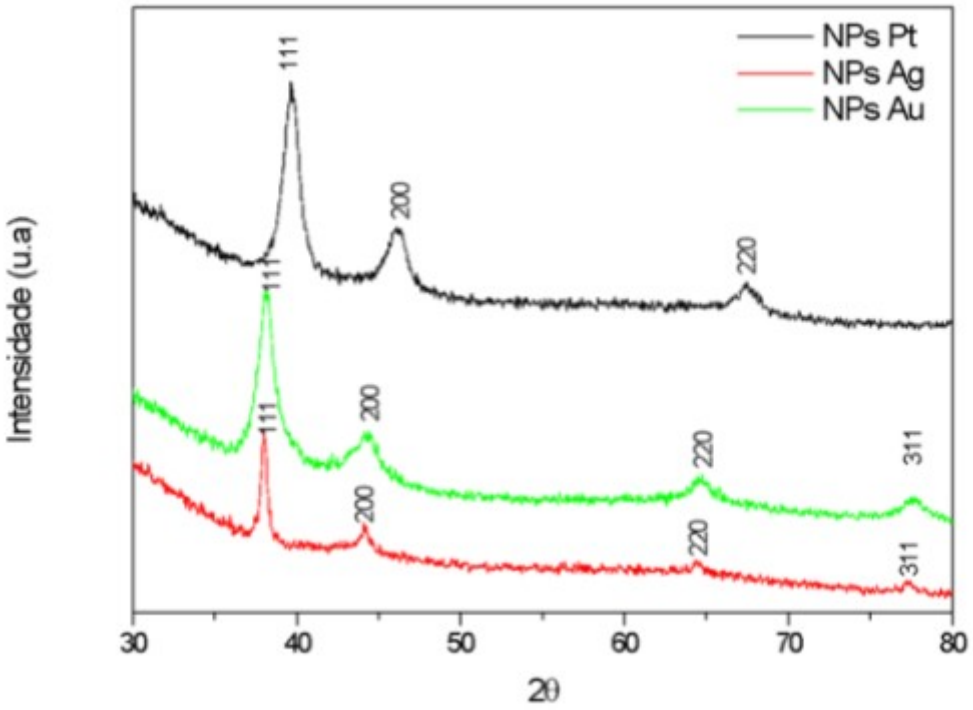
$$D = \frac{K\lambda}{\beta\cos(\theta)} (Eq.4)$$

Onde D é o tamanho médio dos cristalitos; K é uma constante que depende da forma das partículas (esfera = 0,94); λ é o comprimento de onda dos raios X incidentes; β é a largura à meia altura de um pico de difração específico e θ é o ângulo de difração.

Assim, a análise de difração de raios X confirmou a fase cristalina das Pt, Ag e Au NPs sintetizadas. A Figura 24 mostra os padrões de raios X das NPs obtidas pelos três diferentes metais.

Quatro picos de difração foram detectados na faixa 2θ de 30-80°, correspondendo aos planos (111), (200), (220) e (311) da estrutura cúbica de face centrada (FCC) da platina, prata e ouro metálica.

Figura 24 - DRX das NPs metálicas formadas



Fonte: elaborado pelo Prof. Dr. Fenelon M. L. Pontes (2024)

Usando a equação de Scherrer, a partir dos dados de DRX, utilizando o pico 111 foi possível obter o tamanho cristalino das NPs formadas:

NPs Pt ; D_{111}= 8 nm

NPs Au ; D_{111}= 8 nm

NPs Ag ; D_{111}= 22 nm

Essas NPs sintetizadas podem ser conduzidas a uma avaliação do potencial antimicrobiano por meio de testes biológicos, visando à inativação de cepas bacterianas. Ensaios antifúngicos utilizando o fungo *Candida albicans* SC5314, também podem ser elucidados, baseado no trabalho de Peralta, et al., 2023 no qual a adesivo COREGA® com Ag NPs, apresentou excelente atividade antimicrobiana contra biofilmes de *C. albicans*, mantida por até 12 h. Assim, a associação de Ag NPs ao adesivo pode agregar efeitos preventivos ou terapêuticos contra a estomatite protética, a este material protético. Vale destacar que estudos iniciais já foram realizados pelo prof. Dr. Daniel e pelo prof. Dr. Fenelon resultando no artigo publicado recentemente denominado “Silver nanoparticles in denture adhesive: An antimicrobial approach against Candida albicans” (Peralta et al., 2023); no qual independente do período, observou-se inibição da carga fúngica e redução da

