



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS**

LAISE CAPELASSO DA SILVA

Aplicação da extração com líquidos pressurizados para a purificação de compostos bioativos do subproduto da industrialização de maçã (*Malus domestica* Borkh): acoplamento com extração em fase sólida e gradiente de solvente

Application of pressurized liquid extraction for purification of bioactive compounds from apple pomace (*Malus domestica* Borkh): coupling with solid phase extraction and solvent gradient

LIMEIRA

2022

LAISE CAPELASSO DA SILVA

Aplicação da extração com líquidos pressurizados para a purificação de compostos bioativos do subproduto da industrialização de maçã (*Malus domestica* Borkh): acoplamento com extração em fase sólida e gradiente de solvente

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo, na área de Ciências Nutricionais e Metabolismo.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Ariel Rostagno

Coorientadora: Prof. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DE TESE DEFENDIDA PELA ALUNA LAISE CAPELASSO DA SILVA E ORIENTADA PELO PROF. DR. MAURICIO ARIEL ROSTAGNO.

LIMEIRA

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Ana Luiza Clemente de Abreu Valério - CRB 8/10669

Si38a Silva, Laise Capelasso da, 1990-
Aplicação da extração com líquidos pressurizados para a purificação de compostos bioativos do subproduto da industrialização de maçã (*Malus domestica* Borhk) : acoplamento com extração em fase sólida e gradiente de solvente / Laise Capelasso da Silva. – Limeira, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Mauricio Ariel Rostagno.

Coorientador: Adriane Elisabete Antunes de Moraes.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Maçã. 2. Fenólicos. 3. Extração em fase sólida. I. Rostagno, Mauricio Ariel, 1974-. II. Moraes, Adriane Elisabete Antunes de, 1975-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Application of pressurized liquid extraction for purification of bioactive compounds from apple pomace (*Malus domestica* Borhk) : coupling with solid phase extraction and solvent gradient

Palavras-chave em inglês:

Apple

Phenolics

Solid-phase extraction

Área de concentração: Ciências Nutricionais e Metabolismo

Titulação: Doutora em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Mauricio Ariel Rostagno [Orientador]

Julian Martinez

Priscilla Carvalho Veggi

Adarly Kroth

Fernando Moreira Simabuco

Data de defesa: 18-03-2022

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7637-1858>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5841171951496007>

Folha de Aprovação

Autor(a): Laise Capelasso da Silva

Título: Aplicação da extração com líquidos pressurizados para a purificação de compostos bioativos do subproduto da industrialização de maçã (*Malus domestica* Borkh): acoplamento com extração em fase sólida e gradiente de solvente

Natureza: Tese

Área de Concentração: Ciências Nutricionais e Metabolismo

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

Data da Defesa: Limeira-SP, 18 de Março de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Mauricio Ariel Rostagno (orientador)
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dr. Julian Martinez (membro)
Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA/Unicamp

Dra. Priscilla Carvalho Veggi (membro externo)
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Dra. Adarly Kroth (membro externo)
Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC)

Dr. Fernando Moreira Simabuco (membro)
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

DEDICATÓRIA

A Deus e à família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, Poder infinito que nos permite ser quem somos e possuir o que temos; aos meus pais Dulcinéia e Francisco, assim como aos meus avós Dina, Walter, Oswaldo, Esmeralda e José Antônio, pela confiança, dedicação e esforço durante meus anos de estudos; aos meus irmãos consanguíneos, Henrique e Eduardo, pela trajetória de vida; aos meus irmãos de alma, Victor, Felipe e André por todo o carinho e apoio; aos amigos que a cidade de Limeira e a Casa de Oração Amor e Luz me proporcionaram, em especial às queridas Eliete Pfifer, Aline Patini, Elizandra Piza, Márcia Costa e Débora Carreño pelo acolhimento.

Agradeço ao professor orientador Mauricio Ariel Rostagno, pela dedicação e paciência, servindo de exemplo como profissional e pesquisador; à professora coorientadora Adriane Antunes pela dedicação ao trabalho; à professora amiga Rosangela Bezerra pelos conselhos e apoio, tanto na graduação, quanto na pós-graduação; aos colegas do grupo de pesquisa Juliane Viganó, Leonardo Mesquita, Jaísa Chaves, Rodrigo Pizani e Letícia Contiéri pelo auxílio em tudo que precisei durante o desenvolvimento da tese; aos amigos de laboratório e agora, de vida, Mariana Correa, Vitor Sanches, Luiz Salvino, Rodrigo Pereira e Vitor Boico, por terem tornado meus anos de estudos leves e descontraídos.

É uma honra compartilhar minha jornada com vocês!

Por fim, agradeço à FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2019/24537-0), pelo apoio financeiro para realização dessa pesquisa e à Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp, que foi minha segunda casa desde a graduação.

EPÍGRAFE

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana,
seja apenas outra alma humana.”*

Carl G. Jung

RESUMO

O subproduto industrial da maçã possui grande potencial biológico oriundo de compostos fenólicos presentes na fruta. Técnicas de extração e separação destes compostos devem ser aplicadas para melhor aproveitá-los a partir da produção de extratos concentrados e assim, explorar diversas formas de aplicações destes em alimentos. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um método de extração/fracionamento utilizando extração com líquidos pressurizados e em gradiente de solventes acoplado *inline* em extração em fase sólida e *online* com HPLC (2D-PLE-SPE-HPLC-PDA) para a separação e monitoramento em tempo real da extração de compostos fenólicos do bagaço de maçã. Algumas variáveis do processo foram avaliadas, incluindo gradiente de solventes (água e etanol), temperatura (40–80 ° C), adsorvente de extração em fase sólida (Septra, Isolute, Strata X e Oasis) e solvente de ativação/eluição (metanol e etanol). Os melhores resultados foram observados com solventes etanol e água, adsorvente Septra e método em gradiente com vinte minutos de tempo estático e temperatura de 80°C. Os métodos recuperaram, em frações purificadas, compostos de diferentes classes como furufural, hidroximetilfurfural (HMF), ácido gálico/protocateico, ácido clorogênico, epicatequina, derivados de quercetina, rutina, hiperosideo, floretina xilosil glicosídeo e floridzina. Enquanto usava principalmente solventes verdes, o método desenvolvido produziu rendimentos mais altos ou semelhantes de ácidos e flavonoides que os métodos convencionais, se mostrando eficiente em rendimento e separação de compostos da amostra.

Palavras-chave: Bagaço de maçã; Compostos Fenólicos; Extração com líquidos pressurizados; Extração em fase sólida; Gradiente de Solvente.

ABSTRACT

The industrial by-product of apple has great biological potential from the phenolic compounds present in the fruit. Techniques for extracting and separating these compounds must be applied to better use them from the production of concentrated extracts and, thus, explore different forms of application of these in foods. The objective of this work was the development of an extraction/fractionation method using pressurized liquid extraction and solvent gradient coupled inline solid phase extraction and online HPLC (2D-PLE-SPE-HPLC-PDA) for the separation and real-time monitoring the extraction of phenolic compounds from apple pomace. Several process variables were evaluated, including the amount and gradient of solvents (water and ethanol), temperature (40–80 °C), solid phase extraction adsorbent (Septra, Isolute, Strata X, and Oasis), and activation solvent/elution (methanol and ethanol). The best results were observed with ethanol and water, Septra adsorbent and gradient method with twenty minutes of static time and temperature of 80 °C. The methods recovered, in purified fractions, compounds of different classes such as furfural, hydroxymethylfurfural (HMF), gallic/protocateic acid, chlorogenic acid, epicatechin, quercetin derivatives, rutin, hyperoside, phloretin xylosil glycoside and phlorizin. While using mainly green solvents, the developed method produced higher or similar yields of acids and flavonoids than conventional methods, proving to be efficient in yield and separation of compounds from the sample.

Keywords: *Apple pomace; Phenolics compounds; Pressurized liquid extraction; Solid-phase extraction; Gradient Solvent.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Composição física e de fitonutrientes presentes na maçã.....	15
Figura 2. Distribuição dos trabalhos que tratam das diferentes técnicas de extração e suas respectivas condições (relação sólido-líquido (RSL), temperatura, tempo, solvente e pressão).....	63
Figura 3. Sistema integrado de análise "Extract-US".....	77
Figura 4. Esquema do sistema "Extract-US".....	78
Figura 5. Cromatogramas obtidos com o método desenvolvido.....	82
Figura 6. Recuperação (mg/g) de ácidos fenólicos (A) e flavonoides (B) com diferentes adsorventes (Septra, Isolute, Strata X e Oasis).....	85
Figura 7. Comparação da recuperação (mg/g) de ácidos fenólicos e flavonoides produzidos pelo método desenvolvido (PLE-SPE) e os obtidos com diferentes técnicas convencionais (PLE: extração líquida pressurizada; US: extração assistida por ultrassom; Mag-Agitação: agitação magnética) e solventes (água, etanol, metanol e misturas com água).....	95
Figura 8. Sistema bidimensional de extração e análise de compostos bioativos.....	103
Figura 9. Diagrama de configuração do sistema PLE-SPE-HPLC-PDA 2D.....	104
Figura 10. Cromatogramas representativos do extrato do subproduto industrial da maçã obtido por HPLC-PDA.....	107
Figura 11. Representação gráfica dos métodos de gradiente de solvente PLE (A-E) em função do tempo (min): porcentagem de água em uma solução binária com etanol.....	109
Figura 12. Comparação de métodos PLE com gradiente de solvente a 40 °C e 160 min de extração: impacto nos compostos alvo do extrato do subproduto industrial da maçã.....	110
Figura 13. Efeito do tempo estático de PLE com o método D, a 40 °C, no rendimento de compostos alvo do extrato de bagaço de maçã.....	112
Figura 14. Curvas cinéticas das diferentes temperaturas do PLE usando o método D e 20 min de tempo estático de extração, referente ao rendimento dos compostos alvo do bagaço de maçã.....	113
Figura 15. Cromatograma tridimensional (A) representativo do PLE-SPE-HPLC-PDA realizado pelo método D, a 80 °C, e 20 min de tempo estático de extração. F1 a F10 representa as injeções automáticas do PLE-SPE em HPLC-PDA. Curvas cinéticas de furfurais (B), ácido clorogênico (C), flavonoides (D) e PLD (E).....	117
Figura 16. Comparação de diferentes técnicas de extração no rendimento de compostos alvo do bagaço de maçã industrial.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Uma visão geral das principais classes, subclasses e benefícios para a saúde dos principais compostos fenólicos identificados em maçãs.....	21
Tabela 2. Resumo das publicações utilizando técnicas convencionais de extração para recuperação de compostos fenólicos da maçã e suas respectivas condições operacionais de extração (solvente, temperatura, tempo e RSL), os compostos mais importantes analisados e as melhores condições relatadas.....	31
Tabela 3. UAE e MAE aplicados para obter fenólicos de maçã incluindo os parâmetros operacionais, os compostos mais importantes analisados e as melhores condições relatadas.....	34
Tabela 4. Resumo dos estudos que aplicaram PLE e SFE para obter compostos fenólicos da maçã, incluindo os parâmetros operacionais, os compostos mais importantes analisados e as melhores condições relatadas.....	46
Tabela 5. Resumo dos estudos que aplicaram IL e solventes eutéticos para obter compostos fenólicos da maçã, incluindo os parâmetros operacionais e compostos alvo.....	56
Tabela 6. Recuperação (mg/g) de compostos fenólicos do bagaço de maçã utilizando diferentes temperaturas de extração.....	90
Tabela 7. Recuperação (mg/g) de compostos fenólicos do bagaço de maçã usando diferentes solventes de ativação e extração/eluição.....	92

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	14
OBJETIVOS GERAIS	18
Objetivos Específicos.....	18
CAPÍTULO 1:EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NA MAÇÃ: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
1. Compostos bioativos presentes na maçã	20
2. Extração de compostos bioativos da maçã.....	26
3. Técnicas convencionais de extração.....	27
4. Técnicas não convencionais de extração	33
5. Extração Assistida por Ultrassom (UAE)	33
6. Extração Assistida por Microondas (MAE).....	43
7. Extração com Líquidos Pressurizados (PLE).....	45
8. Extração com Fluídos Supercríticos (SFE).....	50
9. Processos sequenciais de extração	52
10. Sustentabilidade e o uso de solventes alternativos não voláteis	54
11. Considerações finais e perspectivas futuras.....	59
Referências Bibliográficas	64
CAPÍTULO 2:EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO SIMULTÂNEAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NO BAGAÇO DA MAÇÃ.....	74
1. Metodologia de extração.....	75
2. Composição fenólica do resíduo de maçã.....	79
3. Comparação com diferentes adsorventes.....	83
4. Temperatura de extração	87
5. Solvente de ativação e extração/eluição.....	90
6. Comparação com técnicas convencionais	93
Conclusão	96
Referências Bibliográficas	97
CAPÍTULO 3:EXTRAÇÃO EM GRADIENTE, PURIFICAÇÃO <i>INLINE</i> E ANÁLISE <i>ONLINE</i> DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO SUBPRODUTO INDUSTRIAL DA MAÇÃ.....	100
1. Extração De Líquido Pressurizado (PLE) aplicando gradientes de solvente	102
2. Processo integrado: 2D-PLE-SPE-HPLC-PDA.....	104

3. Identificação dos compostos alvo	106
4. Efeitos dos métodos em gradiente de solvente em PLE	108
5. Efeito do tempo estático e temperatura na PLE	111
6. Monitoramento de PLE acoplado com separação em duas dimensões: <i>inline</i> com SPE e <i>online</i> com HPLC	114
7. Comparação do novo método PLE-SPE-HPLC-PDA com outras técnicas...	118
Conclusão	120
Referências Bibliográficas	121
CONCLUSÕES GERAIS	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
ANEXOS	137

INTRODUÇÃO GERAL

A maçã (*Malus domestica* Borkh) é um fruto de coloração vermelha ou verde oriunda da macieira, planta de clima temperado, da família das Rosáceas. Atualmente, o Brasil é auto-suficiente na produção do fruto, produzido principalmente na região sul brasileira, e exportador de cerca de 15% da produção, principalmente das cultivares Gala e Fuji, as quais abrangem 90% da produção equivalentes a 1.264.651 toneladas nos últimos anos (Musacchi & Serra, 2018; Valdebenito-Sanhueza, 2003).

O maior consumo da maçã é como produto fresco, porém, com a exigência do mercado consumidor em produtos de alta qualidade, cerca de 30% da produção é descartada por apresentar doenças ou defeitos físicos; essa porcentagem é direcionada para indústria na produção de doces, geleias, compotas, sucos, bebidas e vinagre. Aproximadamente 35% de toda a maçã utilizada na indústria de suco não tem rendimento, ou seja, é um descarte sólido ou vulgarmente chamado bagaço, que é uma mistura de casca, polpa e sementes da fruta, prensados após processamento (Sebrae, 2018).

O bagaço da maçã é um subproduto da indústria que pode representar de 20 a 35% da fruta. Atualmente tem havido uma tendência para a utilização de resíduos agroindustriais como alternativas de reutilização destes produtos em alimentos, uma vez que, por conter partes variadas de vegetais, o subproduto industrial faz-se uma fonte valiosa de compostos bioativos e antioxidantes naturais (Boyer et al., 2004; De Abreu et al., 2013; Leontowicz et al., 2002; Robbins, 2003; Skinner et al., 2018; Suárez et al., 2010).

Compostos fenólicos ou polifenóis são produtos oriundos de tirosina e fenilalanina no metabolismo de plantas, apresentando estruturalmente um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxilas, incluindo seus derivados funcionais, tornando-os específicos na estrutura química e reatividade (Eskin & Przybylski, 2001; Tsimogiannis & Oreopoulou, 2019). Tais substâncias são necessárias para o crescimento e reprodução das plantas, além de atuarem como anti-nutrientes e anti-patogênicos, em quantidades inerentes para cada espécie de fruta (Shahidi & Naczk, 1995; Tungmunthum et al., 2018). Atualmente, os fenólicos são amplamente estudados por participarem ativamente em processos antioxidantes do metabolismo, trazendo benefícios à saúde, sendo associado com a baixa incidência e baixo índice de mortalidade causada por cânceres. A atividade antioxidante dos fenólicos se dá pela eliminação direta de radicais livres do organismo; pela ação quelante indireta de íons metálicos pró-oxidantes

(Halliwell, 1996; Heim et al., 2002; Shahidi & Naczk, 1995) removendo espécies reativas de oxigênio; eliminando peróxidos e quebrando o início de suas reações em cadeia para prevenção de formação de radicais (Brewer, 2011; Tanase et al., 2019; Tungmunnithum et al., 2018).

Grande parte dos compostos fenólicos da maçã está presente nos vacúolos celulares (97%), mas as concentrações desses compostos são maiores no epicarpo (casca) e subepicarpo, quando comparados aos tecidos internos do fruto, a depender, todavia, do grau de maturação, ambiente de plantio, condições de estocagem e características específicas de cada cultivar. Ou seja, no processamento da maçã, o suco apresenta poucos fenólicos, com porcentagens de 3 a 10% da atividade antioxidante do fruto integral, pois a maior parte dos compostos fenólicos permanece no bagaço, sendo este apontado como boa fonte de antioxidantes, podendo ser utilizado na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética (Ćetković et al., 2008; Fernández-Jalao et al., 2019; Van der Sluis et al., 2001; Wu et al., 2002).

Diferentes classes de compostos fenólicos podem ser encontradas em maçãs, como os ácidos fenólicos, entre eles ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos, e os flavonoides, como os flavan-3-óis (epicatequina, catequina e procianidinas), antocianinas, flavonóis (rutina, quercetina) e dihidrochalconas (floritina e floridzina) (Arks et al., 2009; Chan & Shea, 2009; Pratt & Hudson, 1990; Tsao et al., 2005; Van der Sluis et al., 2002; Vanzani et al., 2005; Zhang et al., 2020).

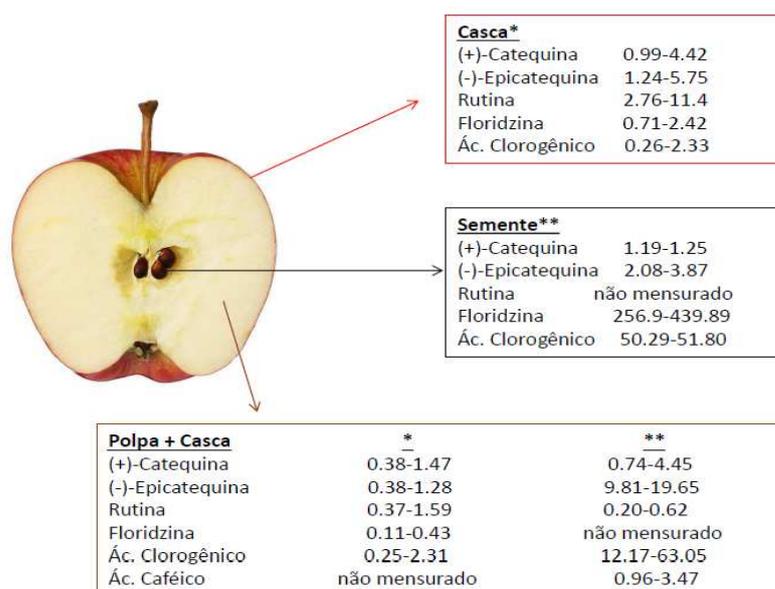


Figura 1. Composição física e de fitonutrientes presentes na maçã. Fonte: Francini & Sebastiani, 2013 *mg/g da fruta desidratada. **mg/100g da fruta fresca.

Devido ao alto potencial de atividade biológica dos compostos fenólicos presentes no subproduto industrial da maçã, a produção de extratos com elevada concentração destes compostos pode ser explorada para a produção de suplementos alimentares ou na forma de aditivos para a elaboração de alimentos. Entretanto, para viabilizar a sua utilização é necessário extrair estes compostos da matéria-prima sem provocar a sua degradação ou minimizando a degradação destes compostos no processo, de forma rápida, seletiva e barata. Existem diversos métodos para a extração dos compostos antioxidantes em vegetais, que vão desde os clássicos como a maceração até técnicas mais modernas como a extração com líquidos pressurizados, fluidos supercríticos, ultrassom e com microondas (Manchón et al., 2013; Rostagno et al., 2010).

A extração com líquidos pressurizados (PLE) é um procedimento que combina temperatura (50-200°C) e pressão de moderadas a elevadas (40-200 bar) com solventes líquidos (sem o seu ponto crítico ser alcançado) para facilitar e acelerar a extração de compostos de interesse da matéria-prima. Para uma extração rápida e eficiente de compostos em matrizes sólidas, temperaturas elevadas podem conduzir a melhoras significativas na eficiência de extração, uma vez que podem aumentar a solubilidade de compostos e as taxas de difusão e de transferência de massa dos solutos para o solvente, além de aumentar drasticamente a permeabilidade relativa do solvente de extração na amostra e aumentar a seletividade de compostos. A alta pressão, por sua vez, permite manter o solvente no estado líquido mesmo quando temperaturas muito mais altas que a de ebulição são empregadas. Extrações realizadas sob temperatura e pressão elevadas resultam em cinéticas adequadas dos processos de dissolução e favorece a dessorção de solutos a partir da superfície e locais ativos da matriz da matéria-prima. A PLE também oferece a possibilidade de realizar as extrações sob atmosfera inerte e protegidas de luz, os quais representam vantagem atraente perante outras técnicas de extração, pois muitos compostos bioativos são sensíveis aos dois fatores citados. Vários pesquisadores têm utilizado com sucesso a PLE para extrair fenólicos da maçã, em sementes casca e bagaço da fruta (Alonso-Salces et al., 2001; Franquin-Trinquier et al., 2014; Palma et al., 2001; Rostagno et al., 2010; Viganó et al., 2022; Wijngaard & Brunton, 2009).