atividade metabólica e da massa de biofilme nos espécimes de resina tratados com as combinações AD/Ag NPs, em comparação com AD e PBS. A ação antimicrobiana dos grupos AD + Turk e AD + Ag Gm foi semelhante à do grupo AD + Nyst em todos os períodos e testes de viabilidade, exceto para a massa do biofilme (12 h). O adesivo COREGA® com Ag NPs, principalmente aqueles sintetizados pelos métodos Turkevich e Glycine max, apresentou excelente atividade antimicrobiana contra biofilmes de C. albicans, mantida por até 12 h.

5. CONCLUSÃO

Por meio da análise de parâmetros analíticos e métricas adequadas, foi possível determinar a melhor condição experimental para extração de metabólitos secundários fenólicos do casco de amêndoa, resultando em uma alternativa eficiente e de baixo impacto ambiental para extrair esses compostos de alto valor agregado presentes nos resíduos agrícolas de amêndoa.

O solvente eutético natural, baseado em ácido láctico: glicerol 1:1 (contendo 20% de água), utilizado como solvente extrator, se mostrou uma escolha vantajosa, pois é fácil de preparar, possui baixa viscosidade e pode ser um substituto adequado para os solventes tóxicos convencionais frequentemente utilizados. A abordagem multiparamétrica empregada para otimizar as condições de extração possibilitou a obtenção de uma condição ótima, cuja eficiência foi 2,4 vezes maior do que o método mais eficiente da literatura avaliado neste trabalho.

Além disso, o extrato obtido pelo método verde desenvolvido se mostrou eficiente na síntese verde de nanopartículas metálicas, podendo ser submetidos a testes para aplicação em biomateriais dentários com intuito de induzir atividade antimicrobiana contra biofilmes de *C. Albicans*, agregando efeitos preventivos ou terapêuticos contra a estomatite protética.

Portanto, a implementação de abordagens mais sustentáveis e conscientes para a extração de compostos de interesse pode ser alcançada sem comprometer a eficiência analítica. Isso representa uma importante contribuição para a busca por soluções mais responsáveis e ecologicamente equilibradas no campo da análise química e pode ter implicações significativas para a indústria, a ciência e a sociedade como um todo.

6. REFERÊNCIAS

Abbasi, R. et al. Structural parameters of nanoparticles affecting their toxicity for biomedical applications: a review. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 25, n. 3, p. 43, 27 Mar 2023.

Aguado, R. Et al. Techno-Economic Assessment of a Gasification Plant for Distributed Cogeneration in the Agrifood Sector. **Applied Sciences**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 660, 12 jan. 2021.

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

Barral-Martinez, M. et al. Almond By-Products: Valorization for Sustainability and Competitiveness of the Industry. **Foods**, v. 10, n. 4. 1793, 2021.

Barros, N.B de; Scarminio, I.S; Bruns, R. Como fazer experimentos. Campinas: Unicamp, 2001.

Benvenutti, L; Zielinski, A. A. F.; Ferreira, S. R. S. Which is the best food emerging solvent: il, des or nades?. **Trends In Food Science & Technology**, v. 90, p. 133-146, ago. 2019.

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

Breitkreitz, M. C.; Souza, A. M. de; Poppi, R. J. A didactic chemometrics experiment for design of experiments (DOE): evaluation of experimental conditions in the spectrophotometric 16determination of Iron II with o -phenanthroline. A tutorial, part III. **Química Nova,** v. 37, n. 3, p. 564–573, 2014.

Capasso, F. et al. Active Principles. Phytotherapy, v. 1, p. 31–44, 2003.

Cavalcanti, R. N. et al. Uses and Applications of Extracts from Natural Source. In: Rostagno, M. A.; Prado, J. M. (Eds.). Natural Product Extraction: Principles and Applications. 21. ed. Campinas: The Royal Society of Chemistry, 2013. v. 1p. 1–46.