Técnicas a alta pressão, como a PLE, também abrem a possibilidade do acoplamento em linha com a extração em fase sólida (SPE), que é um processo de separação que utiliza a afinidade de solutos dissolvidos ou em suspensão num líquido (fase móvel) para um sólido através do qual a amostra é percolada (fase estacionária) para separar uma mistura em componentes desejados e indesejados. Isto permite a integração

das técnicas de forma que todo o processo seja realizado em uma única etapa e se torne mais eficiente. Existem alguns exemplos do acoplamento de técnicas em linha para a extração e purificação de produtos naturais, incluindo SFE-SPE, PLE-SPE-HPLC, entre outras. Neste contexto, é importante ressaltar que a tecnologia de líquidos pressurizados não deve ser considerada como uma alternativa aos procedimentos individuais, e somente por meio de uma abordagem integrada do processo todo o potencial desta tecnologia pode ser explorado (Papagiannopoulos et al., 2002; Papagiannopoulos & Mellenthin, 2002; Rostagno et al., 2002; K. Sato et al., 1999; Taylor & King, 2002).

O uso de diferentes solventes para extração de compostos fenólicos, pode indicar maior ou menor rendimento destes compostos nas frações devido à afinidade do solvente com os compostos das amostras, por isto, ainda há divergências entre os estudos quanto ao melhor solvente de extração para cada classe de compostos, justamente pelas diferentes afinidades dos compostos aos solventes. Portanto, é possível que o etanol ou misturas aquosas de solventes, geralmente utilizados em técnicas de extração, possam ser favoráveis ou não a extração de compostos fenólicos, dependendo da polaridade dos compostos da amostra. Outro ponto que se deve ser levado em consideração, é a qualidade do solvente no que diz respeito ao bom aproveitamento na extração e não poluição do meio ambiente. Assim, solventes verdes, como o etanol, devem ser testados, para analisar se é possível obter bons resultados em extração de compostos de interesse e como solventes menos poluentes (Chavan et al., 2001; Goli et al., 2005; Jakopič et al., 2009).

Uma alternativa às misturas de solvente é o gradiente de solvente. Em amostras complexas, como o bagaço de maçã, existem diversas classes de compostos que interagem de maneiras distintas com o meio, a depender da polaridade ou afinidade química entre as moléculas. Ou seja, o gradiente consiste em alterar a concentração de solvente ao longo do processo de extração visando a interação do solvente com diferentes classes de compostos ao longo da extração, para garantir maior rendimento (Viganó et al., 2021). Neste sentido, o gradiente de solventes pode garantir a melhor extração e eluição de compostos presentes na matriz, assim como o processo acoplado e automático garante a extração, fracionamento da amostra e assertividade na extração de compostos de interesse, diminuindo tempo no processo de extração, utilização de solventes e outros materiais, gasto de energia e erros por manipulação. Diante do cenário de aprimoramento ainda se faz necessário estudar a viabilidade de se combinar e acoplar esta técnicas para a extração em gradiente e purificação de compostos bioativos em resíduos de maçã e como as condições de operação afetam o processo

OBJETIVOS GERAIS

Utilizar o subproduto industrial da maçã para desenvolver um método de extração por líquidos pressurizados em gradiente de solventes *inline* com extração em fase sólida e monitoramento *online* por HPLC de compostos bioativos presentes na amostra.

Objetivos Específicos

- I. Desenvolver um método para a extração de compostos fenólicos a partir de resíduos de maçã utilizando a técnica de líquidos pressurizados com acoplamento *inline* com a extração em fase sólida (PLE-SPE) que permita potencializar a eficiência, rendimento e seletividade do processo;
- II. Avaliar o efeito de diferentes variáveis do processo PLE-SPE, mais especificamente o solvente de ativação e eluição/extração, adsorventes para retenção de compostos e temperatura de extração na seletividade e eficiência do processo;
- III. Desenvolver um método de análise em HPLC para a detecção de compostos *online* e *offline* da amostra estudada;
- IV. Potencializar o método PLE-SPE desenvolvido para extração de compostos bioativos do bagaço da maçã acrescentando um gradiente de solventes;
- V. Acoplar o método em gradiente de solventes desenvolvido PLE-SPE *online* com HPLC (PLE-SPE-HPLC) para monitorar em tempo real o processo de extração de compostos bioativos da amostra;
- VI. Obter um extrato com alta concentração de compostos fenólicos da classe dos flavonoides;
- VII. Comparar a técnica PLE-SPE e gradiente de solventes com técnicas convencionais de extrações de compostos, como banho de ultrassom, homogeneização, PLE e agitação magnética.

CAPÍTULO 1:
EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
PRESENTES NA MAÇÃ: UMA REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA

1. Compostos bioativos presentes na maçã

A maçã é uma fruta rica em diversas substâncias e nutrientes, como fibras e polifenóis. O bagaço da maçã, por possuir partes da fruta, também possui as mesmas características nutricionais da fruta, sendo assim, uma matéria-prima rica em compostos bioativos, como os polifenóis. Os polifenóis são compostos secundários produzidos com a principal finalidade de proteção dos vegetais quando a planta entra em contato com patógenos ou sofre estresse físico ou químico. A diferença entre o cultivo, grau de maturação, condições de armazenamento e etc. entre os plantas também são fatores que determinam a concentração fenólica. Na maçã, a exposição à radiação ultravioleta, predadores e diversidades do solo, por exemplo, tornam a casca da fruta mais concentrada em compostos fenólicos do que outras partes, como polpa e sementes (Jakobek & Barron, 2016). Os polifenóis atuam protegendo os vegetais, mas sua ação benéfica em humanos também é conhecida, atuando geralmente como antioxidantes e prevenindo doenças crônicas não transmissíveis. Os anéis aromáticos presentes nos compostos fenólicos associados a um ou mais grupos hidroxila reagem com os radicais livres formando radicais estáveis caracterizando as propriedades antioxidantes no corpo humano (Fu et al., 2011).

Atualmente, mais de 60 compostos fenólicos são encontrados na maçã (Haminiuk et al., 2012). Dentre as classes de compostos presentes na maçã, há os não flavonoides e os flavonoides (Tabela 1). Entre os não flavonoides, há os ácidos fenólicos, subdivididos em hidroxicinâmico e hidroxibenzóico. Os ácidos quínico e caféico têm sido os compostos mais identificados em diferentes cultivares de maçã, atingindo entre 4 e 18% dos polifenóis totais da fruta. Os ácidos 5'-cafeoilquínico ou clorogênico, p-coumaroilquínico e p-cumárico também são geralmente encontrados na fruta. Tanto os ácidos hidroxicinâmicos quanto os hidroxibenzóicos podem ser encontrados em maiores quantidades conjugados a componentes da parede celular, como celulose ou lignina, ou mesmo formando complexos protéicos que podem ser ligados a açúcar ou ácidos orgânicos (Barros et al., 2009).

Tabela 1. Uma visão geral das principais classes, subclasses e benefícios para a saúde dos principais compostos fenólicos identificados em maçãs.

Classes	Subclasses	Compostos	Benefícios associados	Referências
Ácidos	Hidroxicinâmicos	Clorogênico; Criptoclorogênico	Antiobesidade, antihipertensivo e neuroprotetivo	Naveed et al. (2018)
		Cafeico; 4-Cafeoilquínico; 5-Cafeoilquínico	Auxílio contra lesão de isquemia	Sato et al. (2011)
		p-coumarico; 5- <i>p</i> -Coumaroilquínico; ácido <i>p</i> -coumarico- <i>O</i> -hexosideo; 4- <i>O-p</i> -coumaroylquinico; <i>p</i> -coumaroilquínico	Anticâncer de pulmão, analgésico e efeitos atenuantes no diabetes	Pei et al. (2016)
		Ferrúlico	Vasodilator, antidiabético e ação anticarcinogênico em tumores gastrointestinais	Kumar & Pruthi (2014)
		Ácido Sinapico- <i>O</i> -glucosideo	Antidiabético, ajuda contra neurodegeneração e ansiedade	Chen (2016)
	Hidroxibenzoicos	Siríngico	Ajuda contra doenças cardiovasculares, isquemia cerebral e câncer de fígado	Srinivasulu et al. (2018)
		Gentísico	Antioxidante e antiinflamatório	Zhou et al. (2017)
		Protocateico	Antiobesidade e antihiperlipidêmico	D'Archivio et al. (2013)
		Salicílico	Antiinflamatório e propriedades quimoprotetoras	Dachineni et al. (2016)
		Ascórbico	Antitumor, antiviral, antioxidante	Macan et al. (2019)

		Vanílico	Antioxidante, antiinflamatório, e efeitos neuroprotetivos	Ullah et al. (2020)
		Quercetina; Quercetina-3- <i>O</i> -diglucosídeo; Quercetina-3- <i>O</i> -galactosídeo; Quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo; Quercetina-3- <i>O</i> -rhamnosídeo; Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo; Quercetina-3- <i>O</i> -xylanosídeo; Quercetina- <i>O</i> -xilosil-pentosídeo	Antiinflamatório e antioxidante	Lesjak et al. (2018)
		Ramnetina; Ramnetina-3- <i>O</i> -glucosídeo	Antiviral	Ferenczyova et al. (2020)
		Isoramnetina-3- <i>O</i> -galactosídeo; isoramnetina-3- <i>O</i> -glucosídeo; isoramnetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo; isoramnetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo	Antihipertensivo, ajuda em doenças cardiovascular	Eisvand et al. (2020)
Flavonoides	Flavonols	Kaempferol- <i>O</i> -glucosídeo	Propriedade anticancerígenas em câncer de mama, próstata e colon	Wang et al. (2019)
		Rutina	Antitumor, antimicrobiano, antiinflamatório e neuroprotetor	Budzynska et al. (2017)
		Reinourina	Antitrombótico, anticancer, and antidiabético	Li et al. (2016)
		Avicularina	Antialérgico ajuda a não desenvolver câncer gástrico	Guo et al. (2018)
		Quercitrina	Ação neurofarmacológica, antiviral e anticancer	Zhi et al. (2016)

Flavonas	Apigenina	Antidiabético, ajuda em amnesia, na doença de Alzheimer's, na depressão e insônia	Salehi et al. (2019)
	Crisoeriol	Inibe a ação da lipase pancreática	Ramirez et al. (2016)
	Luteolina; Luteolina-7- <i>O</i> -galactosídeo; Luteolina-7- <i>O</i> -glucosídeo	Antiinflamatório, antialérgico e anticâncer pancreático	Imran et al. (2019)
Flavanonas	Hesperidina- <i>O</i> -pentosídeo	Neuroproteção	Hajialyani et al. (2019)
	Eriodictiol; Eriodictiol-hexosídeo	Auxilia na secreção de insulina	Hameed et al. (2018)
	Naringenina-7- <i>O</i> -glucosídeo; Naringenina-7- <i>O</i> -neohesperidosídeo; Naringenina-7- <i>O</i> -rutinosídeo; Naringenina- <i>O</i> -glucuronídeo	Imunomodulatório, neuroprotetiva e propriedades antiarterosclerótica	Hartogh & Tsiani (2019)
Flavanols	(-)-Epicatequina; (-)-Epigallocatequina 3-galato; (-)-Epigallocatequina; (-)-Epigallocatequina 3-galato	Auxilia no tratamento de diabetes e patologias cardíacas	Shay et al. (2015)
	(+) Catequina	Prevenção de hipertensão e colesterol alto no sangue e câncer no estômago	Matsui (2015)
	Procianidina B1; Procianidina B2; Procianidina B3; Procianidina B5; Procianidina C1	Anticâncer de esôfago	Connor et al. (2014)
Antocianinas	Cianidina 3- <i>O</i> -galactosídeo; Cianidina 3- <i>O</i> -arabinosídeo; Cianidina-7-arabinosídeo; Cianidina 3- <i>O</i> -xylosídeo	Antiinflamatório e auxilia em diminuir os níveis de colesterol	Ding et al. (2006)

	Peonidina	Antioxidante, anticâncer e antidiabético	Rajan et al. (2018)
Dihidrochalconas	Floretina; 3-Hidroxifloretina 2'- <i>O</i> -glucosideo; Floretina 2'- <i>O</i> -xilossil-glucosideo	Antimicrobiano	Barreca et al. (2014)
	Floridzina; 3-hydroxifloridzina	Antihiperglicêmico	Makarova et al. (2014)

A classe dos flavonoides das maçãs podem ser subdivididos em flavonóis (71–90%), flavan-3-óis (1–11%), dihidrochalconas (2–6%) e antocianinas (1–3%). Catequinas, epicatequinas e procianidina B2 são os principais flavan-3-óis presente na casca e na polpa das maçãs, assim como as a cianidina 3-galactosídeo, da classe das antocianinas, é a mais representativa na casca das maçãs vermelhas, pois é responsável pela cor destas frutas. De uma forma geral, o subgrupo de flavonoides é encontrado em diferentes glicosídeos de quercetina, com quercetina 3-glicosídeo como o principal representante (Bondonno et al., 2017; Hyson, 2011). As dihidrochalconas, como a floridzina e a floretina, estão associadas ao teor de açúcar de frutas, como a glicose e o xiloglucano e são predominantemente encontradas em sementes e caules de maçã, compostos típicos do subproduto industrial da fruta (Da Silva et al., 2020; Jakobek & Barron, 2016).

Os fenólicos da maçã podem ser encontrados em maior quantidade na fruta fresca do que no bagaço devido ao processamento industrial (prensa, processos térmicos de secagem, exposição à luz, entre outros) que gera degradação dos compostos. Além disso, o bagaço resulta da mistura de todas as partes da fruta e, portanto, sua composição química é consequência dessa mistura e do tratamento a que o subproduto foi submetido. Os flavonoides são predominantes na casca, enquanto maior quantidade de ácidos fenólicos é encontrada na polpa e dihidrochalconas nas sementes (Haminiuk et al., 2012). Assim, o bagaço pode, mas não necessariamente possui estes compostos fenólicos. Ou seja, os subprodutos de frutas são matrizes complexas que apresentam tendências e não regras sobre sua composição pois podem ter passado por diferentes processos industriais que impactam seu estado final. De uma forma geral, os compostos mais significativos nos bagaços de maçã são ácido clorogênico, ácido caféico, (+) - catequina, (-) - epicatequina, rutina, glicosídeos de quercetina e floridzina. Estes compostos apresentam diversas atividades biológicas, possibilitando a criação de novos produtos, principalmente a partir de seus extratos. Portanto, a extração configura uma etapa essencial na cadeia de reaproveitamento de subprodutos (Hyson, 2011).

É importante ressaltar que sementes de maçã podem conter outros compostos como amígdalina e diglucosídeo cianogênico. A toxicidade do cianeto em humanos ocorre com doses entre 0,5 e 3,5 mg/kg de peso corporal. No entanto, esse composto está presente em sementes de maçã entre 0,06 e 0,2 mg equivalente de cianeto/g de sementes de maçã (Bolarinwa et al., 2015; Lu & Yeap Foo, 1998), dependendo do cultivo (Xu et

al., 2016). Mesmo assim, deve-se prestar atenção aos produtos de extração do bagaço contendo sementes para monitorar a concentração desses compostos.

2. Extração de compostos bioativos da maçã

Diversas técnicas já foram empregadas para extrair compostos bioativos de matérias-primas à base de maçãs. O subproduto da maçã é semelhante à fruta quanto à composição dos compostos fenólicos e, portanto, a escolha do método para a extração dos mesmos depende mais das características dos métodos e objetivos do trabalho do que da matriz. Os processos de extração para recuperar compostos de matrizes à base de maçã podem ser classificados como métodos de extração convencionais ou modernos.

Os métodos de extração clássicos ou convencionais, como maceração, Soxhlet, homogeneização suave e agitação magnética, têm sido usados há pelo menos dez anos para obter compostos a partir de matrizes à base de maçã. Estes métodos são de fácil operação, mas apresentam algumas desvantagens como falta de controle fino de temperatura, exposição à luz e maior tempo de extração, o que pode reduzir os rendimentos de extração e a concentração de extrato dos compostos alvo. Outro ponto a destacar é que, de uma forma geral, esses métodos empregaram solventes de extração que hoje são evitados por questões ambientais e de segurança. A escala do processo de extração por técnicas convencionais também é um fator limitante, o que corrobora com a busca por tecnologias de extração inovadoras e escaláveis (Azmir et al., 2013; Mustafa & Turner, 2011).

Os métodos modernos ou não convencionais de extração surgiram para superar as desvantagens dos processos de extração convencionais. De uma forma geral, as técnicas modernas possuem menor consumo de energia e solvente, menor tempo de extração e parâmetros bem definidos que resultam em melhor desempenho de extração (maiores rendimentos e concentração de extrato). Além disso, as técnicas não convencionais surgem já englobando a proposta de extração verde. A extração assistida por ultrassom (UAE), extração assistida por microondas (MAE), extração por líquido pressurizado (PLE) e extração por fluido supercrítico (SFE) são exemplos de técnicas não convencionais para recuperação de compostos fenólicos de matrizes vegetais e nos últimos anos também têm sido empregados para extrair compostos bioativos da maçã propondo encontrar as melhores condições operacionais (tipo de solvente, temperatura, tempo, pressão, potência) para obter fenólicos dessa fruta (Armenta et al., 2019; Azmir

et al., 2013; Da Silva et al., 2020; Pingret et al., 2012; Santos et al., 2019; Souza et al., 2020; Sumere et al., 2018; Xu et al., 2017).

3. Técnicas convencionais de extração

A obtenção de compostos de maçã por meio de extração convencional baseia-se no poder de extração de diferentes solventes, temperatura, tempo de extração e relação sólido/líquido (RSL: massa da amostra (g)/volume do solvente (mL)) (Fromm et al., 2013; Hernández-Carranza et al., 2016; Reis et al., 2012). A Tabela 2 apresenta trabalhos que aplicaram técnicas convencionais para extrair fenólicos de maçã e seus subprodutos, incluindo os parâmetros operacionais e os compostos mais importantes analisados.

Em matrizes oriundas de maçã, a Maceração e Soxhlet têm sido menos empregados do que homogeneização suave e agitação magnética, e os dois primeiros foram utilizados principalmente para comparação ou validação de técnicas de extração alternativas, ou mesmo para avaliar alguns parâmetros de extração iniciais, como a razão de massa entre solvente e amostra. O aparato Soxhlet e agitador magnético, vem sendo aplicados a matérias-primas à base de maçã, principalmente como métodos preparativos para fins analíticos em escala de laboratório (Azmir et al., 2013; Ferrentino et al., 2018; Moreira et al., 2017).

Solventes orgânicos apolares ou misturas proporcionam maior rendimento em extrações convencionais pelo fato de que compostos importantes da fruta são principalmente apolares. Ferrentino et al. (2018) usaram o aparelho Soxhlet para obter compostos fenólicos de bagaço de maçã usando etanol como solvente por seis horas. Rana et al. (2015) utilizaram a homogeneização para estudar os efeitos de diferentes solventes na extração de compostos fenólicos do bagaço de maçã. Os autores deste último estudo observaram que a acetona é o melhor solvente para recuperação dos compostos fenólicos. A homogeneização suave também foi utilizada para extrair compostos fenólicos do caule da macieira aplicando etanol como solvente (Moreira et al., 2017).

A água pura surge como um solvente alternativo verde e de baixo custo, mas a temperatura e ciclos de extração também afetam o rendimento dos compostos alvo, assim é necessário aumentar a temperatura ou o número de ciclos de extração para garantir maiores rendimentos utilizando água como solvente (Fromm et al., 2013; Hernández-Carranza et al., 2016). Reis et al. (2012), por exemplo, usou água pura, acetona (20–100%, v / v) e metanol (20–100%, v / v) para extrair compostos fenólicos do bagaço de

maçã. Três ciclos de extração foram usados para água pura, enquanto apenas um ciclo de extração foi suficiente para acetona e metanol atingirem rendimentos equivalentes. Os autores notaram que todos os solventes podem extrair fenólicos, mas a água pura extraiu menos dos compostos alvo, provavelmente devido à polaridade e compatibilidade do solvente com estes compostos. Os autores também notaram que a água diminuiu a seletividade, promovendo a extração de outros componentes e reduzindo a pureza relativa dos extratos.

Metanol (70–99,9%, v / v) e acetona (50–80%, v / v) foram comparados em um estudo conduzido por Alberti et al. (2014) para extrair ácido clorogênico e floridzina da maçã por homogeneização suave. Os autores observaram que a melhor condição operacional para o metanol foi de 84,5% (v / v) por 15 min a 28 °C e acetona a 65% (v / v) por 20 min a 10 °C. Corroborando esse achado, Rezaei et al. (2013) mostraram que as extrações realizadas com metanol recuperaram mais fenólicos do que aquelas realizadas com etanol, utilizando Soxhlet (221 mg equivalente ácido tânico (TAE)/g matéria seca (dm)) e maceração (148 mg TAE/g.dm). A capacidade do metanol e da acetona de extrair compostos fenólicos de fontes vegetais está bem estabelecida. Embora ambos os solventes sejam aceitáveis para fins analíticos, os substitutos Geralmente Reconhecidos como Seguros (GRAS) são muito bem-vindos, principalmente na aplicação do extrato para consumo humano, além de todo o impacto ambiental inerente à produção desses solventes. Além disso, substitutos mais seguros devem ser aplicados para substituir esses solventes orgânicos, tais como solventes alternativos não voláteis, a saber, líquidos iônicos (ILs), solventes eutéticos e surfactantes.

Além do solvente, o tamanho da partícula é outro parâmetro físico determinante que deve ser avaliado para garantir o sucesso da extração, principalmente nas técnicas convencionais de extração. O menor tamanho de partícula parece ter alto desempenho na extração dos compostos bioativos, justamente por que aumenta a transferência de massa e, conseqüentemente, maior liberação dos compostos bioativos na solução de extração em um menor tempo. As etapas de preparação da amostra, por exemplo, secagem ou armazenamento, também podem afetar o rendimento da extração e a concentração do extrato, uma vez que fatores como a oxidação dos componentes induzidos pela luz ou oxigênio podem ocorrer durante o pré-tratamento da matéria-prima. A influência dos procedimentos de secagem no rendimento de extração foi estudada por Rana et al. (2015), usando quercetina, floridzina e floretina de bagaço de maçã como compostos alvo. Os autores mostraram que maiores teores de fenólicos foram encontrados nas amostras

lioofilizadas, seguidas daquelas secas em estufa e secas ao sol. Embora, em geral, a secagem em altas temperaturas e a circulação do ar sejam prejudiciais à manutenção dos compostos fenólicos, deve-se atentar para as matérias-primas com alto teor de polifenol oxidase, como os produtos à base de maçã, uma vez que a secagem acima da temperatura de inativação da polifenol oxidase pode ser útil para preservar os polifenóis da matéria-prima (Illera et al., 2019).

Vários trabalhos usaram o agitador magnético como técnica convencional de extração para obter compostos fenólicos de maçãs. Entre as vantagens desse método estão as temperaturas amenas, favoráveis à extração de compostos termolábeis. Outra alternativa para superar as desvantagens da temperatura é aumentar o tempo de extração. Fromm et al. (2013) avaliaram diferentes temperaturas (0-42 °C) e tempo de extração (60-1440 min) para extrair fenólicos de sementes de maçã, e os autores observaram um maior rendimento de fenólicos a 25 °C por 60 min. Da Silva et al. (2020) e Hernández-Carranza et al. (2016) usaram agitador magnético para extrair compostos fenólicos do bagaço de maçã. Em ambos os casos, 60 °C foi a temperatura ótima, mas o uso de metanol (80%, v / v) e etanol (50%, v / v) por Da Silva et al. (2020) resultou em um tempo de extração menor (30 min) do que o obtido por Hernández-Carranza et al. (2016) (720 min), que usou água como solvente. Vale ressaltar que o agitador magnético é uma alternativa à extração em escala laboratorial que deve ser substituída pelo agitador mecânico para escalas de processamento superiores. Além disso, tais métodos de extração precisam de processos posteriores para separar os sólidos dos extratos, o que impacta o custo e o tempo de realização de um lote. Este fator não é problemático em escalas de laboratório; no entanto, pode gerar dificuldades e a necessidade de equipamentos de filtragem de alta capacidade em escalas industriais.

Durante um procedimento de extração, a RSL desempenha um papel fundamental. É necessária uma proporção adequada para liberar os compostos bioativos no solvente de forma eficiente e, conseqüentemente, conseguir uma extração com bom rendimento. A proporção ideal utilizada no processo de extração depende da interação entre matriz (biomassa) e solvente; a partícula de biomassa e sua interação com o solvente influenciam diretamente a viscosidade da solução, o que afeta o coeficiente de transferência de massa e a eficiência de extração (Rostagno et al., 2010).

Além disso, o rendimento da extração é limitado pela solubilidade dos compostos alvo no solvente; portanto, a quantidade de solvente deve garantir que seja suficiente para solubilizar todos os compostos-alvo na matéria-prima. Porém, o excesso de solvente

diminui a concentração do extrato e aumenta o custo do procedimento devido ao custo do solvente e à maior massa de solvente a ser evaporada do extrato. Assim, as avaliações econômicas são importantes para definir com base no custo de produção o melhor RSL. Os artigos publicados geralmente definem a RSL com base no maior rendimento ou concentração de extrato sem considerar questões de custo. Além disso, especialmente para matérias-primas à base de maçã desidratada, a alta RSL não é recomendada, pois a extração da pectina pode aumentar a viscosidade da solução e diminuir a recuperação dos compostos. Exemplos de RSL são relatados por Grigoras et al. (2013) que utilizou a maceração para recuperar fenólicos do bagaço de maçã usando um RSL de 0,1 e Hernández-Carranza et al. (2016) que usou RSL de 0,004.

A crescente preocupação com as questões ambientais devido aos resíduos gerados após os processos de extração e os custos de operação e segurança dos trabalhadores têm estimulado a busca por métodos alternativos que sejam mais limpos, baratos e ecologicamente corretos. Os métodos convencionais podem gerar resultados satisfatórios e, de fato, alguns deles são usados em escala industrial para diferentes matérias-primas; no entanto, com base nas desvantagens mencionadas acima e na necessidade de alterar a produção de manufatura clássica, as técnicas não convencionais surgem como opções viáveis.

Tabela 2. Resumo das publicações utilizando técnicas convencionais de extração para recuperação de compostos fenólicos da maçã e suas respectivas condições operacionais de extração (solvente, temperatura, tempo e RSL), os compostos mais importantes analisados e as melhores condições relatadas.

Técnicas	Amostra	Solvente (% <i>v/v</i>)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	RSL (g/mL)	Compostos analisados	Recuperação da extração (TPC)	Melhores condições	Referências
HMG	Maçãs inteiras	ACT 50-80, MEOH 70-99.9	10-40	10-20	0,017	Ácido clorogênico e Floridzina	5,90 mg/g	84.5% MEOH, 15 min, 28 °C ou 65% ACT, 20 min, 10 °C	Alberti et al. (2014)
HMG	Bagaço de maçã	ACT 50, ETOH 50, MEOH 50	30	60	0,05	Quercetina, Floridzina e Floretina	3,31 mg/g	50% ACT, 60 min, 30 °C	Rana et al. (2015)
HMG	Bagaço de maçã	Água, MEOH 20-100, ACT 20-100	RT	90	0,075	Ácidos Hidroxicinamicos, Flavonols, Flavanols, Dihidrochalconas, e Flavonas	n.i.	Water, 40% MEOH, 40%, ACT, RT, 90 min	Reis et al. (2012)
HMG	Casca da árvore de maçã	ETOH 20-80	20-55	180-1140	0,025	Ácidos fenólicos e Floridzina	43,2 mg/g	50% ETOH, 55 °C, 120 min	Moreira et al. (2017)
Mag- str	Semente de maçã	ACT 60-70	0-42	60-1440	1,25	Ácido Hidroxibenzóico, Flavan-3-ols, e Dihidrochalcona	2,99 mg/g	60-70% ACT, 25 °C, 60 min	Fromm et al. (2013)

Mag-str	Bagaço de maçã	Água, ETOH 50-100, MEOH 50-100	60	30	0,04	Ácido gálico/Protocateico, Ácido Clorogênico, Epicatequina, Rutina, Hiperosideo, Derivados de Quercetina, Quercetina Ramnosideo, Floretina Xilosil Glucosideo, Floridzina Quercetina, Epicatequina, Ácido Clorogênico, Procianidina B2, e Floretina	-	80% MEOH, 50% ETOH, 60 °C, 30 min	Da Silva et al. (2020)
Mag-str	Bagaço de maçã	Água	20-60	30-720	0,004	Ácido Clorogênico, Procianidina B2, e Floretina	6,89 mg/g	Água, 60 °C, 720 min	Hernández-Carranza et al. (2016)
MCT	Bagaço de maçã	ETOH	RT	60	0,05	Ácido Gálico, Ácido Clorogênico, Catequina, Rutina e Floridzina	n.i.	-	Grigoras et al. (2013)
MCT	Bagaço de maçã	ETOH MEOH	RT	1440	0,1	n.i.	148 mg/g	MEOH, 1440 min, RT, 0,1 RSL	Rezaei et al. (2013)
MCT	Bagaço de maçã	Água	100	37	0,016	Floridzina, Epicatequina, Quercetina, e Floretina	2,41 mg/g	-	Ferrentino et al. (2018)
SX	Bagaço de maçã	ETOH MEOH	RT	60 - 240	n.i.	n.i.	221 mg/g	MEOH, 180 min, RT	Rezaei et al. (2013)
SX	Bagaço de maçã	ETOH	RT	360	0,033	Floridzina, Epicatequina, Quercetina, e Floretina	4,13 mg/g	-	Ferrentino et al. (2018)

ACT: acetona; ETOH: etanol; HMG: homogenização; MEOH: metanol; Mag-str: agitador magnético; MCT: maceração; n.i: parâmetro não informado; RSL: razão sólido-líquido; RT: temperatura ambiente; SX: Soxhlet; TPC: calculado em termos de conteúdo de fenólico total dependendo do estudo citado.

4. Técnicas não convencionais de extração

As técnicas não convencionais, ou também classificadas por alguns autores como técnicas verdes, apresentam muitas vantagens em relação às convencionais, como menor tempo de extração, melhor controle de temperatura, menor exposição à luz da amostra e do extrato, seletividade e maiores rendimentos do extrato. Além disso, técnicas não-convencionais permitem o uso de menor quantidade de solvente e, em alguns casos, além do solvente ser geralmente definido como GRAS, ele é reciclado ciclicamente (Belwal et al., 2018; Chemat, Abert-Vian, et al., 2019). Os métodos mais comuns empregados para obter compostos bioativos de matrizes naturais são UAE, MAE, PLE e SFE (Da Silva et al., 2020; Ferrentino et al., 2018; Moreira et al., 2017; Lu Wang et al., 2019).

4.1. Extração Assistida por Ultrassom (UAE)

A extração assistida por ultrassom (UAE) tem sido utilizada para obter um amplo espectro de compostos naturais por meio de banho ultrassônico e/ou sonda ultrassônica. O ultrassom (US) permite ciclos contínuos de compressão/descompressão das bolhas dentro do solvente de extração que causam os fenômenos de cavitação (He et al., 2016). Além disso, a UAE pode atuar na extração por mecanismos únicos ou combinados, incluindo fragmentação, erosão, capilaridade, destexturação e sonoporação (Chemat et al., 2017). A soma dos efeitos de US no meio de extração facilita a ruptura da estrutura física da matéria-prima, diminui o tamanho de partícula da amostra, aumenta a transferência de massa difusional e convectiva e, portanto, aumenta a eficiência de extração por um melhor contato soluto-solvente.

A Tabela 3 resume os principais trabalhos com UAE para obter compostos fenólicos de subprodutos da maçã, incluindo seus parâmetros operacionais, tipo de UAE e os compostos mais importantes analisados. Ajila et al. (2011) testaram diferentes solventes para extrair polifenóis do bagaço de maçã e concluíram que 80% de acetona em água (v/v) promoveu o maior rendimento de compostos alvo, resultando em eficiência de extração três vezes maior do que o mesmo processo realizado usando água pura como solvente.

Tabela 3. UAE e MAE aplicados para obter fenólicos de maçã incluindo os parâmetros operacionais, os compostos mais importantes analisados e as melhores condições relatadas.

Técnica	Amostra	Solvente (% v/v)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Frequência (kHz)	Potência (W)	RSL (g/mL)	Compostos analisados	Recuperação da extração (TPC)	Melhores condições	Referências
US (banho)	Bagaço de maçã	Água, ACT 60-80, ETOH 60-80, MEOH 60-80	40	30	n.i	n.i	0,05	n.i	n.i.	80% ACT, 30 min, 40 °C	Ajila et al. (2011)
US (banho)	Bagaço de maçã	Água	9,9-40	5-55	25	0,335-0,764 (W/cm ²)**	-	(-)Epicatequina, Floridzina, Ácido Clorogênico	5,55 mg/g	Água, 40 °C, 40 min, 0,764 W/cm ²	Pingret et al. (2012)
US (banho)	Maçã Verde	ETOH 50-70	50-70	20-30	n.i	420-560	0,04	(-)Epicatequin, Procianidina B2, Ácido Clorogênico, Procianidina B1	13,26 mg/g	50% ETOH, 519,39 W, 30 min, 50 °C	Yue et al. (2012)
US (banho)	Bagaço de maçã	ETOH	RT	30	n.i	n.i	0,05	Ácido Gálico, Ácido Clorogênico, Catequina, Rutina, Ácido Ursólico, Floridzina	n.i.	-	Grigoras et al. (2013)

US (banho)	Maçã fresca, velha e casca	MEOH 40-100, MEOH (0.1% HCl)	RT	5-15	n.i.	n.i.	0,04-0,1	Flavonols, Antocianinas, Dihidrochalconas, Flavan-3-Ols	0,181 to 4,992 mg/g	80% MEOH, 15 min	Jakobek et al. (2015)
US (banho)	Maçã	Água	20	0-30	21 or 40	180	0,25	n.i	5,43 and 10,46 mg/g	Água, 20 °C, 21 kHz, 30 min and 180 W ou Água, 20 °C, 40kHz, 5 min	Wiktor et al. (2016)
US (banho)	Bagaço de Maçã	Água, ETOH, Água (1% Rokanol)	20	30	n.i.	n.i.	0,05	Catechina, Quercetina, Derivados de Floretina, p-coumaril-quinico, Criptoclorogenico, Ácido Clorogênico	0,88 mg/g	ETOH, 20 °C, 30 min, RSL 0,05	Malinowska et al. (2018)
US (banho)	Casca e polpa de maçã	MEOH 20-100	20-80	20-40	35	n.i.	0,06-0,02	Ácido Clorogênico, Epicatequina, Floridzina, Catequina, Hiperosideo, Quercitina	n.i.	MEOH 100%, 33 min, 65 °C (casca) or 20% MEOH, 40 min, 80 °C (polpa)	Mihailović et al. (2018)

US (banho)	Casca da macieira	Água, ETOH 20-100, MEOH 20-100, ACT 20-100	60	30	n.i.	800	0,01	Epicatequina galato, Kaempferol-3-glucosideo, Naringina, Naringenina, Rutina, Floridzina, Floretina, Procianidina B1, Procianidina B2, Ácido Vanílico, Ácido Gálico, Ácido Ferulico, Ácido p-Coumárico, Ácido Cafeico	29 mg/g	ETOH 40 – 80%, 60 °C, 30 min, 800 W	Withouck et al. (2019)
US (banho)	Bagaço de maçã	Água, ETOH 50-100, MEOH 50-100	60	30	37	n.i.		ácido Gálico /Protocateico, Ácido Clorogênico, Epicatequina, Rutina, Hiperosideo, Derivados de Quercetina, Quercetina Ramnosideo, Floretina Xilosil Glucosideo, Floridzina	-	MEOH 80, 30 min, 60 °C, 37 kHz	Da Silva et al. (2020)
US (probe)	Polpa e casca de maçã	Água	50	180	24	0-118	0,1	Catequina	-	-	Wang et al. (2018)
US (probe)	Casca de maçã	ETOH 0-96	25-40	30	24	0-400	0,1	n.i	-	50% ETOH, 50 W	Wang et al. (2019)

UAMME	Bagaço de maçã	Água, ETOH, Água (1% Rokanol)	20	30	n.i.	n.i.	0,05	Catequina, Quercetina, Derivados de Floretina, p-coumarilo-quinico, Criptoclorogênico, Ácido Clorogênic	6,9 mg/g	Água (1% Rokanol), 20 °C, 30 min, RSL 0,05	Malinowska et al. (2018)
MAE	Bagaço de maçã	Água, ACT 60-80, ETOH 60-80, MEOH 60-80	30-80	5-15	-	400	0,05	n.i	16,1 mg/g	80% ACT, 10 min, 40-60 °C	Ajila et al. (2011)
MAE	Bagaço de maçã	ETOH Acetato de Etila, Água:MEOH	RT	1,5	-	1000	0,05	Ácido Gálico, Ácido Clorogênico, Catequina, Rutina, Ácido Ursólico, Floridzina	n.i.	-	Grigoras et al. (2013)
MAE	Bagaço de maçã	Água, ETOH 35 - 100	RT	5 - 20	-	90 – 360	0,1 – 0,3	n.i.	127 mg/g	90 W, 15 min,	Rezaei et al. (2013)
MAE	Casca da macieira	ACT 70, ETOH 60	RT	0,5-3	-	100-900	0,083-0,25	Floridzina, Ácido Cafeico, Ácido Clorogênico, Quercetrina	15,8 mg/g	RSL 0.09, 60% ETOH, 735 W, 2,48 min	Chandrasekar et al. (2015)
MAE	Pó de maçã	ETOH 40-80	RT	15-35	-	400-800	0,1	n.i.	30,8 mg/g	40% ETOH, 25 min, 400 W	Pavlić et al. (2017)

MAE	Resíduos de casca da macieira	Água, ETOH 20-100, MEOH 20-100	66-134	3-37	-	n.i	0,004	Ácidos Fenólicos, Floridzina, Miricetina, Kaempferol-3- <i>O</i> -Glucosideo, Naringina e Quercetin-3- <i>O</i> -Glucopyranosideo	47,7 mg/g	60% ETOH, 20 min, 100 °C	Moreira et al. (2017)
MAE	Casca da maçã	ETOH 20 - 100	90 - 150	30 - 90	-	n.i.	0,1	Epigalocatequina galato, Rutina, Quercetina, Ácido Gálico, Catequina e Ácido Protocateico	50,4 mg/g	n.i.	Casazza et al. (2020)

ACT: acetona; ETOH: etanol; MEOH: metanol; n.i: parâmetro não informado; RT: temperatura ambiente; TPC: calculado em termos de teor de fenólicos totais dependendo do estudo citado; UAMME: extração micelar mediada por ultrassom. *Potência ultrassônica expressa em potência (W) por massa da amostra (g). **Intensidade ultrassônica expressa em potência (W) por área do diâmetro interno do reator de ultrassom (cm²).

Da Silva et al. (2020) avaliaram os efeitos de diferentes solventes (água pura, etanol (50-100%, (v / v)) e metanol (50-100%, (v / v / l)) na extração de fenólicos do bagaço de maçã, sendo 80 % metanol (v/v) o melhor solvente para recuperação destes compostos. Solventes orgânicos, como etanol ou suas misturas, são os mais indicados para extrair fenólicos (por exemplo, flavonoides) de maçãs (Grigoras et al., 2013; Yue et al., 2012).

Withouck et al. (2019) não mostraram diferenças significativas ao extrair compostos fenólicos do caule de macieira com misturas de solventes orgânicos entre 40 e 80% (v / v solvente / água), a 60 °C, por 30 min usando UAE. No entanto, o etanol foi significativamente melhor do que outros (metanol e acetona) na extração desses compostos. Em contraste, a água pura é a mais adequada para extrair compostos polares, como ácidos fenólicos (Li et al., 2018; Pingret et al., 2012; Wiktor et al., 2016).

Diferentes propriedades de cada solvente são responsáveis por melhorar a extração de uma classe específica de compostos. A água atua como um emoliente das amostras eluindo os compostos polares, enquanto os solventes orgânicos penetram facilmente nas amostras extraindo compostos com menos polaridade do que aqueles extraídos pela água (Azmir et al., 2013; Da Silva et al., 2020b; Lu Wang et al., 2019; Yue et al., 2012). Assim, extrações com solvente gradiente (mais polar para menos polar ou vice-versa) podem ser uma excelente alternativa para recuperação sequencial de diferentes compostos em frações específicas, otimizando todo o potencial da biomassa. Além disso, deve-se atentar para o uso de solventes com baixo ponto de ebulição, pois, dependendo da potência do ultrassom e do tempo de exposição, a temperatura do solvente pode atingir a temperatura de ebulição, o que causa perda de solvente por volatilização.

A temperatura é outro parâmetro que deve ser cuidadosamente controlado na UAE, uma vez que o processo mecânico das ondas ultrassônicas pode ser dissipado como calor, resultando em superaquecimento do solvente e degradação dos compostos desejados. Além disso, o calor transferido para o sistema pode gerar um custo adicional ao processo (em termos de custos e ambientais) (Chemat et al., 2011).

Por exemplo, Grigoras et al. (2013) extraíram compostos fenólicos de bagaço de maçã usando etanol como solvente em temperatura ambiente. Em contrapartida, Pingret et al. (2012) testaram diferentes temperaturas (10 a 40 ° C) usando etanol como solvente de extração para recuperação de compostos fenólicos do bagaço de maçã. Os autores deste último trabalho notaram que os maiores rendimentos de extração foram obtidos a 40 °C, utilizando etanol 50%, 0,142 W/g, 25 kHz, em 45 min, e água em 40 min e 0,764 W/cm², respectivamente.

Yue et al. (2012) estudaram a extração fenólica de maçã verde variando a temperatura e o tempo de extração de 50 a 70 °C e de 20 a 30 min, respectivamente. Os autores observaram que a menor temperatura e o maior tempo geraram o maior rendimento fenólico total ($13,26 \pm 0,56$ mg GAE/g d.m.) e avaliaram diferentes temperaturas (20–80 °C) e tempo de extração (20–40 min) para obter fenólicos da casca e da polpa da maçã. Nesse caso, 65 °C e 33 min, com metanol puro, foram considerados as condições ótimas para a casca da maçã, enquanto 80 °C e 40 min com 20% de metanol foi a melhor condição para a polpa; portanto, diferentes matrizes e composições de solventes interferiram levemente nos resultados quanto ao tempo e às temperaturas.

Ainda assim, em relação à temperatura, segundo trabalho de revisão realizado recentemente por Kumar et al. (2021), a operação de maior temperatura com UAE pode afetar o rendimento de extração por três hipóteses diferentes. A primeira descreve que a alta temperatura aumenta o vapor de solvente na bolha de cavitação, reduzindo o gradiente de pressão dentro e fora da bolha. Portanto, embora o número de bolhas de cavitação seja significativo, elas implodem com menos intensidade em altas temperaturas, causando menos danos à célula e diminuindo o rendimento.

A segunda hipótese inclui que o aumento da tensão de cisalhamento provoca a degradação do componente desejado devido ao grande número de bolhas de cavitação formadas em altas temperaturas e consequente colapso. Além disso, a terceira hipótese diz respeito à redução da tensão superficial do solvente em temperaturas mais altas, reduzindo a intensidade da bolha de cavitação. Assim, a temperatura deve ser avaliada cuidadosamente para determinar a faixa específica que potencializa o desempenho de extração e evita a degradação dos compostos alvo.