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

Correa, N, H. Síntese multicomponente de 2,4,5-triarilimidazóis e de 1,2,4,5- tetrarilimidazóis em meio de solventes eutéticos. Trabalho de Conclusão de Curso - Instituto De Química, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2021.

Cvjetko Bubalo, M. et al. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 52–73, 2018

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

Dai, Y. Et al. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta,** v. 766, p. 61-68, mar. 2013[a].

Dai, Yuntao et al. Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from Catharanthus roseus with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. **Journal of Chromatography** A, v. 1434, p. 50–56, 2016.

Dammak, M.I., et al.. Characterization of polysaccharides from Prunus amygdalus peels: antioxidant and antiproliferative activities. : Antioxidant and antiproliferative

activities. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 119, p. 198-206, nov. 2018.

Dhanani, T. et al. Comparison of green extraction methods with conventional extraction method for extract yield, L-DOPA concentration and antioxidant activity of Mucuna pruriens seed. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 8, n. 2, p. 43–48, 2015.

Durand, E.; Lecomte, J.; Villeneuve, P. From green chemistry to nature: The versatile role of low transition temperature mixtures. **Biochimie**, v. 120, p. 119–123, 2016.

Ebrahiminezhad, A. et al. Plant-Mediated Synthesis and Applications of Iron Nanoparticles. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 2, p. 154–168, 2018.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations.** Disponível em: <http://www.fao.org/home/en/ > Acesso em: nov, 2020).

Farmacopeia Brasileira. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

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

Francisco, M; Van Den Bruinhorst, A.; Kroon, M. C. Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents. Angewandte **Chemie - International Edition**, v. 52, n. 11, p. 3074– 3085, 2013.

Freitas, D. S, et al. Green Extraction of Cork Bioactive Compounds Using Natural Deep Eutectic Mixtures. **Acs Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 10, n. 24, p. 7974-7989, 6 jun. 2022.

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

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

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

Galuszka, A.; Migaszewski, Z.; Namieśnik, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical Chemistry,** v.50, p.78-84, 2013.

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

Gonzalez, C. G., et al. Application of natural deep eutectic solvents for the “green”extraction of vanillin from vanilla pods. **Flavour And Fragrance Journal**, v. 33, n. 1, p. 91-96, 4 out. 2017

Graenacher, C. (1934). U. S. Patent No. 1943176. Basel, SWI. United State Patent Office.

Gutiérrez, M. C. et al. Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: A suitable approach to deep eutectic suspensions of selfassembled structures. **Langmuir**, v. 25, n. 10, p. 5509–5515, 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.

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

Khan, F. et al. Green Nanotechnology: Plant-Mediated Nanoparticle Synthesis and Application. **Nanomaterials**. MDPI. , 2022.

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

Li, M; Ngadi, M. O.; Ma, Y. Optimisation of pulsed ultrasonic and microwave-assisted extraction for curcuminoids by response surface methodology and kinetic study. **Food Chemistry**, v. 165, p. 29–34, 2014.

Mehariya, S.; et al. Green extraction of value-added compounds form microalgae: a short review on natural deep eutectic solvents (nades) and related pre-treatments. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 5, p. 105989, out. 2021.

Meshkini, A. Acetone extract of almond hulls provides protection against oxidative damage and membrane protein degradation. **Journal of acupuncture and meridian studies**, v. 9, n. 3, p. 134-142, 2016.

NDFC. Nuts and Dried Fruits. Statistical Yearbook 2021/2022. Disponível em: https://inc.nutfruit.org/inc-releases-2021-2022-statistical-yearbook/. Acesso em: 2024.

ONU. Organização das Nações Unidas. Disponível em: <https://www.un.org/en/>. Acesso em: 2021.

Pena-Pereira, F.; Wojnowski, W.; Tobiszewski, M.. AGREE—Analytical GREEnness Metric Approach and Software. **Analytical Chemistry,** v. 92, n. 14, p. 10076-10082, 2020.

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

Peralta, L. C. F., et al. Silver nanoparticles in denture adhesive: an antimicrobial approach against candida albicans. **Journal Of Dentistry**, [S.L.], v. 131, p. 104445, abr. 2023.