Além da temperatura, a frequência e a potência da UAE são os parâmetros mais estudados nesta técnica. A Tabela 3 mostra que o intervalo de frequência aplicado para recuperar compostos fenólicos de diferentes amostras de maçã variou de 21 a 40 kHz. Foi relatado que a UAE de baixa frequência (<120 kHz) são preferíveis na extração de compostos bioativos de matérias-primas naturais; o US de baixa frequência permite a formação de um número menor de bolhas de cavitação com grande diâmetro do que o US de alta frequência (> 120 kHz). Bolhas mais extensas aumentam o efeito de cavitação ao danificar a estrutura celular e liberar os compostos alvo, aumentando o rendimento de extração (Kumar et al., 2021, Chemat et al., 2017).

Curiosamente, Wiktor et al. (2016) avaliaram os efeitos da frequência (21 ou 40 kHz) e do tempo de extração (0-30 min) sobre os fenólicos do tecido de maçã após serem

tratados por US, concluindo que 21 kHz por 30 min ou 40 kHz por 5 min exibiu o maior rendimento de compostos fenólicos totais de extração, a saber, $543,4 \pm 21,3$ e $1046,5 \pm 18,9$ mg ácido clorogênico/100 g dm. Os resultados relatados pelos autores sugerem que o aumento na frequência requer menos tempo de extração e resulta em maior rendimento, e portanto pode haver um ponto de inflexão de frequência para maximizar o rendimento da extração. No entanto, a frequência ainda é um campo fértil para pesquisas, visto que poucos estudos estão disponíveis evidenciando o efeito desse parâmetro. Além disso, frequências muito altas (além de 500 kHz) podem ser aplicadas para sonoporação reversível e irreversível semelhante à que ocorre na aplicação biológica (absorção celular de moléculas e destruição celular, respectivamente) (Chemat et al., 2017); entretanto, esta questão também merece pesquisas futuras para ser validada para extração de materiais naturais.

A potência da UAE também é um parâmetro crucial para se otimizar, uma vez que afeta os mecanismos da UAE mencionados acima, e, conseqüentemente, o desempenho da extração. Pingret et al. (2012) relataram uma relação direta do poder da UAE com o rendimento de extração de fenólicos do bagaço de maçã. Por outro lado, Yue et al. (2012) avaliaram a potência da UAE (420-560 W) para extrair compostos fenólicos de maçãs verdes. Este autores observaram que a maior potência diminuiu a recuperação dos compostos, onde 50% de etanol (v/v) a 519,39 W, 30 min e 50 °C, foi a condição ótimo entre as testadas.

Wang et al. (2019) estudou diferentes temperaturas (25-40 °C) e potência ultrassônica (0-400 W) para extrair polifenóis da casca da maçã usando sondas ultrassônicas. Os autores notaram que a condição ótima foi alcançada com menor potência (50 W) em um menor tempo de extração (30 min). Assim, junto com a temperatura e pelos mesmos motivos, a potência da UAE deve ser avaliada com cuidado. Alguns trabalhos relatam que o aumento da potência da UAE favorece o rendimento da extração até certo ponto e, acima disso, os mecanismos da UAE são afetados pela formação de bolhas; uma alta concentração de bolhas leva a uma colisão, deformação e colapso não esférico entre as bolhas, resultando em menor impacto entre as bolhas e a matéria-prima, o que afeta negativamente o rendimento da extração (Kumar et al., 2021). Além disso, a potência muito alta pode afetar o rendimento de extração de compostos alvo devido à degradação molecular, especialmente quando altas potências são combinadas com água como solvente. A UAE pode dissociar as moléculas de água em radicais livres que podem desencadear a oxidação de compostos e quebra das ligações (Dias et al., 2021).

O tipo de dispositivo ultrassônico é outro parâmetro determinante que influencia o rendimento da extração. Banhos e sondas são os dispositivos ultrassônicos normalmente utilizados. Os banhos ultrassônicos são os mais amplamente disponíveis e baratos. Nesta configuração, a energia pode ser espalhada no vaso para ser transferida para a amostra. Além disso, em banhos, as ondas ultrassônicas podem ter dificuldade em penetrar nas partículas menores, demorando mais tempo de extração e diminuindo a eficiência da extração (Chemat et al., 2017).

Em contraste, as sondas ultrassônicas induzem a transferência de energia ultrassônica diretamente para o meio. Conseqüentemente, os fenômenos de cavitação são mais pronunciados, melhorando os rendimentos de extração (Dias et al., 2017). Por outro lado, o contato direto da sonda com o meio pode contaminar o extrato com metais devido à erosão. Além disso, a sonda ultrassônica processa apenas uma amostra por vez, enquanto os banhos ultrassônicos permitem o processamento de várias amostras simultaneamente (Dias et al., 2021).

A tecnologia de ultrassom tem se mostrado eficaz na extração de várias matérias-primas, principalmente devido ao aumento do rendimento da extração e redução do tempo de processamento. Porém, a tecnologia ainda apresenta diversos desafios a serem superados, principalmente em escalas industriais; as evidências indicam que é necessário considerar o custo de implantação e o consumo de energia (processos mais verdes devem demandar menos energia). Nesse sentido, a aplicação de ondas ultrassônicas em momentos específicos do processo deve ser validada experimental e economicamente. Por exemplo, a aplicação no início do processo de extração pode acelerar a saturação do solvente. Da mesma forma, a aplicação no final do processo de extração pode aumentar a taxa de transferência de massa difusional (Dias et al., 2021). Em ambos os casos, é possível economizar tempo e energia. Outro aspecto crítico a considerar é o aumento de escala; é aconselhável manter a densidade de energia constante (J / m^3) na transposição da escala, implicando no aumento da potência proporcional ao novo volume, ou então o tempo de extração precisará ser estendido. Conseqüentemente, as sondas ultrassônicas são restritas para escalas de pequeno volume; alternativamente, sistemas contínuos ou banhos ultrassônicos com uma superfície de radiação maior e um sistema de agitação podem ser usados (Chemat et al., 2017; Dias et al., 2021).

4.2. Extração Assistida por Microondas (MAE)

A combinação de extração sólido-líquido com radiação de microondas é definida como extração assistida por microondas (MAE). Resumidamente, a MAE é aplicada para extrair produtos solúveis em um fluido usando energia de microondas para aquecer a mistura solvente-amostra, acelerando a rachadura (ou ruptura) das paredes celulares das matrizes vegetais. Além disso, a energia de microondas modifica as propriedades físicas dos tecidos biológicos, melhorando o acesso por meio da porosidade e os rendimentos de extração (Rahath Kubra et al., 2016). Geralmente, a escolha do solvente para extrair compostos fenólicos de maçãs é baseada em solventes com água. A alta constante dielétrica da água é um ponto crucial na MAE, uma vez que a absorção de microondas depende da maior polaridade dos solventes. A maior absorção das ondas promove um aumento na temperatura da mistura, rompimento celular e conseqüentemente uma melhor extração dos compostos da matriz (Bouras et al., 2015).

Sistemas abertos e fechados podem ser usados no MAE. A extração em sistemas abertos é realizada à pressão atmosférica. Conseqüentemente, a temperatura máxima é definida pelo ponto de ebulição do solvente, e as perdas de vapores podem ser evitadas por sistemas de resfriamento no topo do vaso de extração que promovem a condensação dos vapores. Os sistemas fechados evitam este problema pelo aumento da pressão e permitem temperaturas acima do ponto de ebulição. Porém, a temperatura sobe rapidamente em sistemas fechados, dificultando o controle da temperatura, prejudicando os compostos termolábeis. Portanto, a temperatura deve ser suficiente para aumentar o rendimento de extração, porém não alta o suficiente para degradar os compostos alvo (Rostagno & Prado, 2013).

A Tabela 3 também resume os estudos que extraíram compostos fenólicos de maçãs por MAE. Os principais parâmetros operacionais, os compostos mais importantes analisados e as melhores condições relatadas são mostrados.

Ajila et al. (2011) estudaram os efeitos de diferentes solventes, temperatura e tempo no MAE de fenólicos do bagaço de maçã, concluindo que 80% de metanol (v / v) a 40-60 °C por 10 min promoveu o melhor rendimento de extração (16,12 mg / g). Em uma abordagem semelhante, Chandrasekar et al. (2015) testaram a influência de diferentes solventes, tempo e potência no desempenho de extração de fenólicos da caule de macieira. Neste caso, a melhor condição foi alcançada para etanol a 60% (v / v) a 735 W por 2,5 min rendendo 15,8 mg/g. Os autores mostraram que a interação entre solvente

e potência foi significativa e inversa, o que significa que o rendimento de extração aumenta quando um parâmetro aumenta e o outro diminui. Em outro estudo, Rezaei et al. (2013) concluíram que aumentar a potência de microondas de 90 W para 360 W diminui os rendimentos de extração (127 a 104 mg TAE / g d.m.). Os autores deste estudo também observaram 65% de etanol com RSL a 0,2 por 15 min, e uma potência de 90 W como melhor condição para extrair compostos fenólicos do bagaço de maçã usando MAE. Vale a pena mencionar que a escolha da potência deve considerar uma combinação com outros parâmetros operacionais (por exemplo, temperatura, concentração de solvente, tempo) para atingir um processo otimizado completo.

De acordo com a Tabela 3, a temperatura utilizada nos estudos para recuperação de fenólicos de maçãs pelo MAE variou de 30 a 134 °C. Moreira et al. (2017) avaliaram os efeitos de diferentes solventes (água pura, etanol (20–100%, v / v) e metanol (20–100%, v / v)), temperatura (66–134 ° C) e tempo (3-37 min) para extrair compostos fenólicos de resíduos de caule de macieira. O uso de etanol 60% (v / v) a 100 °C por 20 min foi considerado a melhor condição, recuperando $47,7 \pm 0,9$ mg GAE/g d.m. que incluiu ácidos fenólicos, floridzina, miricetina, kaempferol-3-o-glucosídeo, naringina e quercetina-3-o-glucopiranosídeo. Por outro lado, Pavlić et al. (2017) mostraram que o menor rendimento de fenólicos do pó de maçã descartado do subproduto industrial foi encontrado em processos de extração de MAE onde os parâmetros investigados foram maiores (60% de etanol, 35 min a 800 W). Além disso, os autores mostraram que apenas fatores como tempo e concentração de etanol e sua interação foram significativamente relevantes ($p < 0,05$) na recuperação dos fenólicos totais. Ou seja, o tempo maior pode promover a degradação de compostos sensíveis durante o processo de extração.

Casazza et al. (2020) identificaram que quanto maior a proporção de solvente orgânico (etanol), temperatura e tempo, maior a recuperação de flavonoides totais (13,9 mg equivalentes de catequina/g d.m.) para a extração da subclasse de flavonoides (como galato de epigallocatequina, rutina, quercetina, ácido gálico, catequina e ácido protocateico) da casca da maçã usando MAE. No entanto, novos experimentos são necessários para entender a relação entre temperatura e outros parâmetros operacionais na extração de fenólicos de maçãs por MAE, especialmente a estabilidade de compostos.

Resumindo, a MAE foi desenvolvido ao longo de vários anos em escala de laboratório para superar as limitações de aumento de escala. Hoje em dia, a tecnologia torna-se realidade e, embora poucos estudos sublinhem o potencial da MAE à escala

industrial, algumas instalações industriais ou pilotos podem oferecer a possibilidade de extrair cerca de 100 kg de material fresco.

4.3.Extração por Líquidos Pressurizados (PLE)

Outra técnica alternativa e potencialmente mais ecológica utilizada para recuperar compostos bioativos de matrizes vegetais é a PLE, também denominada Extração Acelerada por Solvente (ASE), entre outras. A PLE apresenta algumas vantagens, como tempo de extração mais rápido, menor consumo de solvente e ajuste preciso dos parâmetros operacionais (Machado et al., 2015). Além disso, os solventes GRAS (por exemplo, água e/ou etanol) tornam o processo mais seguro para os operadores e menos poluente do que as técnicas convencionais. A PLE pode operar em temperaturas mais elevadas (acima do ponto de ebulição do solvente) desde que o solvente seja pressurizado, o que permite que o solvente seja mantido no estado líquido; tal característica melhora as propriedades do solvente e aumenta a dessorção e solubilidade dos compostos pretendidos (Mustafa & Turner, 2011).

A Tabela 4 mostra estudos com PLE para recuperar compostos fenólicos de maçã e subprodutos da maçã, incluindo os compostos mais importantes analisados e as melhores condições relatadas.

Tabela 4. Resumo dos estudos que aplicaram PLE e SFE para obter compostos fenólicos da maçã, incluindo os parâmetros operacionais, os compostos mais importantes analisados e as melhores condições relatadas.

Técnica	Amostra	Solvente (%, v/v)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	RSL (g/mL)	Pressão (MPa)	Compostos Analisados	Recuperação da Extração (TPC)	Melhores condições	Referências
PLE	Casca e polpa da maçã	Água, MEOH 100	40-100	5-15	0,09 ou 0,13	6,89 - 10,34	(+)- Catequina, Procianidina B2, (-)- Epicatequina, Floretina-2'- Xiloglucosídeo, Floridzina, Hiperosídeo, Isoquercitrina, Quercetina Glicosídeos, Rutina, Avicularina, Quercitrina, Ácido Clorogênico, derivados de Ácido <i>P</i> - Coumárico	n.i.	40 °C, 5 min, 6,89 MPa, 2 ciclos de extração	Alonso- Salces et al. (2001)
	Bagaço da Maçã	ETOH 14-85	64-135 or 153-200	5	0,04	10,3	Ácido Clorogênico, Ácido Cafeico, Ácido <i>P</i> - Coumarico, Quercetina Glicosídeo, Rutina, Quercetina Glicosídeo, Floretina Glicosídeo	14,42 mg/g	60% ETOH, 102 °C	Wijngaard & Brunton (2009)
	Bagaço da Maçã	ETOH	40	15	0,08	10	Ácido Gálico, Ácido Clorogênico, Catequina, Rutina, Ácido Ursólico, Floridzina	n.i.	-	Grigoras et al. (2013)

	Maçã	MEOH ACT 70	RT	1-15	0,007 – 0,07	1	Monômeros de Flavan-3- Ol ((+)-Catequina, (-)- Epicatequina), Floridzina, Ácido Clorogênico, Hiperosideo, Isoquercitrina, Quercitrina	4,113 mg/g	MEOH, 15 min, 3 ciclos de extração	Franquin- Trinquier et al. (2014)
	Bagaço da Maçã	Água, ETOH 50–100, MEOH 50–100	60	30	0,04	10	Ácido Gálico/Protocateico, Ácido Chlorogênico, Epicatequina, Rutina, Hiperosideo, Derivados de Quercetina, Quercetina Ramnosideo, Floretina Xilosil Glucosideo, Floridzina	-	ETOH 50- 80%, 30 min, 60 °C, 10 MPa	Da Silva et al. (2020)
SFE	Bagaço da Maçã	CO ₂ + ETOH 75	50	180	0,27	25	Ácido Clorogênico, Catequina, Epicatequina, Floridzina, Quercetina-3- Glucosideo, Quercetina-3- Galactosideo, Quercetina- 3-Arabinosideo, Quercetina-3-Xilosideo, Quercetina-3-Ramnosideo	-	CO ₂ + 25 mol% co- solvente, 25 MPa, 50 °C	Massias et al. (2015)
	Bagaço da Maçã	CO ₂ + ETOH 5	45-55	120	n.i.	20 e 30	Ácido <i>P</i> -OH Benzoico, Floridzina, Epicatequina, Quercetina, Floretina	8,87 mg/g	5% ETOH (co- solvent), 30 MPa, 45 °C, 120 min	Ferrentino et al. (2018)

Semente de maçã	CO ₂	35-60	0-120	0,008 – 0,002	10 - 30	n.i.	8,21 mg/g	25 MPa, 60 min, 45 °C, 2,5 mL/min	Panadare et al. (2021)
-----------------	-----------------	-------	-------	---------------	---------	------	-----------	-----------------------------------	------------------------

ACT: acetona; ETOH: etanol; MEOH: metanol; n.i: parâmetro não informado; RT: temperatura ambiente; TPC: calculado em termo de teor de fenólicos totais a depender do estudo citado.

Alonso-Salces et al. (2001) estudaram os efeitos de diferentes solventes (água pura e metanol (100%, v / v)), temperatura (40–100 ° C), tempo de extração (5–15 min) e pressão (6,89–10,34 MPa) para obter fenólicos da casca e da polpa da maçã, concluindo que 40 °C, 6,89 MPa e 5 min foi a condição operacional ótima para recuperar os compostos fenólicos. Temperaturas acima dessa diminuíram o rendimento por reações de hidrólise ou polimerização.

Wijngaard & Brunton (2009) usaram PLE para extrair fenólicos do bagaço de maçã em diferentes concentrações de etanol (14–85%, v / v) e temperaturas (64–135 °C ou 153–200 °C) a 10,3 MPa. Temperaturas mais amenas (75-125 °C) promoveram um melhor rendimento de extração (1442 ± 58 mg GAE/100 g d.m.) de fenólicos totais a 102 °C. Concluiu-se que um novo aumento da temperatura (até 200 °C) forma produtos indesejáveis, como o hidroximetilfurfural.

As divergências quanto à temperatura ótima para obtenção de compostos bioativos são recorrentes na literatura. Portanto, é fundamental que a comunidade científica analise criticamente os resultados quando a temperatura é avaliada. Por exemplo, é compreensível que o rendimento fenólico total aumente mesmo em altas temperaturas (> 100 °C), pois pode haver, além da extração, a hidrólise do material lignocelulósico em ácidos fenólicos e outros compostos, contribuindo para imprecisão dos resultados e dos fenômenos que regem o processo e, portanto, o rendimento. Esse efeito é particularmente relevante na avaliação de resultados baseados em análises espectrofotométricas, como fenólicos totais, que podem ser afetados por muitos compostos, levando a observações conflitantes. Portanto, uma análise crítica de cada composto alvo individualmente é necessária e, com isso, um entendimento melhor e mais profundo do efeito da temperatura pode ser alcançado.

Franquin-Trinquier et al. (2014) obtiveram fenólicos por PLE de maçã usando metanol puro e acetona (70%, v / v) à temperatura ambiente e 1 MPa, durante intervalos de extração de 1 a 15 min, e ciclos de extração de 1 a 3. Os autores notaram que metanol puro foi o solvente mais adequado para extrair ácido clorogênico, hiperosídeo e quercitrina, por 15 min e três ciclos de extração.

Da Silva et al. (2020) recuperou fenólicos de bagaço de maçã por PLE e outras técnicas (UAE, agitador e agitação magnética). Os autores empregaram diferentes solventes (água pura, etanol (50-100%, v / v) e metanol (50-100%, v / v)) a 60 °C, 10 MPa por 30 min, sendo metanol (50-80 %, v / v) o melhor solvente para extrair ácidos fenólicos e flavonoides. Os autores encontraram maiores quantidades desses compostos

no PLE do que nas outras técnicas (pelo menos o dobro do rendimento em comparação com os processos convencionais).

Embora a PLE seja muito útil para alcançar rendimentos mais elevados em tempos de extração mais curtos, não é uma técnica seletiva. Assim, os autores discutem que para um melhor desempenho de extração, é desejável a associação/acoplamento de algumas técnicas diferentes (como a SPE) de forma a concentrar o extrato nos compostos alvo, melhorando não só o rendimento da extração, mas também a seletividade, que poderia ajudar na aplicação posterior do extrato. A PLE acoplada à extração em fase sólida (SPE) foi a técnica que melhor recuperou os fenólicos do bagaço de maçã, com recuperações de ácidos fenólicos iguais a $2,85 \pm 0,19$ mg /g e flavonoides iguais a $0,97 \pm 0,11$ mg/g. A busca por solventes alternativos também pode ser uma estratégia para melhorar a seletividade de compostos por PLE. Conforme evidenciado, têm sido utilizados principalmente solventes orgânicos e água e, portanto, com a formulação de novos solventes como solventes eutéticos e ILs, outras opções estão disponíveis e podem ser usados como solvente principal ou como cosolvente em etanol ou água.

A PLE tem sido amplamente empregado para aplicações em escala de laboratório, e estudos relatam em geral como o mais eficiente (alto rendimento de extração e menor tempo de extração) para obter compostos polares sendo economicamente viável em larga escala (Viganó et al., 2017). Além disso, a PLE é facilmente escalonável e automatizada. No entanto, a literatura carece de estudos que realizem aumento de escala para garantir que os rendimentos de extração e a composição do extrato tenham reprodutibilidade em larga escala. Junto com o aumento da escala de produção, o acoplamento da PLE a outros métodos de extração também é uma perspectiva, principalmente devido à integração de processos para concretizar o conceito de biorrefinaria.

4.4. Extração com Flúidos Supercríticos (SFE)

Embora apresente muitas vantagens, dentre as técnicas não convencionais, a SFE é a menos utilizada para processar matérias-primas à base de maçã, provavelmente porque a SFE é um excelente candidato para a extração de compostos apolares que se encontram em menores concentrações ou são compostos menos visados nestas matrizes. Apesar disto, a SFE surge como uma alternativa limpa e ecológica para recuperar compostos bioativos. As principais vantagens da SFE em comparação com as técnicas convencionais é o uso de temperaturas mais suaves, quantidade reduzida de solvente, maior pureza dos

extratos (isto é, seletividade) e custos de energia reduzidos. O solvente mais utilizado na SFE é o dióxido de carbono (CO₂), que possui propriedades de transferência de massa aprimoradas devido à sua densidade e viscosidade. Além disso, o CO₂ supercrítico é um solvente GRAS, não tóxico, relativamente inerte e totalmente recuperado ao final do processo (Dias et al., 2016). Além disso, na SFE com CO₂, o extrato livre de solventes é obtido pela despressurização do fluido, o que impacta na economia de energia para evaporação dos solventes; além de não deixar solvente orgânico residual no extrato final, ao contrário das técnicas dependentes de solventes líquidos.