Pinelo, M. et al. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (Prunus amygdalus) and pine sawdust (Pinus pinaster). **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 267-273, 2004.

Pirayesh, H.; Khazaeian, A.. Using almond (Prunus amygdalus L.) shell as a bio-waste resource in wood based composite. **Composites Part B: Engineering**, v. 43, n. 3, p. 1475-1479, 2012.

Płotka-Wasylka, J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. **Talanta**, V. 181, P. 204-209, 2018.

Płotka-Wasylka, J.; Wojnowski, W. Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software. Green Chemistry, v. 23, n. 21, p. 8657-8665, 2021.

Prgomet, I. et al.. Valorization Challenges to Almond Residues: phytochemical composition and functional application. : Phytochemical Composition and Functional Application. **Molecules**, [s.l.], v. 22, n. 10, p. 1774-1801, 20 out. 2017.

Rodrigues et al. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of Hancornia speciosa. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** v. 21, p. 1907–1914, 2007.

Rubilar, M. et al.. Separation and HPLC-MS Identification of Phenolic Antioxidants from Agricultural Residues: almond hulls and grape pomace.: Almond Hulls and Grape Pomace. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 55, n. 25, p. 10101-10109, dez. 2007.

Salem, S e Fouda, A. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Prospective Biotechnological Applications: an Overview. **Biological Trace Element Research**, v. 199, p. 344–370, 2011.

Salgado-Ramos, M. et al. Almond hull biomass: preliminary characterization and development of two alternative valorization routes by applying innovative and sustainable technologies. **Industrial Crops And Products**, v. 179, p. 114697, 2022.

SCOPUS. Elsevier. 2000-2023 [2024]. Disponível em: <https://www-scopus.ez46.periodicos.capes.gov.br/search/form.uri?display=basic>.

Shafey, A. M. El. Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles from plant leaf extracts and their applications: A review. **Green Processing and Synthesis**. [S.l.]: De Gruyter Open Ltd. , 1 Jan 2020.

Silva, L. P. Nanopartículas verdes: Plantas do cerrado são usadas na produção de nanossistemas para controle de patógenos e pragas da agricultura, entre outras aplicações. **Pesquisa Pesquisa FAPESP**, São Paulo (SP), edição 223, 70-73p, setembro 2014.

Singh, H et al. Revisiting the Green Synthesis of Nanoparticles: Uncovering Influences of Plant Extracts as Reducing Agents for Enhanced Synthesis Efficiency and Its Biomedical Applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 18, p. 4727–4750, Ago 2023.

Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L. Practical HPLC method development. 2nd ed. **New York: John Wiley & Sons**, 1997. 765 p.

Souza, O. A. Et al. Eco-friendly and inexpensive food grade bioethanol for Eugenia uniflora L. chromatographic fingerprinting: a trade-off between separation and sustainability. **Phytochemistry Letters**, [S.L.], v. 43, p. 200-207, jun. 2021.

Szczyglewska, P.; Feliczak-guzik, A.; Nowak, I. Nanotechnology– General Aspects: A Chemical Reduction Approach to the Synthesis of Nanoparticles. **Molecules**, v. 28, n. 13, p. 4932, 22 Jun 2023.

Tsukui, A.; Rezende, C. M. Extração Assistida por Micro-ondas e Química Verde. **Revista Virtual de Química**, v. 6, p.1713-1725, 2014.

US Food and Drug Administration. **Guidance for Industry Botanical Drug Product**. Rockville: US Department of Health and Human Services, 2004.

US Food and Drug Administration. **Guidance for Industry Botanical Drug Product**. Rockville: US Department of Health and Human Services, 2004.

Wakte, P. S. et al. Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from Curcuma longa. **Separation and Purification Technology**, v. 79, n. 1, p. 50–55, 2011.

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

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

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

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

Zimmerman, J. B. et al. Designing for a green chemistry future. **Science**, v. 400, n. January, p.397–400, 2020.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Publicações sobre IL, DES e NADES fundamentado na base de dados da SCOPUS.

	Publicações		
Ano	**IL**	**DES**	**NADES**
2000	613	0	0
2001	710	0	0
2002	932	0	0
2003	1151	0	0
2004	1556	1	0
2005	2002	1	0
2006	2481	4	0
2007	2807	4	0
2008	4311	7	0
2009	4664	14	0
2010	4724	29	1
2011	5011	34	3
2012	5505	83	1
2013	6130	112	9
2014	6581	174	12
2015	6502	265	20
2016	6914	349	37
2017	6789	544	57
2018	7111	651	104
2019	6791	926	146
2020	7168	1280	213
2021	7148	1612	306
2022	7523	2201	418
2023	7139	2453	503

Fonte: elaborado pelo autor no softwere Origin 8.5 (2024)

APÊNDICE B – Comparação das extrações no *Hull* e *Shell* com os diferentes métodos de extração

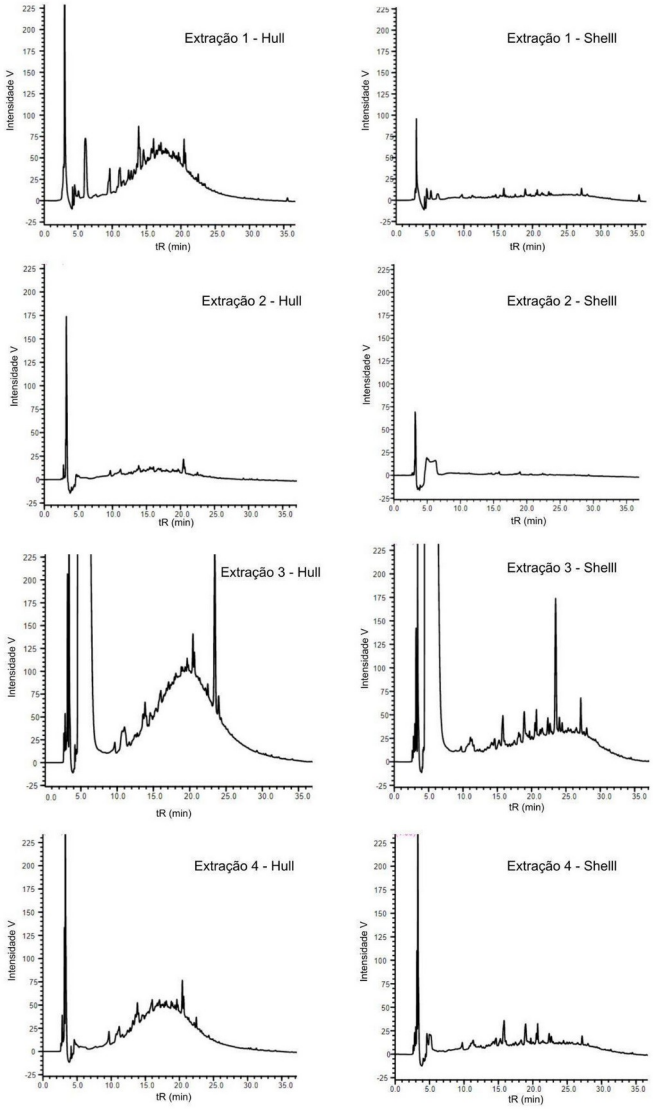
	Hull		***Shell***	
	Área* (.10^5)	**Desvio padrão**	**Área* (.10^5)**	**Desvio padrão**
Pinelo et al., 2004	332,226	6,51	36,936	0,83
Rubilar et al., 2007	64,3226	5,88	5,274	2,92

Meshkini, 2016	533,793	4,91	211,423	0,99
Extrato hidroetanólico	296,915	1,82	113,886	2,32