Um estudo recente de Panadare et al. (2021) usou SFE para extrair compostos voláteis de sementes de maçã e obtiveram um rendimento de 8,21 mg GAE/g. Os parâmetros do processo foram 25 MPa, 60 min, 45 °C, fluxo 2,5 mL/min. No entanto, a SFE pode ser realizado adicionando cosolventes (etanol, água) para superar os baixos rendimentos; conseqüentemente, a dessorção de compostos polares das matrizes vegetais é favorecida (Xu et al., 2017).

Na Tabela 4, pode-se observar o uso do etanol como cosolvente adicionado ao CO₂, aumentando o rendimento da extração de compostos fenólicos do bagaço de maçã. Massias et al. (2015) extraíram fenólicos do bagaço de maçã por meio de SFE a uma temperatura fixa (50 °C), tempo de extração (180 min) e pressão (25 MPa). Além disso, os autores usaram 25% de etanol em uma concentração maior (75%, v / v) adicionado ao CO₂, uma vez que a presença de derivados de glucosídeo de quercetina associados a compostos polares torna esses componentes menos extraíveis em solventes apolares.

Com relação às aplicações de cosolventes, é relevante para a comunidade científica considerar criticamente a quantidade usada, uma vez que pode ter implicações críticas (literalmente). A adição do cosolvente altera o equilíbrio de fase e pode levar o sistema a condições fora da região crítica dependendo da proporção utilizada. Por exemplo, Ferrentino et al. (2018) comparou a SFE para recuperar compostos fenólicos de bagaço de maçã fresco com e sem cosolvente (etanol (5%, v / v) a pressões de 20 e 30 MPa, intervalos de temperatura de 45 a 55 °C por 120 min. Os resultados mostraram que obteve-se um rendimento ótimo de extração de compostos fenólicos totais quando se empregou o cosolvente, bem como a utilização da menor temperatura e da maior pressão. Em um processo supercrítico, a variação da pressão e da temperatura altera a densidade do CO₂ e seu poder de solvatação. Altas densidades induzem menores espaços e maiores interações entre as moléculas (Dias et al., 2021). A partir deste ponto, os autores puderam

inferir que a redução da pressão e da temperatura resultou em um maior poder de solvatação.

Tal como acontece com outras técnicas, a temperatura também precisa ser avaliada cuidadosamente na SFE. Dependendo dos compostos alvo, a solubilidade pode ter um efeito inverso na SFE. Compostos melhor extraídos em altas densidades de solvente serão favorecidos quando temperaturas mais próximas do limite crítico forem usadas. Por outro lado, para matérias-primas cuja extração depende da pressão de vapor dos solutos, o aumento da temperatura favorece a extração. Geralmente, temperaturas superiores a 80 °C não são usuais em SFE e, portanto, a degradação térmica não é apresentada como um problema para a maioria dos compostos fenólicos.

Análogo ao PLE, a SFE é facilmente escalonável e automatizada e, na verdade, é um método de extração com aplicações industriais em grande escala. Porém, conforme mencionado anteriormente, a SFE utiliza principalmente o CO₂ como solvente, tornando-o menos eficiente na extração de compostos fenólicos. Diante disso, a aplicação de CO₂ com novos cosolventes ou mesmo a investigação de outros solventes alternativos ao CO₂ poderia ser uma abordagem sensata para superar suas limitações na obtenção de compostos de maior polaridade.

5. Processos sequenciais de extração

Os vários desafios envolvidos na extração e purificação de compostos de produtos naturais levam a abordagens inovadoras para superá-los. Por exemplo, a combinação de diferentes técnicas tem sido amplamente utilizada para recuperar compostos fenólicos de matrizes vegetais e melhorar a extração dos compostos pretendidos (Viganó et al., 2016). As principais vantagens dos processos combinados são maiores rendimentos de extração, menor quantidade de solvente, menor tempo e maior purificação e/ou separação dos produtos finais (Rostagno & Prado, 2013; Santos et al., 2019; Souza et al., 2020; Sumere et al., 2018; Lu Wang et al., 2019).

A extração em fase sólida é uma tecnologia que vem ganhando espaço em extração de polifenóis. A técnica utiliza um adsorvente sólido para adsorver o composto alvo de uma amostra líquida. Comparada com extrações sólido-líquido, a extração em fase sólida possui certas vantagens, como alta taxa de recuperação, fracionamento de compostos, curto tempo de processamento e aplicações em vários tipos de amostras. No entanto, seu alto custo impede as aplicações em larga escala. (Cai et al., 2021).

Na maçã e seus produtos a extração em fase sólida ainda carece de estudos para recuperação de compostos bioativos, especialmente polifenóis. Lončarić et. al (2020) usaram microextração em fase sólida para extrair polifenóis da casca de maçã de 20 variedades da fruta e os resultados mostraram duas principais classes de compostos fenólicos encontrados em diferentes concentrações, sendo não flavonóides (28,6%) e flavonóides (46,2%). Da Silva et al. (2020) propôs uma técnica de extração/fracionamento *inline* empregando PLE acoplado a SPE para aumentar a purificação de compostos fenólicos do bagaço de maçã. O método PLE-SPE foi usado em diferentes temperaturas (60-80 °C), concentrações de solvente (água pura, metanol (0-100%, v / v) e etanol (0-100%, v / v) a 10 MPa durante 70 min, e o método foi comparado ao PLE e outras técnicas convencionais, como agitador magnético, homogeneizador e UAE. Os autores obtiveram duas frações diferentes de compostos, uma dos ácidos fenólicos (rendimento: $2,85 \pm 0,19$ mg / g) e outra dos flavonoides (rendimento: $0,97 \pm 0,11$ mg / g); portanto, o PLE-SPE apresentou rendimentos de extração maiores do que as outras técnicas (3,69 a 1,45 vezes maior do que o produzido por PLE, UAE, agitador e agitação magnética).

Além disso, algumas técnicas têm sido utilizadas para pré-tratamento de maçãs para extrair os compostos bioativos alvo, como Extração Assistida por Enzima (EAE) e Extração por Campo Elétrico por Pulso (PEF). A EAE pode aumentar a transferência de massa em processos de extração, quebrando as paredes celulares das matrizes vegetais (Krakowska et al., 2018). O PEF consiste em uma técnica em que amostras são inseridas entre dois eletrodos criando pulsos que elevam a extração dos componentes desejados. O PEF também foi empregado como um pré-tratamento para extrair carotenóides e fenólicos de matrizes vegetais (Bot et al., 2018). Lohani & Muthukumarappan (2016) observaram que o PEF como pré-tratamento no bagaço de maçã aumentou a liberação de fenólicos em até 37,4% em relação ao controle. A EAE pode ser usada para remover compostos não fenólicos (por exemplo, pectina) de maçãs ou auxiliar na eluição dos compostos fenólicos (Wikiera et al., 2015), o que poderia ser um pré-tratamento de biomassa adequado para melhorar a seletividade de extração dos fenólicos.

Em suma, os processos sequenciais de extração para integrar técnicas e intensificar a recuperação de compostos alvo ou aumentar sua concentração no extrato ainda são incipientes na literatura. Espera-se que sejam dignos de investigação devido às abordagens em biorrefinaria. Devido às preocupações em mudar as economias lineares para circulares, espera-se que a integração de processos possa ser mais explorada em

breve, incluindo aspectos técnicos, econômicos, sociais e ambientais, resultando em plataformas factuais mais verdes para o uso pleno dos subprodutos alimentares, incluindo o bagaço de maçã.

6. Sustentabilidade e o uso de solventes alternativos não voláteis

O desenvolvimento de novos processos sustentáveis para recuperação de extratos bioativos é uma tendência clara na comunidade científica. No entanto, para criar um processo verde, mais do que reduzir o tempo e o custo de processamento, é necessário garantir rendimentos de extratos superiores aos obtidos convencionalmente, melhor pureza e qualidade do extrato (Chemat et al., 2019). Além disso, é desejável que o processo recém-desenvolvido promova baixo consumo de energia, custos econômicos e impactos ambientais.

Desde a antiguidade, muitas plataformas de extração são mediadas por solventes orgânicos à base de petróleo para recuperação de compostos a serem aplicados em diversos setores industriais, o que não é desejado considerando seu real potencial de toxicidade e graves implicações no meio ambiente (Chemat et al., 2019). Assim, uma estratégia desenvolvida é usar água como solvente de extração, que parece ser a melhor (e mais segura) alternativa para recuperar compostos bioativos da biomassa. No entanto, devido à sua alta polaridade, a água não é adequada para solubilizar compostos de outras polaridades como os polifenóis. Diante disso, alguns compostos adicionados em água podem modular a solubilidade de solutos, como ILs e solventes eutéticos, potencializando a extração de certos compostos que normalmente não são bem recuperados com este solvente.

Os ILs são sais com baixo ponto de fusão que podem ser usados como solventes para extração seletiva de uma grande pleora de biomoléculas, de hidrofílicos (compostos fenólicos) (Silva et al., 2017; Lima et al., 2017) a hidrofóbicos (carotenóides, clorofilas, curcuminóides, óleos essenciais) (Mesquita et al., 2020; Mesquita et al., 2019). Além disso, os ILs têm sido considerados solventes de *design* devido às suas propriedades ajustáveis exclusivas e solventes eutéticos.

No entanto, os solventes eutéticos são misturas de baixa temperatura de transição (de dois ou mais compostos), que cobrem uma grande variedade de moléculas aniônicas e ou catiônicas, para as quais a temperatura eutética está abaixo daquela de uma mistura líquida ideal e são usados para um miríade de aplicações (Hansen et al., 2020). Além

disso, tanto ILs quanto misturas eutéticas apresentam baixa volatilidade em condições atmosféricas, além de serem consideradas alternativas para substituição de solventes orgânicos em plataformas de extração, que geralmente são rotuladas como perigosas e inflamáveis (Ventura et al., 2017).

Portanto, alguns autores classificam esses solventes como uma alternativa ambientalmente compatível (ou verde). Alguns relatórios já comprovaram a possibilidade de reciclá-los sem perda de eficiência, além de sua baixa toxicidade em relação aos solventes orgânicos usados no mesmo processo de extração. Outra alternativa é utilizar uma solução aquosa de surfactantes (não iônicos ou iônicos), que também são considerados alternativas para substituição de solventes orgânicos voláteis em processos de extração, uma vez que sua estrutura anfifílica pode extrair compostos hidrofílicos e hidrofóbicos.

Os ILs e solventes eutéticos foram pouco explorados em estudos utilizando subprodutos da maçã como fonte de compostos bioativos (Tabela 5). Além disso, três estudos destacaram o uso de soluções aquosas de surfactantes não iônicos. Uma abordagem convencional por rotação de agitação foi recentemente otimizada por Skrypnik & Novikova (2020) para a obtenção de compostos fenólicos de bagaço de maçã. Uma solução aquosa de polissorbato 80 (1,14%) à temperatura ambiente, RSL 0,009 por 64,6 min extraiu 7,75 mg/g de compostos fenólicos, representando duas vezes o rendimento de extração obtido por água pura e etanol (70%, v / v). Além disso, os autores notaram que a atividade antioxidante do extrato surfactante era maior do que a extraída com etanol.

Tabela 5. Resumo dos estudos que aplicaram IL e solventes eutéticos para obter compostos fenólicos da maçã, incluindo os parâmetros operacionais e compostos alvo.

Amostra	Condições operacionais ótimas							Compostos Extraídos	Recuperação	Referências
	Solvente	Co-solvente	Concentração	Técnica	Temperatura (°C)	Tempo (min)	RSL (g/mL)			
Casca de maçã	1-tetradecil-3-methylimidazolium chloride - [C ₁₄ mim]Cl	Água	500 mM	Agitação elíptica rotatória	80	60	0,1	Ácidos ursólico, oleanólico, e betulínico	2,6%	Faria et al. (2017)
Bagaço de maçã	1-Butil-3-metilimidazolium bromide - [C ₄ mim]Br	Água	600 mM	MAE	73	15	0,03	TPC	0,3%	Du et al. (2013)
Flores de maçã	1-Butil-3-metilimidazolium bromide - [C ₄ mim]Br	MEOH	520 mM	UAE	n.d.	60	0,01	Floridzina, Astragalina, e Afzelina	181,03 mg/g	Li et al. (2018)
Maçã inteira	Cloreto de Colina /glucose-ethyl acetato - ChCl/Glu-EAC- molar razão: 1:1:2	Água	75 %	Cromatografia em contracorrente de alta velocidade baseada em solvente eutético	77,5	30-90	0,04	6''-O-coumaroil-2'-O-glucopiranosilflor etina, 3'''-metoxi-6''-O-feruloi-2'-O-glucopiranosilflor etina, vicularina, floridzina, e sieboldina	15%	Cai et al. (2021)
Bagaço de maçã	Polisorbato 80 - Tween 80® – Surfactante)	Água	1,14 %	Agitação rotatória	RT	64.6	0,009	TPC	7,75 mg/g	Skrypnik & Novikova (2020)
Suco de Maçã	Brij-58® - surfactante	Água	7 mM	UAE (banho)	RT	10	n.r.	TPC	35,4 mg/g	Sharma et al. (2015)

Maçã inteira	Brij-58®-surfactante + 2% cloreto de potássio (W/V), pH = 3.7	Água	7 mM	UAE (banho)	25	n.i.	n.d.	Ácido Gálico, Catequina, Epicatequina, Ácido Clorogênico, Ácido Cumárico, Floridizina, e Quercetina	180 mg/g	Hosseinzadeh et al. (2013)
--------------	---	------	------	-------------	----	------	------	---	----------	----------------------------

MEOH: metanol n.d.: não descrito; n.r.: etapa não necessária; TPC: calculado em termos de fenólicos totais a depender do estudo citado; RSL: razão sólido-líquido; RT: temperatura ambiente.

Hosseinzadeh et al. (2013) destacaram que a solução surfactante-água foi selecionada como o melhor solvente para recuperar compostos fenólicos de amostras de maçã inteiras, mesmo em comparação àquelas onde o surfactante foi dissolvido em etanol ou metanol. O UAE (banho) foi otimizado usando Brij-58 (7 mM) a 25 ° C, recuperando entre 97 e 104% dos principais compostos alvo da maçã. Além disso, usando solução Brij-58 a 7 mM, Sharma et al. (2015) melhorou o desempenho de extração de fenólicos totais do suco de maçã, aplicando solução surfactante em vez de acetona, metanol e etanol. Utilizando UAE (banho) em temperatura ambiente por 10 min, os autores recuperaram 180 mg/g de compostos fenólicos totais, além de 90,4% da atividade antioxidante.

ILs à base de imidazólio foram os mais bem investigados para a extração de compostos naturais de diferentes biomassas, incluindo biomassa de maçã (Tabela 5). No entanto, dadas as possibilidades significativas de novos ILs, como os feitos com íons derivados naturalmente (mais benignos, não tóxicos e de baixo custo), estudos adicionais são necessários para melhorar a segurança dos extratos obtidos, uma vez que os ILs baseados em imidazólio não foram considerados a melhor escolha, principalmente no setor de alimentos devido à sua alta toxicidade (Flieger & Flieger, 2020).

Por uma técnica de abordagem convencional (agitação elíptica rotatória), de Faria et al. (2017) recuperaram ácidos triterpênicos da casca de maçã usando uma solução aquosa do tensioativo IL 1-tetradecil-3-metilimidazólio ([C14mim] Cl) a 500 mM, 80 °C, RSL 0,1 por 60 min, representando uma alternativa promissora ao longo da substituição da acetona e do clorofórmio, os solventes mais orgânicos utilizados para esse fim.

Uma extração assistida por micro-ondas utilizando brometo de 1-butil-3-metilimidazólio ([C4min] Br) a 600 mM, 73 ° C, SLR 0,03 por 15 min foi aplicada por DU et al. (2013). Os autores recuperaram apenas 0,3% do conteúdo fenólico total do bagaço de maçã, o que de fato não representa um método de extração bem-sucedido. No entanto, 181 mg/g de compostos fenólicos foram extraídos de flores de macieira usando uma solução metanólica de [C4min] Br (condições operacionais: 520 mM, RSL 0,01, 60 min), o que promoveu um aumento de 25,4% no rendimento de extração em comparação ao mesmo processo usando solventes orgânicos (Li et al., 2012).

Os compostos fenólicos, como os presentes no subproduto industrial da maçã, foram amplamente extraídos por misturas eutéticas de diferentes matrizes, como uvas (Jeong et al., 2015), bagaço de azeitona (Chanioti & Tzia, 2018) e madeira (Alvarez-Vasco et al., 2016). Uma abordagem de cromatografia em contracorrente de alta

velocidade foi realizada usando solvente eutético cloreto de colina/glicose-acetato de etila (75%, razão molar: 1: 1: 2) para extração de compostos fenólicos de *Malus hupehensis*. A água foi utilizada como um co-solvente nas condições operacionais otimizadas a 77,5° C, RSL 0,04 por 30–90 min. A metodologia recuperou 15,3% dos compostos alvo, superior ao obtido por extração mediada por metanol (Cai et al., 2021).

Os solventes não voláteis permitem novas combinações em diferentes técnicas de extração para investigar o melhor cenário de cada caso. Assim, considerando as inúmeras possibilidades de solventes alternativos que podem ser formados (~108 ILs ternários e 106 ILs binários são potencialmente formados), em comparação com 600 solventes orgânicos diferentes comumente usados no campo industrial, os solventes de *design* são o futuro (e o presente), uma vez que é possível modular um solvente particular para um propósito específico. Porém, até o momento, nenhum processo de extração sustentável foi desenvolvido utilizando a maçã como fonte de compostos bioativos, o que é preocupante, considerando o grande número de toneladas descartadas anualmente dessa matéria-prima. Portanto, mais estudos são necessários a fim de otimizar não só o desempenho de extração (rendimento de extração), mas também a sustentabilidade do processo desenvolvido (principalmente a reciclabilidade dos solventes) (Souza Mesquita et al., 2021) colocando em prática a conceito de economia circular.

Além disso, vale ressaltar que os solventes alternativos são uma ferramenta a ser utilizada em um método de extração e, nesse sentido, a aplicação do novo solvente e os parâmetros de processo do método devem ser otimizados e estudados do laboratório para grande escala. Além disso, novos solventes geralmente são caros, o que leva a duas opções. Em primeiro lugar, o novo solvente poderia atribuir funções técnicas ou biológicas ao extrato que justificassem a presença do solvente no produto. Em segundo lugar e ao contrário, o solvente deve ser separado e reciclado.

7. Considerações finais e perspectivas futuras

As informações disponíveis indicam que muitas estratégias foram exploradas para superar os desafios de recuperação de compostos fenólicos de maçãs e subprodutos. A Figura 2 resume os dados levantados por este trabalho, os quais foram detalhados e apresentados na Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, e permite uma visão geral dos métodos de extração e suas variáveis de extração que foram utilizados. De acordo com a Figura 2, a agitação magnética e a homogeneização com agitador foram as técnicas

convencionais preferidas empregadas nas últimas duas décadas. Vale ressaltar que este trabalho identificou métodos de extração em escala de laboratório; portanto, embora esses métodos não sejam considerados os mais eficientes em termos de rendimento e seletividade, eles estão muito disponíveis em escala de laboratório, tornando-os os mais aplicados. Além dos métodos convencionais, a UAE está ganhando destaque e é a técnica emergente líder, possivelmente devido às suas vantagens como tempos de extração curtos com rendimento comparável ou superior à outras técnicas. Além disso, técnicas acopladas, como PLE-SPE, ainda são pouco exploradas para extrair/separar compostos bioativos da matéria-prima da maçã, havendo apenas um trabalho publicado até o momento (Da Silva et al., 2020).

Ainda é possível notar na Figura 2 que o RSL utilizada mais vezes pelos autores variou entre 0,04 e 0,05 g/mL, o que pode ser considerado uma boa escolha para acompanhar trabalhos que visam desenvolver novas plataformas de extração. As temperaturas amenas (20–30 ° C) foram as mais utilizadas, principalmente nos métodos convencionais. Porém, temperaturas entre 51 e 60 °C, e superiores a 100 °C, já foram estudadas com resultados satisfatórios, principalmente em sistemas pressurizados como o PLE (realizados principalmente em pressões que variam de 1 a 10 MPa).

O tempo de extração foi a condição operacional com mais faixas diferentes, possivelmente por sua dependência de outras variáveis de extração. Independentemente da técnica utilizada, a maioria das extrações é realizada em tempos entre 10 e 30 min. Aqui coloca-se um comentário importante: o comportamento de uma extração mostra uma evolução típica no decorrer do tempo, em que o rendimento aumenta linearmente, até que se esgote a matéria-prima. O momento ideal para interromper a execução varia de acordo com a finalidade do processo. Por exemplo, em uma aplicação analítica, um tempo de extração é esperado para permitir o esgotamento da amostra e atingir a extração quantitativa. Por outro lado, para fins industriais, está bem documentado que não é conveniente extrair até o esgotamento da matéria-prima. O tempo de extração impacta o número de lotes produzidos anualmente e, conseqüentemente, impacta o custo de fabricação. Portanto, para aplicações industriais, também é aconselhável verificar o impacto do tempo de extração no custo de fabricação.

A Figura 2 permite concluir que os solventes orgânicos ainda são os mais usados para extrair compostos fenólicos de matérias-primas à base de maçã. Porém, apesar do grande número de trabalhos desenvolvidos com metanol, acetonitrila e acetona, as soluções etanólicas com diferentes concentrações (20-99% v / v) foram as mais

empregadas até o momento, o que é um ponto positivo considerando que o etanol possui uma baixo potencial de toxicidade em comparação com outros solventes orgânicos e não é um derivado de petróleo. CO₂ supercrítico, ILs, solventes eutéticos e soluções aquosas de surfactantes já foram usados, mas em poucos casos e em escala de laboratório, e mais pesquisas são necessárias para descobrir novas possibilidades para a sustentabilidade de novos solventes. Considerando que as principais tendências do setor industrial estão caminhando para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis de extração de moléculas de base biológica de resíduos, subprodutos e bagaços, em breve esperamos ver a comunidade científica mudando o paradigma do convencional para o moderno, com mais estudos com foco no desenvolvimento de processos integrados com reciclagem da matéria-prima e utilização de técnicas de extração que atendam aos princípios da química “verde”.

Devido à grande quantidade de resíduos produzidos anualmente nas indústrias de maçã, o manuseio e destinação adequados dos resíduos são necessários para reduzir os impactos ambientais. Além das questões ambientais, existem os aspectos econômicos, onde o reaproveitamento de resíduos (e subprodutos) permite reduzir o custo do tratamento dos mesmos. Assim, os processos de extração com matéria-prima à base de maçã são uma alternativa viável para a criação de novos produtos de alto valor agregado, criando novas oportunidades de mercado em diversos ramos industriais. Nesse sentido, o conceito de transição de sistemas de produção linear para circular pode ser aplicado à cadeia de produtos da maçã. Os processos de extração que abordamos neste trabalho consistem em apenas uma etapa desta cadeia e podem ser integrados com outros processos dando origem a uma biorrefinaria. Especificamente, a composição química do bagaço de maçã permite que seja utilizado em processos de extração para obtenção de compostos fenólicos, cujos subprodutos ainda podem seguir na cadeia de transformação por possuírem pectina e compostos lignocelulósicos interessantes para a produção de novos materiais e energia. De fato, os subprodutos da maçã como bagaço já foram industrialmente usados para produzir pectina, etanol, ácido cítrico, ácido lático e enzimas. Até onde sabemos, esses e outros processos podem ser integrados em um conceito de biorrefinaria.

Mais restrito aos processos de extração, conforme apresentado e discutido nas seções anteriores, o bagaço de maçã tem sido amplamente utilizado em escala laboratorial para a obtenção de compostos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos e flavonoides. No entanto, faltam relatórios sobre técnicas de extração acoplada. Muitos trabalhos

publicados abordam o uso de SFE-UAE para recuperar compostos bioativos de subprodutos de indústrias alimentícias (Dias et al., 2016; P. Santos et al., 2015). Alguns outros estudos utilizaram o PLE-UAE para obter bioativos de resíduos alimentares, como cascas de romã (Santos et al., 2019; Sumere et al., 2018), bagaço de maracujá (Viganó et al., 2020).

Além disso, Santos et al. (2019) usou o N₂ expandido acoplado associado ao UAE para melhorar a recuperação de fenólicos de cascas de romã. A combinação dessas técnicas, seja no pré-tratamento da matéria-prima ou auxiliando todo o processo de extração, ou em pulsos, visa potencializar o processo de extração, ou seja, aumentar o rendimento e a concentração do extrato, fornecer menos calor ao sistema, e diminuir o consumo de solvente e o tempo de extração sempre com o mínimo impacto ambiental em mente. Portanto, essas técnicas de extração acoplada mencionadas surgem como possibilidades promissoras para potencializar o processamento de subprodutos da maçã.

Além da técnica de extração, a escolha do solvente é uma etapa crítica no projeto do processo. Etanol, água e suas misturas têm sido amplamente empregados para obter compostos fenólicos. A água é compatível com a maioria das aplicações de extrato fenólico; portanto, nem sempre precisa ser evaporado, ao contrário do etanol. Conseqüentemente, a opção por um solvente que seja eficiente na extração e possa ter funcionalidades no produto em que o extrato será aplicado é muito bem-vinda. Por exemplo, Strieder et al. (2020) utilizaram o leite como solvente para a obtenção de um corante azul do jenipapo, considerando a aplicação em alimentos.

A escolha do solvente pode ir além de simplesmente dissolver e solubilizar o extrato; o solvente pode, por exemplo, atuar como um emulsificante e estabilizador em alimentos ou como um emoliente em medicamentos e cosméticos. Nesse contexto, ILs e solventes eutéticos são bons candidatos, uma vez que apresentam propriedades físico-químicas favoráveis. Líquidos iônicos e solventes eutéticos de profundidade natural têm sido relatados como solventes para técnicas de extração emergentes como UAE e MAE. Assim, são tratados como uma perspectiva a ser empregada como solventes em técnicas de extração emergentes e modernas e acopladas, como aquelas em que a extração coincide com a análise.

Independentemente da técnica de extração, para entender melhor o comportamento de transferência de massa dos compostos bioativos, a modelagem matemática é recomendada na qual o comportamento dos solutos em meios sub e supercríticos durante os procedimentos de extração pode ser previsto. Além disso, a

análise econômica e a avaliação do ciclo de vida dos novos processos são úteis e muito bem-vindas, especialmente se o objetivo for a ampliação dos métodos. Da mesma forma, com a transposição entre as escalas laboratoriais e industriais em mente, desenvolver métodos para concentrar o extrato nos compostos-alvo também é um campo fértil para a pesquisa. Por fim, diante do que foi apresentado nesta revisão, reafirma-se o potencial das matérias-primas à base de maçã para a obtenção de compostos bioativos. Além das tendências e necessidades do mercado, a maçã é cultivada em todos os continentes, o que proporciona uma boa cadeia de abastecimento em todo o mundo e garante a promissora aplicação industrial para a produção de compostos fenólicos em um conceito de biorrefinaria.

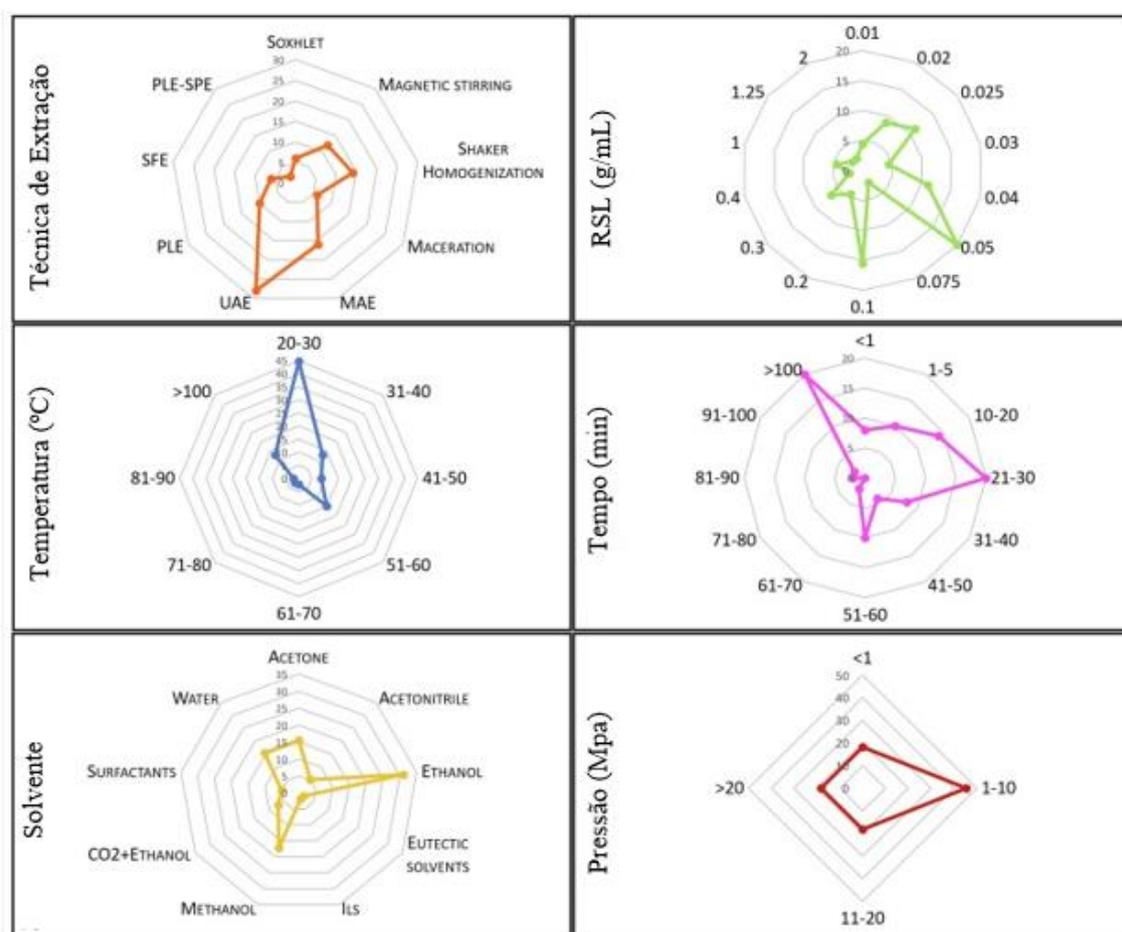


Figura 2. Distribuição dos trabalhos que tratam das diferentes técnicas de extração e suas respectivas condições (relação sólido-líquido (RSL), temperatura, tempo, solvente e pressão).

Referências Bibliográficas

- Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R. (2011). Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium* - Liberation and extraction of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.129>
- Alberti, A., Zielinski, A. A. F., Zardo, D. M., Demiate, I. M., Nogueira, A., & Mafra, L. I. (2014). Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.086>
- Alonso-Salces, R. M., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (2001a). Determination of polyphenolic profiles of Basque cider apple varieties using accelerated solvent extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf010021s>
- Alonso-Salces, R. M., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (2001b). Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. *Journal of Chromatography A*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01212-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01212-2)
- Alvarez-Vasco, C., Ma, R., Quintero, M., Guo, M., Geleynse, S., Ramasamy, K. K., Wolcott, M., & Zhang, X. (2016). Unique low-molecular-weight lignin with high purity extracted from wood by deep eutectic solvents (DES): a source of lignin for valorization. *Green Chemistry*, *18*(19), 5133–5141.
- Armenta, S., Garrigues, S., Esteve-Turrillas, F. A., & de la Guardia, M. (2019). Green extraction techniques in green analytical chemistry. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.016>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013a). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013b). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, *117*(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Barreca, D., Bellocco, E., Laganà, G., Ginestra, G., & Bisignano, C. (2014). Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives present in apple and kumquat. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.118>
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., & Santos-Buelga, C. (2009). Phenolic acids determination by HPLC–DAD–ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(6), 1076–1079. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.039>
- Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., Devkota, H. P., Orhan, I. E., Patra, J. K., Das, G., Anandharamakrishnan, C., Gomez-Gomez, L., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., & Atanasov, A. G. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.018>
- Bolarinwa, I. F., Orfila, C., & Morgan, M. R. A. (2015). Determination of amygdalin in apple seeds, fresh apples and processed apple juices. *Food Chemistry*, *170*, 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.083>
- Bondonno, N. P., Bondonno, C. P., Ward, N. C., Hodgson, J. M., & Croft, K. D. (2017). The

- cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. *Trends in Food Science & Technology*, *69*, 243–256. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.012>
- Bot, F., Verkerk, R., Mastwijk, H., Anese, M., Fogliano, V., & Capuano, E. (2018). The effect of pulsed electric fields on carotenoids bioaccessibility: The role of tomato matrix. *Food Chemistry*, *240*, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.102>
- Bouras, M., Chadni, M., Barba, F. J., Grimi, N., Bals, O., & Vorobiev, E. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from Quercus bark. *Industrial Crops and Products*, *77*, 590–601. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.018>
- Budzynska, B., Faggio, C., Kruk-Slomka, M., Samec, D., Nabavi, S. F., Sureda, A., Devi, K. P., & Nabavi, S. M. (2017). Rutin as Neuroprotective Agent: From Bench to Bedside. *Current Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.2174/0929867324666171003114154>
- Cai, X., Xiao, M., Zou, X., Tang, J., Huang, B., & Xue, H. (2021). Extraction and separation of flavonoids from Malus hupehensis using high-speed countercurrent chromatography based on deep eutectic solvent. *Journal of Chromatography A*, *1641*, 461998.
- Cai, H., You, S., Xu, Z. *et al.* Novel extraction methods and potential applications of polyphenols in fruit waste: a review. *Food Measure* **15**, 3250–3261 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00901-1>
- Casazza, A. A., Pettinato, M., & Perego, P. (2020). Polyphenols from apple skins: A study on microwave-assisted extraction optimization and exhausted solid characterization. *Separation and Purification Technology*, *240*, 116640. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116640>
- Chandrasekar, V., Martín-González, M. F. S., Hirst, P., & Ballard, T. S. (2015). Optimizing Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Antioxidants from Red Delicious and Jonathan Apple Pomace. *Journal of Food Process Engineering*. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12187>
- Chanioti, S., & Tzia, C. (2018). Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *48*, 228–239.
- Chemat, Abert Vian, Ravi, Khadhraoui, Hilali, Perino, & Tixier. (2019). Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects. *Molecules*, *24*(16), 3007. <https://doi.org/10.3390/molecules24163007>
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., & Cravotto, G. (2019). Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.037>
- Chemat, F., Abert Vian, M., Ravi, H. K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S., & Fabiano Tixier, A.-S. (2019). Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects. *Molecules*, *24*(16), 3007.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. In *Ultrasonics Sonochemistry* (Vol. 34, pp. 540–560). <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Chen, C. (2016). Sinapic acid and its derivatives as medicine in oxidative stress-induced diseases

- and aging. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
<https://doi.org/10.1155/2016/3571614>
- Connor, C. A., Adriaens, M., Pierini, R., Johnson, I. T., & Belshaw, N. J. (2014). Procyanidin induces apoptosis of esophageal adenocarcinoma cells via JNK activation of c-Jun. *Nutrition and Cancer*. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.868914>
- D'Archivio, M., Scazzocchio, B., Giovannini, C., & Masella, R. (2013). Role of Protocatechuic Acid in Obesity-Related Pathologies. In *Polyphenols in Human Health and Disease*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00015-3>
- Da Silva, L. C., Souza, M. C., Sumere, B. R., Silva, L. G. S., da Cunha, D. T., Barbero, G. F., Bezerra, R. M. N., & Rostagno, M. A. (2020a). Simultaneous extraction and separation of bioactive compounds from apple pomace using pressurized liquids coupled on-line with solid-phase extraction. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126450>
- Dachineni, R., Ai, G., Kumar, D. R., Sadhu, S. S., Tummala, H., & Bhat, G. J. (2016). Cyclin A2 and CDK2 as novel targets of aspirin and salicylic acid: A potential role in cancer prevention. *Molecular Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0360>
- Faria, E. L. P., Shabudin, S. V., Cláudio, A. F. M., Válega, M., Domingues, F. M. J., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., & Freire, M. G. (2017). Aqueous solutions of surface-active ionic liquids: remarkable alternative solvents to improve the solubility of triterpenic acids and their extraction from biomass. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(8), 7344–7351.
- De Souza Mesquita, Leonardo M, Martins, M., Maricato, É., Nunes, C., Quinteiro, P. S. G. N., Dias, A. C. R. V, Coutinho, J. A. P., Pisani, L. P., de Rosso, V. V, & Ventura, S. P. M. (2020). Ionic liquid-mediated recovery of carotenoids from the *Bactris gasipaes* fruit waste and their application in food-packaging chitosan films. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(10), 4085–4095.
- De Souza Mesquita, Leonardo Mendes, Ventura, S. P. M., Braga, A. R. C., Pisani, L. P., Dias, A., & de Rosso, V. V. (2019). Ionic liquid-high performance extractive approach to recover carotenoids from *Bactris gasipaes* fruits. *Green Chemistry*.
- Dias, A. L. B., Arroio Sergio, C. S., Santos, P., Barbero, G. F., Rezende, C. A., & Martínez, J. (2016). Effect of ultrasound on the supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L. var. pendulum). *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 284–294. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.01.013>
- Dias, A. L. B., Arroio Sergio, C. S., Santos, P., Barbero, G. F., Rezende, C. A., & Martínez, J. (2017). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L.): Effects on the vegetable matrix and mathematical modeling. *Journal of Food Engineering*, 198, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.11.020>
- Dias, A. L. B., de Aguiar, A. C., & Rostagno, M. A. (2021). Extraction of natural products using supercritical fluids and pressurized liquids assisted by ultrasound: Current status and trends. *Ultrasonics Sonochemistry*, 74, 105584. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105584>
- Ding, M., Feng, R., Wang, S. Y., Bowman, L., Lu, Y., Qian, Y., Castranova, V., Jiang, B. H., & Shi, X. (2006). Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600861200>
- DU, F., DENG, B., GAO, L., XIANG, Y., & ZHANG, J. (2013). Optimization of microwave-assisted extraction technology of total flavonoids from *Malus micromalus* Makino using Ionic liquids and response surface methodology. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 17.
- Silva, F. A., Carmo, R. M. C., Fernandes, A. P. M., Kholany, M., Coutinho, J. A. P., & Ventura,

- S. P. M. (2017). Using Ionic Liquids To Tune the Performance of Aqueous Biphasic Systems Based on Pluronic L-35 for the Purification of Naringin and Rutin. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(8), 6409–6419. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00178>
- Eisvand, F., Razavi, B. M., & Hosseinzadeh, H. (2020). The effects of Ginkgo biloba on metabolic syndrome: A review. *Phytotherapy Research*. <https://doi.org/10.1002/ptr.6646>
- Ferenczyova, K., Kalocayova, B., & Bartekova, M. (2020). Potential implications of quercetin and its derivatives in cardioprotection. In *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms21051585>
- Ferrentino, G., Morozova, K., Mosibo, O. K., Ramezani, M., & Scampicchio, M. (2018a). Biorecovery of antioxidants from apple pomace by supercritical fluid extraction. *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.03.165>
- Ferrentino, G., Morozova, K., Mosibo, O. K., Ramezani, M., & Scampicchio, M. (2018b). Biorecovery of antioxidants from apple pomace by supercritical fluid extraction. *Journal of Cleaner Production*, 186, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.03.165>
- Flieger, J., & Flieger, M. (2020). Ionic Liquids Toxicity—Benefits and Threats. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6267.
- Franquin-Trinquier, S., Maury, C., Baron, A., Le Meurlay, D., & Mehinagic, E. (2014). Optimization of the extraction of apple monomeric phenolics based on response surface methodology: Comparison of pressurized liquid-solid extraction and manual-liquid extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.01.005>
- Fromm, M., Loos, H. M., Bayha, S., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2013). Recovery and characterisation of coloured phenolic preparations from apple seeds. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.042>
- Fu, L., Xu, B.-T., Xu, X.-R., Gan, R.-Y., Zhang, Y., Xia, E.-Q., & Li, H.-B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129(2), 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.079>
- Grigoras, C. G., Destandau, E., Fougère, L., & Elfakir, C. (2013). Evaluation of apple pomace extracts as a source of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.026>
- Guo, X. F., Liu, J. P., Ma, S. Q., Zhang, P., & Sun, W. De. (2018). Avicularin reversed multidrug-resistance in human gastric cancer through enhancing Bax and BOK expressions. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.110>
- Hajjalyani, M., Farzaei, M. H., Echeverría, J., Nabavi, S. M., Uriarte, E., & Eduardo, S. S. (2019). Hesperidin as a neuroprotective agent: A review of animal and clinical evidence. In *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules24030648>
- Hameed, A., Hafizur, R. M., Hussain, N., Raza, S. A., Rehman, M., Ashraf, S., Ul-Haq, Z., Khan, F., Abbas, G., & Choudhary, M. I. (2018). Eriodictyol stimulates insulin secretion through cAMP/PKA signaling pathway in mice islets. *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.12.015>
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2023–2044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x>
- Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M., Horton, A., Adhikari, L.,

- Zelovich, T., & Doherty, B. W. (2020). Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chemical Reviews*.
- Hartogh, D. J. D., & Tsiani, E. (2019). Antidiabetic properties of naringenin: A citrus fruit Polyphenol. *Biomolecules*. <https://doi.org/10.3390/biom9030099>
- He, B., Zhang, L. L., Yue, X. Y., Liang, J., Jiang, J., Gao, X. L., & Yue, P. X. (2016). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.094>
- Hernández-Carranza, P., Ávila-Sosa, R., Guerrero-Beltrán, J. A., Navarro-Cruz, A. R., Corona-Jiménez, E., & Ochoa-Velasco, C. E. (2016). Optimization of Antioxidant Compounds Extraction from Fruit By-Products: Apple Pomace, Orange and Banana Peel. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(1), 103–115. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12588>
- Hosseinzadeh, R., Khorsandi, K., & Hemmaty, S. (2013). Study of the effect of surfactants on extraction and determination of polyphenolic compounds and antioxidant capacity of fruits extracts. *PLoS One*, 8(3), e57353.
- Hyson, D. A. (2011). A Comprehensive Review of Apples and Apple Components and Their Relationship to Human Health. *Advances in Nutrition*, 2(5), 408–420. <https://doi.org/10.3945/an.111.000513>
- Illera, A. E., Chaple, S., Sanz, M. T., Ng, S., Lu, P., Jones, J., Carey, E., & Bourke, P. (2019). Effect of cold plasma on polyphenol oxidase inactivation in cloudy apple juice and on the quality parameters of the juice during storage. *Food Chemistry: X*, 3, 100049. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100049>
- Imran, M., Rauf, A., Abu-Izneid, T., Nadeem, M., Shariati, M. A., Khan, I. A., Imran, A., Orhan, I. E., Rizwan, M., Atif, M., Gondal, T. A., & Mubarak, M. S. (2019). Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. In *Biomedicine and Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108612>
- Jakobek, L., & Barron, A. R. (2016). Ancient apple varieties from Croatia as a source of bioactive polyphenolic compounds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 45, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.09.007>
- Jakobek, L., Boc, M., & Barron, A. R. (2015). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Apples. *Food Analytical Methods*. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0161-3>
- Jeong, K. M., Zhao, J., Jin, Y., Heo, S. R., Han, S. Y., Yoo, D. E., & Lee, J. (2015). Highly efficient extraction of anthocyanins from grape skin using deep eutectic solvents as green and tunable media. *Archives of Pharmacal Research*, 38(12), 2143–2152.
- Krakowska, A., Rafińska, K., Walczak, J., & Buszewski, B. (2018). Enzyme-assisted optimized supercritical fluid extraction to improve *Medicago sativa* polyphenolics isolation. *Industrial Crops and Products*, 124, 931–940. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.004>
- Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- Kumar, N., & Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. In *Biotechnology Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.09.002>
- Lesjak, M., Beara, I., Simin, N., Pintać, D., Majkić, T., Bekvalac, K., Orčić, D., & Mimica-Dukić, N. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *Journal of Functional Foods*. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.047>