* Média relativa a triplica

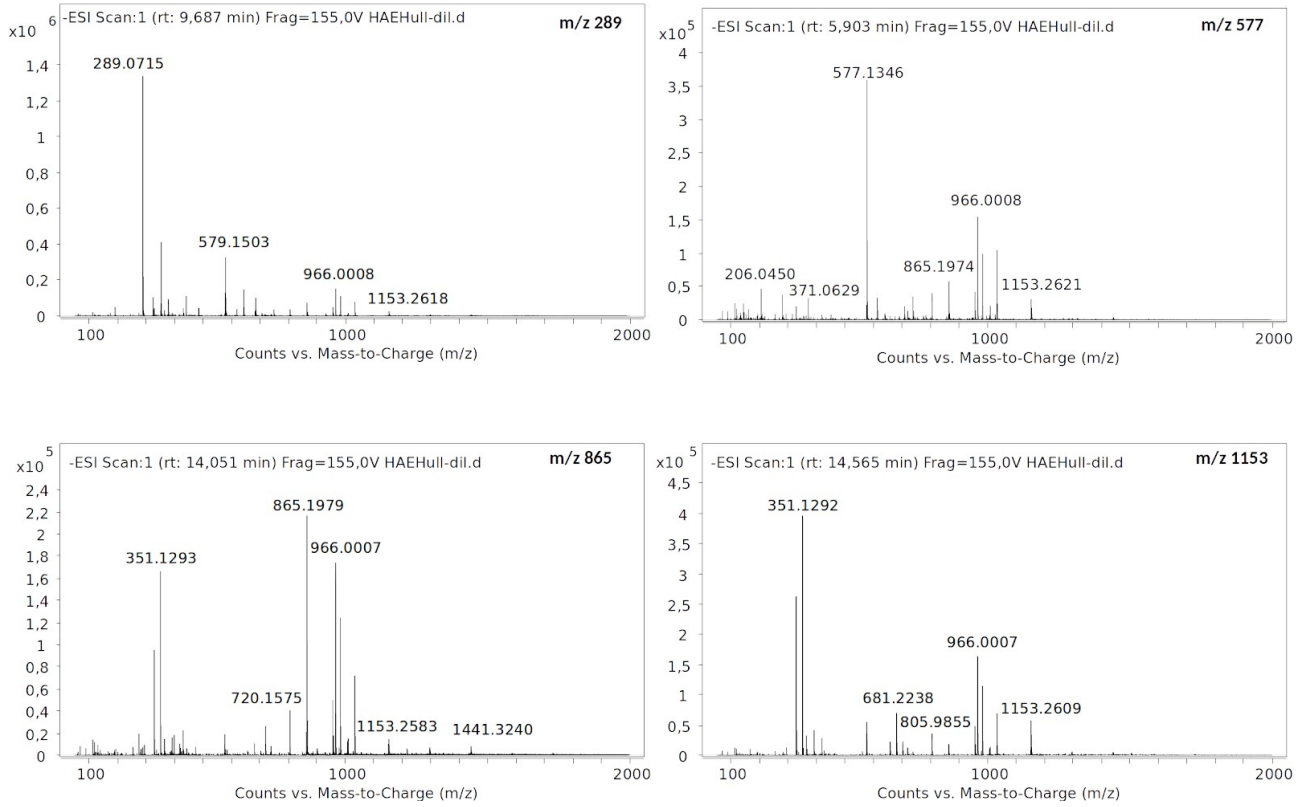
Fonte: elaborado pelo autor no softwere Origin 8.5 (2024)

APÊNDICE C - Cromatograma da análise por CLAE-DAD dos extratos 1, 2, 3 e 4 do casco(*hull*) e casca (*shell*) de P. dulcis, = 254 nm (condições cromatográficas descritas na seção 3.6).