- Li, H., Deng, Z., Wu, T., Liu, R., Loewen, S., & Tsao, R. (2012). Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.019>
- Li, W., Shi, M., Wang, P., Guo, X., Li, C., & Kang, W. (2018). Efficient determination of three flavonoids in *Malus pumila* flowers by ionic liquid-HPLC. *Journal of Molecular Liquids*, *263*, 139–146.
- Li, Z., Meng, F., Zhang, Y., Sun, L., Yu, L., Zhang, Z., Peng, S., & Guo, J. (2016). Simultaneous quantification of hyperin, reynoutrin and guaijaverin in mice plasma by LC-MS/MS: Application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*. <https://doi.org/10.1002/bmc.3660>
- Lima, Á. S., Soares, C. M. F., Paltram, R., Halbwirth, H., & Bica, K. (2017). Extraction and consecutive purification of anthocyanins from grape pomace using ionic liquid solutions. *Fluid Phase Equilibria*, *451*, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.08.006>
- Lončarić, A.; Matanović, K.; Ferrer, P.; Kovač, T.; Šarkanj, B.; Skendrović Babojelić, M.; Lores, M. Peel of Traditional Apple Varieties as a Great Source of Bioactive Compounds: Extraction by Micro-Matrix Solid-Phase Dispersion. *Foods* **2020**, *9*, 80. <https://doi.org/10.3390/foods9010080>
- Lohani, U. C., & Muthukumarappan, K. (2016). Application of the pulsed electric field to release bound phenolics in sorghum flour and apple pomace. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *35*, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.03.012>
- Lu, Y., & Yeap Foo, L. (1998). Constitution of some chemical components of apple seed. *Food Chemistry*, *61*(1–2), 29–33. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00123-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00123-4)
- Macan, A. M., Kraljević, T. G., & Raić-malić, S. (2019). Therapeutic perspective of vitamin C and its derivatives. In *Antioxidants*. <https://doi.org/10.3390/antiox8080247>
- Machado, A. P. D. F., Pasquel-Reátegui, J. L., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2015). Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. *Food Research International*, *77*, 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.042>
- Makarova, E., Górnas, P., Konrade, I., Tirzite, D., Cirule, H., Gulbe, A., Pugajeva, I., Seglina, D., & Dambrova, M. (2014). Acute anti-hyperglycaemic effects of an unripe apple preparation containing phlorizin in healthy volunteers: A preliminary study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6779>
- Malinowska, M., Śliwa, K., Sikora, E., Ogonowski, J., Oszmiański, J., & Kolniak-Ostek, J. (2018). Ultrasound-assisted and micelle-mediated extraction as a method to isolate valuable active compounds from apple pomace. *Journal of Food Processing and Preservation*, *42*(10), e13720. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13720>
- Martins Strieder, M., Neves, M. I. L., Silva, E. K., & Meireles, M. A. A. (2020). Low-frequency and high-power ultrasound-assisted production of natural blue colorant from the milk and unripe *Genipa americana* L. *Ultrasonics Sonochemistry*, *66*, 105068. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105068>
- Massias, A., Boisard, S., Baccaunaud, M., Leal Calderon, F., & Subra-Paternault, P. (2015a). Recovery of phenolics from apple peels using CO₂ + ethanol extraction: Kinetics and antioxidant activity of extracts. *Journal of Supercritical Fluids*. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.12.007>
- Massias, A., Boisard, S., Baccaunaud, M., Leal Calderon, F., & Subra-Paternault, P. (2015b). Recovery of phenolics from apple peels using CO₂+ethanol extraction: Kinetics and antioxidant activity of extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*, *98*, 172–182.

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.12.007>

- Matsui, T. (2015). Condensed catechins and their potential health-benefits. In *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.09.017>
- Mihailović, N. R., Mihailović, V. B., Kreft, S., Ćirić, A. R., Joksović, L. G., & Đurđević, P. T. (2018). Analysis of phenolics in the peel and pulp of wild apples (*Malus sylvestris* (L.) Mill.). *Journal of Food Composition and Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.11.007>
- Moreira, M. M., Barroso, M. F., Boeykens, A., Withouck, H., Morais, S., & Delerue-Matos, C. (2017a). Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: Comparison between conventional and microwave-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.038>
- Moreira, M. M., Barroso, M. F., Boeykens, A., Withouck, H., Morais, S., & Delerue-Matos, C. (2017b). Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: Comparison between conventional and microwave-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*, 104, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.038>
- Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., Ahmad, F., Babazadeh, D., FangFang, X., Modarresi-Ghazani, F., WenHua, L., & XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 97(October 2017), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>
- Panadare, D., Dialani, G., & Rathod, V. (2021). Extraction of volatile and non-volatile components from custard apple seed powder using supercritical CO₂ extraction system and its inventory analysis. *Process Biochemistry*, 100, 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.030>
- Pavlić, B., Naffati, A., Hojan, T., Vladić, J., Zeković, Z., & Vidović, S. (2017). Microwave-assisted extraction of wild apple fruit dust-production of polyphenol-rich extracts from filter tea factory by-products. *Journal of Food Process Engineering*, 40(4), e12508. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12508>
- Pei, K., Ou, J., Huang, J., & Ou, S. (2016). p-Coumaric acid and its conjugates: Dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7578>
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., Bourvellec, C. Le, Renard, C. M. G. C., & Chemat, F. (2012). Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.026>
- Rahath Kubra, I., Kumar, D., & Jagan Mohan Rao, L. (2016). Emerging Trends in Microwave Processing of Spices and Herbs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.818933>
- Rajan, V. K., Shameera, S. A., Hasna, C. K., & Muraleedharan, K. (2018). A non toxic natural food colorant and antioxidant ‘Peonidin’ as a pH indicator: A TDDFT analysis. *Computational Biology and Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.07.015>
- Ramirez, G., Zamilpa, A., Zavala, M., Perez, J., Morales, D., & Tortoriello, J. (2016). Chrysoeriol and other polyphenols from *Tecoma stans* with lipase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.014>

- Rana, S., Gupta, S., Rana, A., & Bhushan, S. (2015). Functional properties, phenolic constituents and antioxidant potential of industrial apple pomace for utilization as active food ingredient. *Food Science and Human Wellness*. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.10.001>
- Reis, S. F., Rai, D. K., & Abu-Ghannam, N. (2012). Water at room temperature as a solvent for the extraction of apple pomace phenolic compounds. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.068>
- Rezaei, S., Rezaei, K., Haghghi, M., & Labbafi, M. (2013). Solvent and solvent to sample ratio as main parameters in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from apple pomace. *Food Science and Biotechnology*, 22(5), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0212-8>
- Rostagno M. A., Prado, J. M. (2013). *Natural Product Extraction: Principles and Applications*.
- Rostagno, M. A., D'Arrigo, M., Martínez, J. A., & Martínez, J. A. (2010). Combinatory and hyphenated sample preparation for the determination of bioactive compounds in foods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(6), 553–561. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.02.015>
- Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., Lucarini, M., Santini, A., Souto, E. B., Novellino, E., Antolak, H., Azzini, E., Setzer, W. N., & Martins, N. (2019). The therapeutic potential of Apigenin. In *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms20061305>
- Santos, M. P., Souza, M. C., Sumere, B. R., da Silva, L. C., Cunha, D. T., Bezerra, R. M. N., & Rostagno, M. A. (2019). Extraction of bioactive compounds from pomegranate peel (*Punica granatum L.*) with pressurized liquids assisted by ultrasound combined with an expansion gas. *Ultrasonics Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.02.021>
- Santos, P., Aguiar, A. C., Barbero, G. F., Rezende, C. A., & Martínez, J. (2015). Supercritical carbon dioxide extraction of capsaicinoids from malagueta pepper (*Capsicum frutescens L.*) assisted by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.001>
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., & Iseki, K. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.035>
- Sharma, S., Kori, S., & Parmar, A. (2015). Surfactant mediated extraction of total phenolic contents (TPC) and antioxidants from fruits juices. *Food Chemistry*, 185, 284–288.
- Shay, J., Elbaz, H. A., Lee, I., Zielske, S. P., Malek, M. H., & Hüttemann, M. (2015). Molecular mechanisms and therapeutic effects of (-)-epicatechin and other polyphenols in cancer, inflammation, diabetes, and neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/181260>
- Skrypnik, L., & Novikova, A. (2020). Response Surface Modeling and Optimization of Polyphenols Extraction from Apple Pomace Based on Nonionic Emulsifiers. *Agronomy*, 10(1), 92.
- Souza, M. C., Santos, M. P., Sumere, B. R., Silva, L. C., Cunha, D. T., Martínez, J., Barbero, G. F., & Rostagno, M. A. (2020). Isolation of gallic acid, caffeine and flavonols from black tea by on-line coupling of pressurized liquid extraction with an adsorbent for the production of functional bakery products. *LWT*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108661>
- Souza Mesquita, Leonardo M., Martins, M., Pisani, L. P., Ventura, S. P. M., & Rosso, V. V. (2021). Insights on the use of alternative solvents and technologies to recover bio-based food pigments. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 787–818. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12685>

- Srinivasulu, C., Ramgopal, M., Ramanjaneyulu, G., Anuradha, C. M., & Suresh Kumar, C. (2018). Syringic acid (SA) – A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological and Industrial Importance. In *Biomedicine and Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.069>
- Sumere, B. R., de Souza, M. C., dos Santos, M. P., Bezerra, R. M. N., da Cunha, D. T., Martinez, J., & Rostagno, M. A. (2018). Combining pressurized liquids with ultrasound to improve the extraction of phenolic compounds from pomegranate peel (*Punica granatum L.*). *Ultrasonics Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.05.028>
- Ullah, R., Ikram, M., Park, T. J., Ahmad, R., Saeed, K., Alam, S. I., Rehman, I. U., Khan, A., Khan, I., Jo, M. G., & Kim, M. O. (2020). Vanillic Acid, a Bioactive Phenolic Compound, Counteracts LPS-Induced Neurotoxicity by Regulating c-Jun N-Terminal Kinase in Mouse Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 361. <https://doi.org/10.3390/ijms22010361>
- Ventura, S. P. M., e Silva, F. A., Quental, M. V, Mondal, D., Freire, M. G., & Coutinho, J. A. P. (2017). Ionic-liquid-mediated extraction and separation processes for bioactive compounds: past, present, and future trends. *Chemical Reviews*, 117(10), 6984–7052.
- Viganó, J., Aguiar, A. C., Moraes, D. R., Jara, J. L. P., Eberlin, M. N., Cazarin, C. B. B., Maróstica, M. R., & Martínez, J. (2016). Sequential high pressure extractions applied to recover piceatannol and scirpusin B from passion fruit bagasse. *Food Research International*, 85, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.015>
- Viganó, J., Assis, B. F. de P., Náthia-Neves, G., dos Santos, P., Meireles, M. A. A., Veggi, P. C., & Martínez, J. (2020). Extraction of bioactive compounds from defatted passion fruit bagasse (*Passiflora edulis sp.*) applying pressurized liquids assisted by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64, 104999. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.104999>
- Viganó, J., Zabot, G. L., & Martínez, J. (2017). Supercritical fluid and pressurized liquid extractions of phytonutrients from passion fruit by-products: Economic evaluation of sequential multi-stage and single-stage processes. *The Journal of Supercritical Fluids*, 122, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.12.006>
- Wang, L., Boussetta, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2018). Selectivity of ultrasound-assisted aqueous extraction of valuable compounds from flesh and peel of apple tissues. *LWT*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.007>
- Wang, L., Boussetta, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2019). Ultrasound assisted purification of polyphenols of apple skins by adsorption/desorption procedure. *Ultrasonics Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.03.002>
- Wang, X., Yang, Y., An, Y., & Fang, G. (2019). The mechanism of anticancer action and potential clinical use of kaempferol in the treatment of breast cancer. In *Biomedicine and Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109086>
- Wijngaard, H., & Brunton, N. (2009). The optimization of extraction of antioxidants from apple pomace by pressurized liquids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf902498y>
- Wiktor, A., Sledz, M., Nowacka, M., Rybak, K., & Witrowa-Rajchert, D. (2016). The influence of immersion and contact ultrasound treatment on selected properties of the apple tissue. *Applied Acoustics*. <https://doi.org/10.1016/j.apacoust.2015.05.001>
- Withouck, H., Boeykens, A., Vanden Broucke, M., Moreira, M. M., Delerue-Matos, C., & De Cooman, L. (2019). Evaluation of the impact of pre-treatment and extraction conditions on the polyphenolic profile and antioxidant activity of Belgium apple wood. *European Food Research and Technology*, 245(11), 2565–2578. <https://doi.org/10.1007/s00217-019->

03373-2

- Xu, D.-P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J.-J., & Li, H.-B. (2017). Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 96. <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>
- Xu, Y., Fan, M., Ran, J., Zhang, T., Sun, H., Dong, M., Zhang, Z., & Zheng, H. (2016). Variation in phenolic compounds and antioxidant activity in apple seeds of seven cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(3), 379–388. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.002>
- Yue, T., Shao, D., Yuan, Y., Wang, Z., & Qiang, C. (2012). Ultrasound-assisted extraction, HPLC analysis, and antioxidant activity of polyphenols from unripe apple. *Journal of Separation Science*. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200295>
- Zhi, K., Li, M., Bai, J., Wu, Y., Zhou, S., Zhang, X., & Qu, L. (2016). Quercitrin treatment protects endothelial progenitor cells from oxidative damage via inducing autophagy through extracellular signal-regulated kinase. *Angiogenesis*. <https://doi.org/10.1007/s10456-016-9504-y>
- Zhou, L., Xiong, Z., Liu, W., & Zou, L. (2017). Different inhibition mechanisms of gentisic acid and cyaniding-3-O-glucoside on polyphenoloxidase. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.010>

CAPÍTULO 2:
EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO SIMULTÂNEAS DE
COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NO
BAGAÇO DA MAÇÃ

O subproduto industrial da maçã é uma amostra complexa e, portanto, possui diversas classes de compostos fenólicos. Os extratos obtidos por qualquer técnica de extração contêm estas classes misturadas. Pensando em isolar as classes de compostos de interesse de um extrato, a extração em fase sólida (SPE) é uma alternativa moderna e eficiente para separação de compostos, purificação de amostras e diminuição do pré-preparo para análises. Neste capítulo, é apresentado um trabalho, previamente publicado (Anexo 2) de extração de compostos bioativos do resíduo industrial da maçã utilizando líquidos pressurizados (PLE) e purificação em linha com fase sólida (PLE-SPE). O método desenvolvido em um equipamento extrator e purificador (*Extract-US* - Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020150309392, título: "Sistema integrado de análises para determinação de compostos químicos e uso". Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 10/12/2015. Instituição(ões) financiadora(s): FAPESP) garante que a extração aconteça simultaneamente à purificação do extrato, ou seja, ao mesmo tempo que o equipamento extrai os compostos da amostra, há o fracionamento do extrato (purificação) em diferentes classes de compostos alvos.

É importante destacar que o método PLE-SPE desenvolvido neste trabalho serviu de estudo base para o desenvolvimento da patente “Processo de separação de compostos fenólicos em matrizes vegetais” (Privilégio de Inovação, número do registro: BR1020200171895, depósito no INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial em 21/08/2020) (Anexo 3).

1. Metodologia de extração

Para o desenvolvimento deste trabalho, o resíduo industrial da maçã foi fornecido pela empresa (Maçã Desidratados e Congelados, Fraiburgo, SC, Brasil). O resíduo foi recebido seco e armazenado a -20°C até a matéria-prima ser utilizada no processo de extração. As extrações foram realizadas no sistema “*Extract-US*” (FAPESP2013/04304-4) (Santos et al., 2019; Sumere et al., 2018). O sistema consiste em uma bomba de líquido (PU-2080, Jasco, Tóquio, Japão), válvulas de agulha (Autoclave Engineers, Erie, Pensilvânia, EUA), regulador de pressão traseira (Tescom, Ferguson, Missouri, EUA) e cinco posições automáticas, 10 válvulas de porta (Waters, Milford, MA, EUA) (Figuras 3 e 4).

As extrações foram realizadas da seguinte forma: na célula de extração, um filtro de prateleira foi colocado na tampa inferior da célula e uma camada de esferas de vidro (2 mm) foi usado para reduzir o volume morto na célula (5g). Posteriormente, a amostra (1,0 g) foi pesada e transferida para a célula de extração. A célula foi então conectada ao sistema e a tubulação de entrada de solvente conectada à célula de extração. Paralelamente, a coluna SPE foi preenchida com o adsorvente selecionado (Septra™ C18-E, tamanho de partícula: 50 µm, tamanho de poros: 85 Å, Phenomenex, EUA; Isolute C18-EC, tamanho de partícula: 50 µm, poresize: 60 Å, Biotage, Suécia; Strata X C18, tamanho de partícula: 33 µm, tamanho de poro: 85 Å, Phenomenex, EUA; e Oasis HLB C18, tamanho de partícula: 30 µm, tamanho de poro: 80 Å, Waters, EUA) e conectada ao sistema. Depois que a célula de extração e a coluna foram conectadas ao sistema, o procedimento de extração foi iniciado. O procedimento de extração foi realizado em várias etapas:

- I. Ativação e acondicionamento: As válvulas V1 – V4 foram ajustadas na posição 1 para a ativação e o acondicionamento do adsorvente com 30 mL do solvente selecionado (metanol ou etanol para ativação e acondicionamento com água) a uma taxa de fluxo de 3 mL.min⁻¹.
- II. 1ª etapa de extração: o sistema foi reconfigurado com o ajuste das válvulas automáticas V1 e V4 para a posição 1 e das válvulas automáticas V2 e V3 na posição 2 para iniciar a primeira etapa de extração, utilizando a água como solvente. O sistema foi aquecido até a temperatura experimental (60–80°C) e a célula de extração foi preenchida com o solvente até a pressão do processo atingir 100 bar. Uma vez atingidas as condições experimentais, a amostra foi extraída no modo dinâmico, mantendo a vazão à taxa de 2 mL.min⁻¹ e pressão constante (100 bar). Foram coletadas sete frações aquosas durante a extração dinâmica: Fração 1: 0–15 mL; Fração 2: 15–30 mL; Fração 3: 30–60 mL; Fração 4: 60–75 mL; Fração 5: 75–90 mL; Fração 6: 90–105 mL; Fração 7: 105–120 mL.
- III. 2º estágio de extração: O segundo estágio de extração foi realizado com um solvente de polaridade menor do que o utilizado no primeiro estágio de extração, ou seja, metanol ou etanol. Após o primeiro estágio, o segundo estágio de extração foi iniciado definindo a mudança automática do solvente água 100% para 100% metanol ou etanol, mantendo o mesmo fluxo (2 mL.min⁻¹) e temperatura (60–80°C). Foram coletadas duas frações de 20 mL do solvente.

Todas as extrações foram realizadas em duplicata. As frações foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e filtradas através de um filtro de seringa (nylon, 25 mm, 0,22 μm , Analítica, São Paulo, Brasil) antes de serem analisadas. O tempo de extração foi de aproximadamente 70 minutos (60 minutos para o 1º estágio e 10 minutos para o 2º estágio).

Para o desenvolvimento do método, foi utilizada uma estratégia passo a passo. Inicialmente, diferentes adsorventes foram avaliados com condições fixadas e, uma vez selecionado o adsorvente mais eficiente, diferentes temperaturas foram avaliadas. Por fim, foi avaliada a substituição do metanol utilizado nos processos, pelo solvente etanol. Os resultados produzidos com as melhores condições foram comparados aos obtidos com outras técnicas.

Todas as variáveis foram submetidas a um teste de conformidade para verificar a abordagem com curvas teóricas. O teste de Shapiro-Wilk e Levene foram usados para verificar a homoscedasticidade. O teste one-way ANOVA com o pós teste Bonferroni foi usado para avaliar os resultados. Em todos os testes, foi considerado o nível de significância de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 15.0.1.