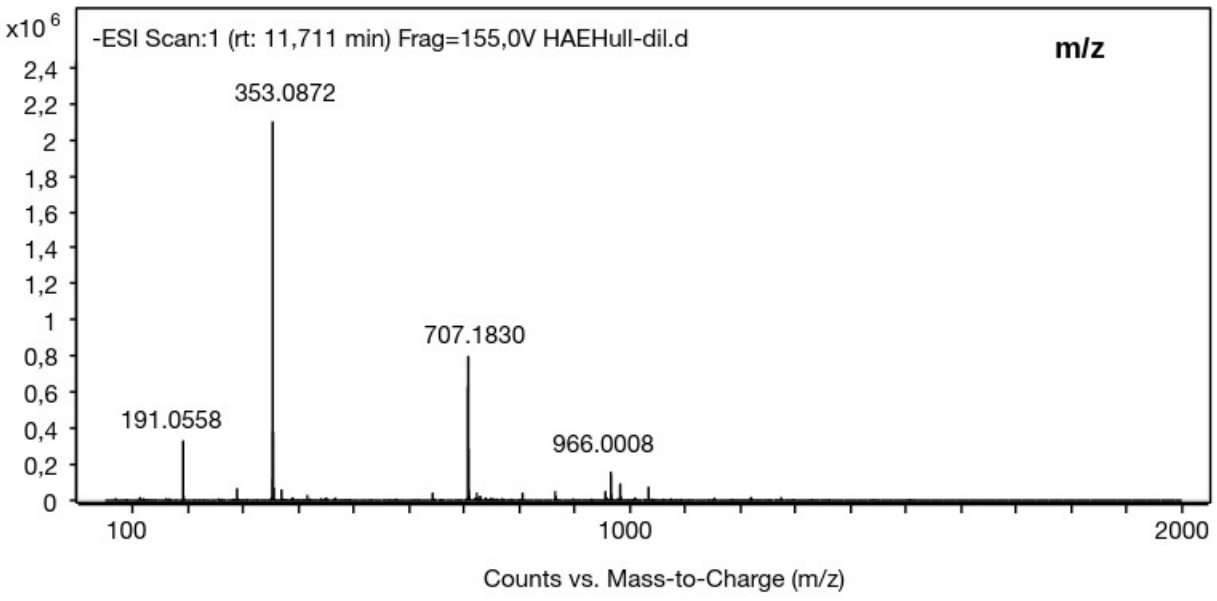
Fonte: elaborado pelo autor (2024)

APÊNDICE D – Espectros de impressão digital de LC-HRMS obtidos no modo de íon negativo do Extrato Hidroetanólico do casco de amêndoa, correspondente às procianidinas.



Fonte: elaborado pelo autor (2024)

APÊNDICE E – Espectros de impressão digital de LC-HRMS obtidos no modo de íon negativo do Extrato Hidroetanólico do casco de amêndoa, correspondente ao ácido caioquínico.



Fonte: elaborado pelo autor (2024)

APÊNDICE F – Eficiência de extração dos diferentes NADES testados

Tabela 9 - Área de extração dos diferentes NADES

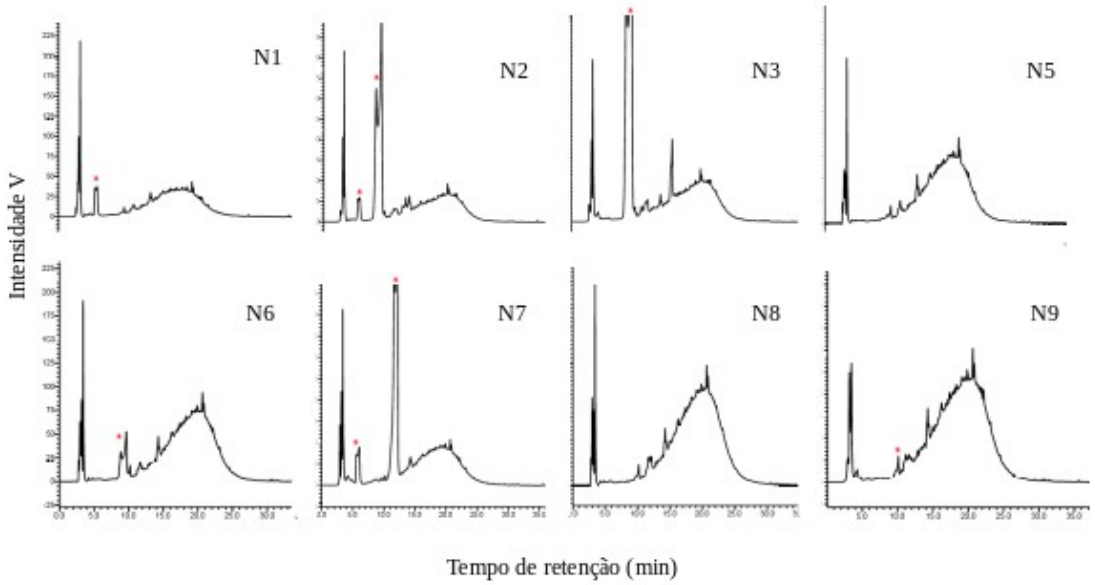
NADES	Área* (.10^5)	Desvio padrão
N1	190,94	1,37
N2	308,76	2,56
N3	474,12	1,61
N5	227,08	8,86
N6	376,19	2,22

N7	383,57	6,82
N8	520,35	4,38
N9	666,37	6,67
N10	0,00	-

* Média relativa a triplica

Fonte: elaborado pelo autor no softwere Origin 8.5 (2024)

APÊNDICE G - Cromatogramas da extrações assistidas por microondas (MAE) da triagem com os diferentes NADES (condições descritas na seção 3.6.)



* - Picos referentes ao NADES

Fonte: elaborado pelo autor (2024)

APÊNDICE H – Eficiência entre os diferentes métodos de extração

Tabela 10 - Área dos diferentes métodos de extração

	Área* (.10^5)	**Desvio padrão**
Pinelo et al., 2004	332,22	6,51
Rubilar et al., 2007	64,33	5,88
Meshkini, 2016	533,79	4,91
Extrato hidroetanólico	296,90	1,82
Método desenvolvido	1291,70	2,17

* Média relativa a triplica

Fonte: elaborado pelo autor no softwere Origin 8.5 (2024)

APÊNDICE I - Parâmetros de entrada no software da métrica AGREE para cálculo do score referente às extrações empregando os métodos de referência e o método desenvolvido

Princípios GAC	Pinelo et al, 2004	Rubilar et al, 2007	Meshkini, 2016	Extrato hidroetanólico	Método Desenvolvido
1 - tratamento da amostra	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
2 - tamanho da amostra	0,65	0,65	0,55	0,65	0,98
3 - medições *in situ*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,33
4 - n° de etapas no preparo da amostra	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
5 - nível de automação e miniaturização	0,0	0,0	0,0	0,0	0,75
6 - derivatização	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
7 - gestão de resíduos	0,6	0,6	0,29	0,6	0,6
8 - métodos multi analitos	0,29	0,29	0,29	0,29	1,0
9 - uso de energia	0,48	0,48	0,48	0,48	0,8
10 - reagentes utilizados	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0
11 - reagentes tóxicos	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
12 - segurança do operador	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8

Fonte: elaborado pelo autor no softwere AGREE (2024)

APÊNDICE J - Parâmetros de entrada no software da métrica GAPI para elucidação dos pictogrmas referente às extrações empregando os métodos de referência e o método desenvolvido

	Pinelo et al, 2004	Rubilar et al, 2007	Meshkini, 2016	Extrato hidroetanólico	Método Desenvolvido
Coleta	off-line	off-line	off-line	off-line	off-line

Preservação	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma
Transporte	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
Armazenamento	Nenhum	Nenhum	Sobre condições especiais	Sobre condições especiais	Nenhum
Tipo de método	Extração	Extração	Extração	Extração	Extração
Escala	Macro	Macro	Macro	Macro	Micro
Solventes	Não verde	Não verde	Não verde	Não verde	Verde
Adicional	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma
Quantidade	<10 mL/g	10 - 100 mL/g	10 - 100 mL/g	10 - 100 mL/g	<10 mL/g
Saúde	NFPA = 0 ou 1	NFPA = 2 ou 3	NFPA = 0 ou 1	NFPA = 2 ou 3	NFPA = 2 ou 3
Segurança	NFPA = 2 ou 3	NFPA = 2 ou 3	NFPA = 2 ou 3	NFPA = 2 ou 3	NFPA = 1 ou 2
Energia	≤1.5 Kw por amostra	≤1.5 Kw por amostra	>1.5 Kw por amostra	≤1.5 Kw por amostra	≤0.1 Kw por amostra
Ocupacional	Vedação hermética	Vedação hermética	Vedação hermética	Vedação hermética	Vedação hermética
Resíduo	1 - 10 mL/g	1 - 10 mL/g	1 - 10 mL/g	1 - 10 mL/g	<1 mL/g
Tratamento de resíduo	Nenhum tratamento	Nenhum tratamento	Nenhum tratamento	Nenhum tratamento	Reciclável

Fonte: elaborado pelo autor no softwere GAPI (2024)