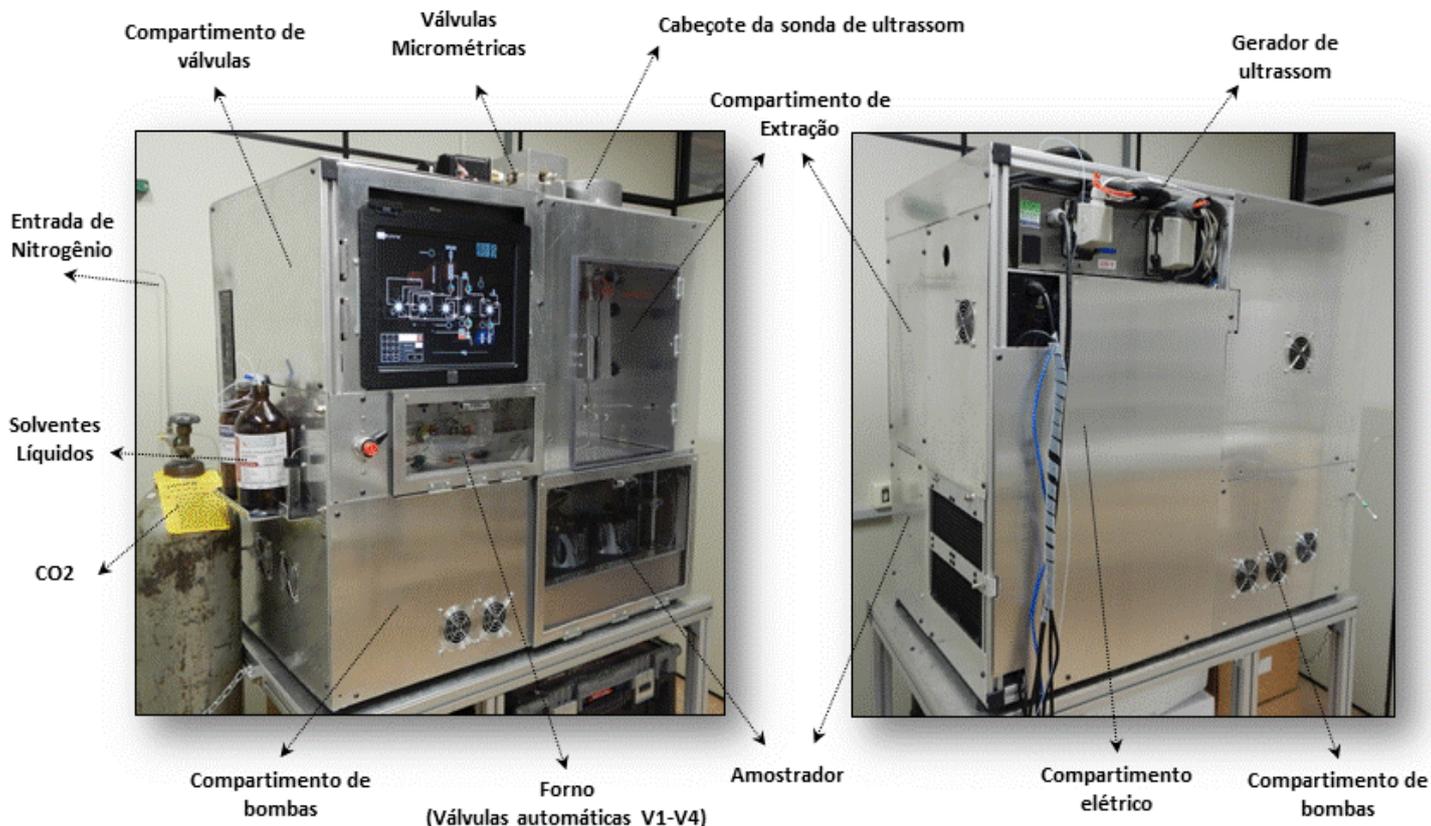


Figura 3. Sistema integrado de análise "Extract-US".

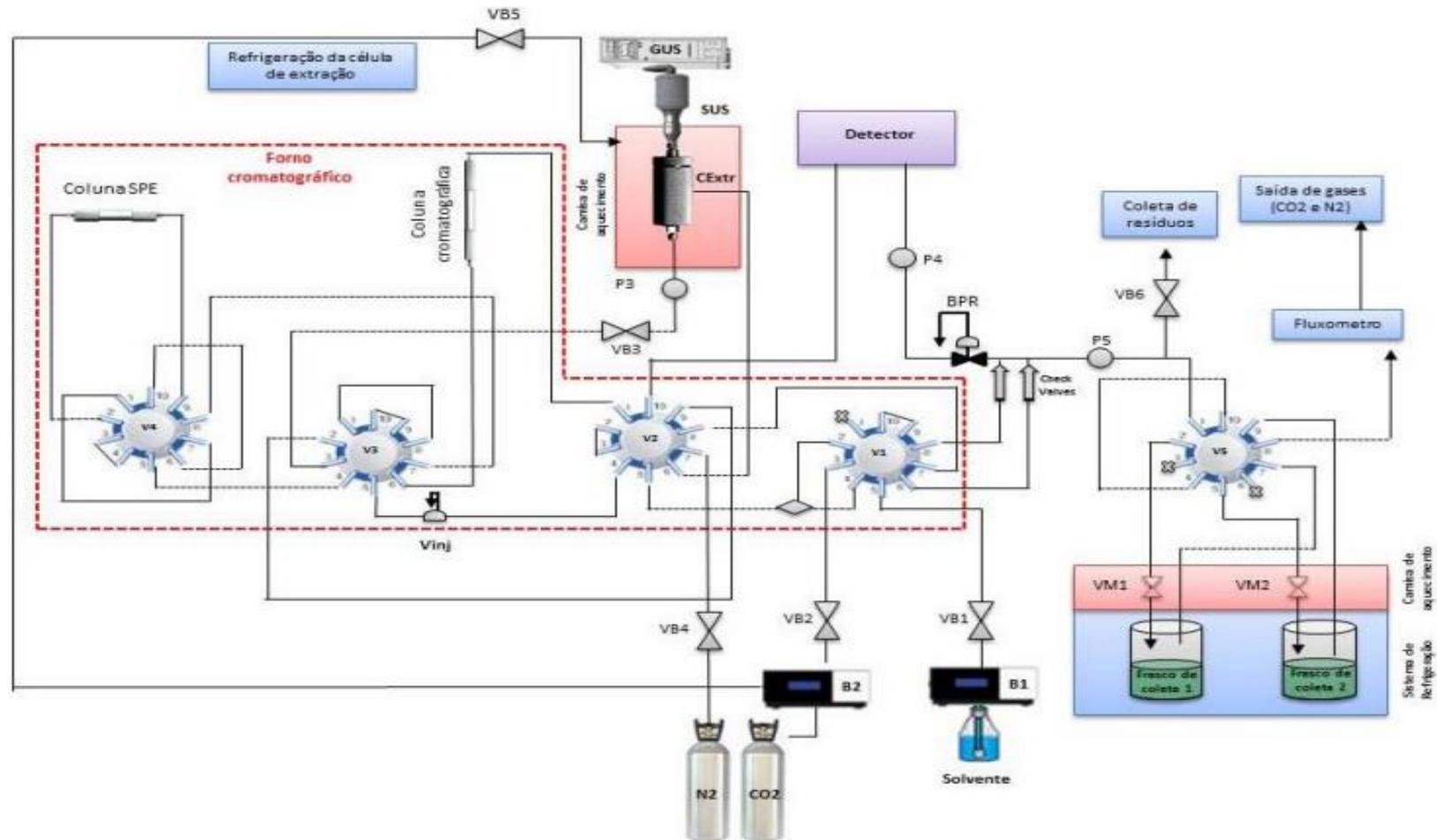


Figura 4. Esquema do sistema “*Extract-US*”: B1: Bomba de líquidos; B2: Bomba de CO₂; BPR: Válvula reguladora de pressão; CEextr. Célula de extração, GUS: Gerador de ultrassom; SPE: Extração em fase sólida; SUS: Sonda de ultrassom; P1-5: Transdutor de pressão; V1-5: Válvula automática de 2 posições e 10 portas; VB1-6: Válvula de bloqueio; VInj: Válvula de injeção manual; VM1-2: Válvula micrométrica; * A seção pontilhada representa o forno cromatográfico.

2. Composição fenólica do resíduo de maçã

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma das técnicas analíticas mais utilizadas para a separação, quantificação e identificação de compostos em amostras vegetais por ser totalmente automatizada, rápida, com alta seletividade, sensibilidade e resolução. A técnica consiste em passar um líquido pressurizado (fase móvel) e a mistura da amostra por uma coluna com adsorvente (fase estacionária). Os compostos que interagem mais com a fase estacionária ficam retidos na coluna enquanto que os demais vão sendo analisados. Assim, a interação dos compostos com o conteúdo da coluna acontece a depender da natureza hidrofílica ou hidrofóbica, massa molecular ou carga dos compostos e assim, a separação vai acontecendo (Esteki et al., 2019; Kamal & Karoui, 2015).

Os extratos obtidos neste trabalho foram analisados por HPLC no sistema *Extract-US* definido no modo "análise" (V1, V2 e V4 na posição 1 e V3 na posição 2). A separação dos compostos foi realizada em uma coluna Kinetex C18 (2,6µm, 100 A, 100 × 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, EUA). Os picos foram registrados e integrados a 260 nm. A temperatura da coluna foi mantida a 40°C. A fase móvel foi composta de água (ácido fosfórico a 0,1%) (solvente A) e acetonitrila (ácido fosfórico a 0,1%) (solvente B). O perfil de gradiente com taxa de fluxo de 1,1 mL.min⁻¹ foi o seguinte: 0 min, 5% de B; 0,5 min, 10% de B; 2,0 min, 12,5% de B; 3 min, 15% de B; 4 min, 80% de B; 5 min; 100% B, 6 min, 100% B; 7 min, 5% B. O tempo de equilíbrio entre as corridas foi de 5 min e o volume de injeção foi de 5µL. A identificação de cada composto foi baseada no perfil identificado pelas análises UHPLC-MS/MS em um sistema UHPLC-MS XEVO G2-S QToF (Waters, EUA) equipado com um detector de diodo acoplado a um espectrômetro de massa quadrupolo com uma fonte de ionização ESI de modo negativo e positivo. A separação foi realizada em uma coluna Acquity C18 UPLC BECH (2,1 mm × 100 mm, 1,7 µm; Águas). Dois solventes foram usados: solvente A (água com 2% de ácido fórmico) e solvente B (acetonitrila com 2% ácido fórmico), com o seguinte gradiente: 0 min, (100% A); 1 minuto, (100% UMA); 2 min, (95% A); 3 min, (90% A); 4 min, (85% A); 5 minutos, (85%A); 6 min, (80% A), 7 min, (80% A); 8 min (75% A); 9 minutos, (75% UMA); 10 min, (70% A); 11 min, (0% A). A coluna foi aquecida a 47°C, o fluxo de solvente foi de 0,6 mL.min⁻¹, e o volume de injeção foi de 1µL. A absorbância de UV foi monitorada entre 210 e 400 nm. Picos foram integrados a 260 nm. O método ESI foi ajustado com 3 kV tensão capilar; temperatura da fonte a 120°C; temperatura da

linha de dessolvatação a 400 °C; fluxo de gás de cone a 10 L.h⁻¹; fluxo da linha de desolvatação em 850 L.h⁻¹; entre 100 e 1200 [M-H]⁻; tempo de sondagem de 0,2 s; e Tensão do cone de 25 volts. A identificação dos compostos foi baseada em as massas [M-H]⁻, tempo de retenção e coeluição com os padrões acessível. Outro recursos como comparação dos tempos de retenção e os espectros de UV dos compostos separados, bem como por coeluição com padrões autênticos também foram utilizados para a identificação da amostra. A curva (7 pontos – 0.1–100.0 mg L⁻¹) de cada composto foi preparada plotando a concentração *versus* a área do pico. A quantificação desses compostos foi realizada com base nas curvas de calibração dos compostos relacionados e expressa em equivalentes (Rostagno et al., 2011; Sumere et al., 2018). Floretina xilosil glucosideo foi quantificado como equivalente de floridzina, enquanto os derivados de quercetina 1 a 4 e quercetina ramnosideo foram quantificados como equivalentes de hiperósideo. O composto identificado como ácido glucosideo protocateico (PcAG) foi quantificado como equivalente de ácido gálico. As análises foram realizadas em duplicata.

Um extrato de referência obtido a partir de 1g de amostra, 25 mL de solvente etanol 80% (v/v), por 30 minutos em banho ultrassônico (37Hz e 100% de potência) foi utilizado para identificação dos compostos da amostra (Figura 5.A). Os principais compostos identificados no bagaço de maçã foram: ácido gálico ([M-H]⁻ 169,05, λ_{max}: 271,0 nm; tr: 2,47 min; Pico #1) coeluído com um composto identificado como ácido glucosideo protocateico (PcAG: [M-H]⁻ 315,07, λ_{max}: 287 nm; tr: 2,47 min; Pico #1); ácido clorogênico ([M-H]⁻ 353,1, λ_{max}: 254,0, 326,1 nm; rt: 7,14 min; Pico #2); epicatequina ([M-H]⁻ 279,1; λ_{max}: 278,1 nm; rt: 10,54 min; Pico # 3); rutina ([M-H]⁻ 609,2, λ_{max}: 255,1, 354,1 nm; rt: 13,88 min; Pico #4); hiperósideo ([M-H]⁻ 463,1; λ_{max}: 354,1, 354,1 nm; tr: 14,06 min; Pico #5); quercetina ramnosídeo ([M-H]⁻ 447,1, λ_{max}: 255,1, 349,1 nm; tr: 15,66 min; Pico #10); floretina xilosil glucosideo ([M-H]⁻ 567,2, λ_{max}: 285,1 nm; tr: 15,88 min; Pico #11); e floridzina ([M-H]⁻ 435,1, λ_{max}: 284,1 nm; tr: 16,68 min; Pico #12). Além disso, quatro derivados da quercetina ([M-H]⁻ 433,1, λ_{max}: 254,1, 353,1 nm; tr: 13,8-14,9 min; picos 6 a 9) também foram detectados na amostra, mas sua identificação exata não foi possível devido às semelhanças estruturais entre eles. Os compostos com os picos mais evidentes nos extratos foram ácido gálico/PcAG, floridzina e hiperósideo (Figura 5). Os ácidos fenólicos foram os compostos encontrados em maior concentração seguida de flavonoides.

Os compostos identificados e suas concentrações na amostra utilizada estavam de acordo com outros estudos sobre os compostos presentes no bagaço e no suco de maçã

(Baskaran et al., 2016; Mari et al., 2010). As diferenças em termos de composição e concentração da amostra utilizada em comparação com trabalhos anteriores, pode ser explicada pela variação de cultivar, maturação do fruto, condições de cultivo, manejo de cultura, condições de secagem do material, degradação ou pelo método de identificação e quantificação dos compostos (Everette et al., 2010; Kalinowska et al., 2014; Treutter, 2001).

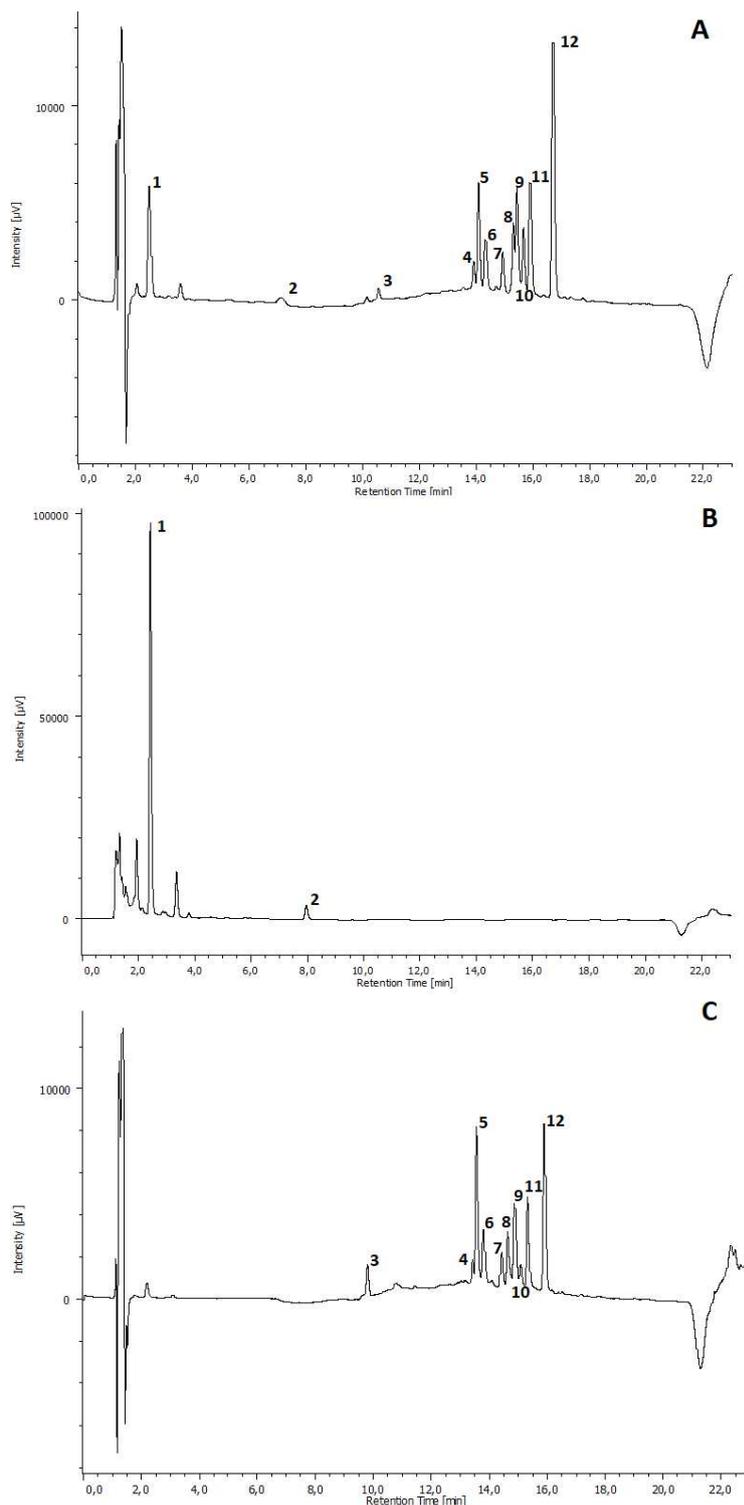


Figura 5 - Cromatogramas obtidos com o método desenvolvido. **A:** Extrato de referência onde todos os compostos são apresentados (extrato bruto); **B:** Fração 1 (0-15 mL), fração aquosa rica em ácido gálico/PcAG; **C:** Fração metanólica (0-20 mL de metanol). Identificação dos compostos: Pico #1: Ácido Gálico/Ácido Glucosídeo Protocateico (PcAG); Pico #2: Ácido Clorogênico; Pico #3: Epicatequina; Pico #4: Rutina; Pico #5: Hiperosídeo; Pico #6: derivado de quercetina 1; Pico #7: derivado de quercetina 2; Pico #8: derivado de quercetina 3; Pico #9: derivado de quercetina 4; Pico #10: Quercetina Ramnosídeo; Pico #11: Floretina xilosil glucosídeo; Pico #12: Floridzina.

3. Comparação com diferentes adsorventes

Inicialmente buscou-se comparar vários adsorventes com diferentes características em condições previamente testadas, sendo os adsorventes escolhidos Sepra, Isolute, Strata X e Oasis, para avaliar a viabilidade da estratégia de extração. As condições iniciais foram determinadas com base em uma série de testes usando diferentes quantidades de água para eluir previamente outros compostos, que não os flavonoides da amostra. Com base nesses testes, a coleta de amostras consistiu na remoção de 8 frações: as sete primeiras frações usando água como solvente (15 mL, 30 mL, 60 mL, 75 mL, 90 mL, 105 mL e 120 mL), e a última fração de 20 mL de metanol. Inicialmente, foi usado metanol como solvente de ativação e eluição, já que estudos anteriores usaram esse solvente, e é um solvente padrão utilizado em fins analíticos (Rostagno et al., 2005; Simpson, 1991). A temperatura foi mantida a 60°C. A recuperação de compostos do bagaço de maçã obtido com os diferentes adsorventes é mostrado na Figura 6.

A recuperação de ácido fenólico total não foi estatisticamente significativa, e adsorventes convencionais (Sepra e Isolute) revelaram uma capacidade de retenção semelhante a dos adsorventes poliméricos (Strata X e Oasis) (Figura 6.A), os quais são mais avançados e geralmente produzem melhores resultados. No entanto, algumas tendências interessantes foram observadas ao comparar os resultados através da recuperação de compostos individuais. Como pode ser visto nas Figura 6.A1 e 6.A2, dependendo do ácido, os adsorventes testados mostraram um comportamento de retenção muito diferente.

Para ácido gálico/PcAG, uma recuperação significativamente maior foi obtida com os adsorventes poliméricos (Strata X e Oasis) em comparação com os adsorventes convencionais ($p < 0,031$). No entanto, também foram observadas diferenças significativas na retenção de ácido clorogênico. O ácido clorogênico não foi retido pelo adsorvente Oasis e apenas pequenas quantidades foram recuperadas usando o adsorvente Strata X, que foi significativamente menor do que os produzidos com adsorventes convencionais ($p < 0,001$). A maior recuperação foi obtida com o adsorvente Sepra, seguido pelo Isolute.

As menores recuperações de ácido clorogênico, observadas com os adsorventes poliméricos, e ácido gálico, com os adsorventes convencionais, foram provavelmente associado à eluição gradual desses compostos nas frações aquosas coletadas durante o primeiro estágio de extração. Com as mesmas condições de extração, ambos os ácidos foram extraídos da matéria-prima e alcançaram o adsorvente com a mesma concentração

e, portanto, as diferenças estão associadas à capacidade de retenção do adsorvente. A maior recuperação do ácido clorogênico com o adsorvente convencional é provavelmente devido a uma menor capacidade de retenção por esse tipo de adsorvente, levando à rápida eluição e sua coleta em maior concentração nas primeiras frações aquosas (permitindo sua detecção e quantificação).

Por outro lado, devido à sua maior capacidade de retenção, os adsorventes poliméricos interagem mais com o ácido clorogênico e gradualmente o eluem distribuindo-o pelas frações aquosas. Devido ao alto volume de água utilizado, a concentração de ácido clorogênico foi baixa demais para ser detectada e quantificada nessas frações e, portanto, não foi contabilizado, resultando em uma menor recuperação.

O comportamento diferente observado dependendo do ácido está provavelmente relacionado à sua característica estrutural. Enquanto o ácido gálico é um ácido trihidroxibenzoico, o ácido clorogênico é derivado do ácido cinâmico, resultando em diferentes interações com o adsorvente e o solvente e, portanto, afetando sua recuperação. A falta de diferença estatística em termos de fenólicos totais, na recuperação de todos os adsorventes, ocorre devido à maior recuperação de ácido gálico por adsorventes poliméricos compensando a menor recuperação de ácido clorogênico. No entanto, altas quantidades de ácido gálico foram recuperadas da matéria-prima independentemente do adsorvente, sugerindo um excelente potencial da estratégia de extração/eluição utilizando a combinação de PLE e um adsorvente.

Excelentes resultados também foram observados na recuperação da maioria dos flavonoides presentes na amostra, dependendo do composto alvo e adsorvente. Diferenças significativas foram observadas para flavonoides totais. Curiosamente, os adsorventes convencionais também foram, em geral, mais eficientes que os poliméricos na recuperação de flavonoides ($p < 0,001$).

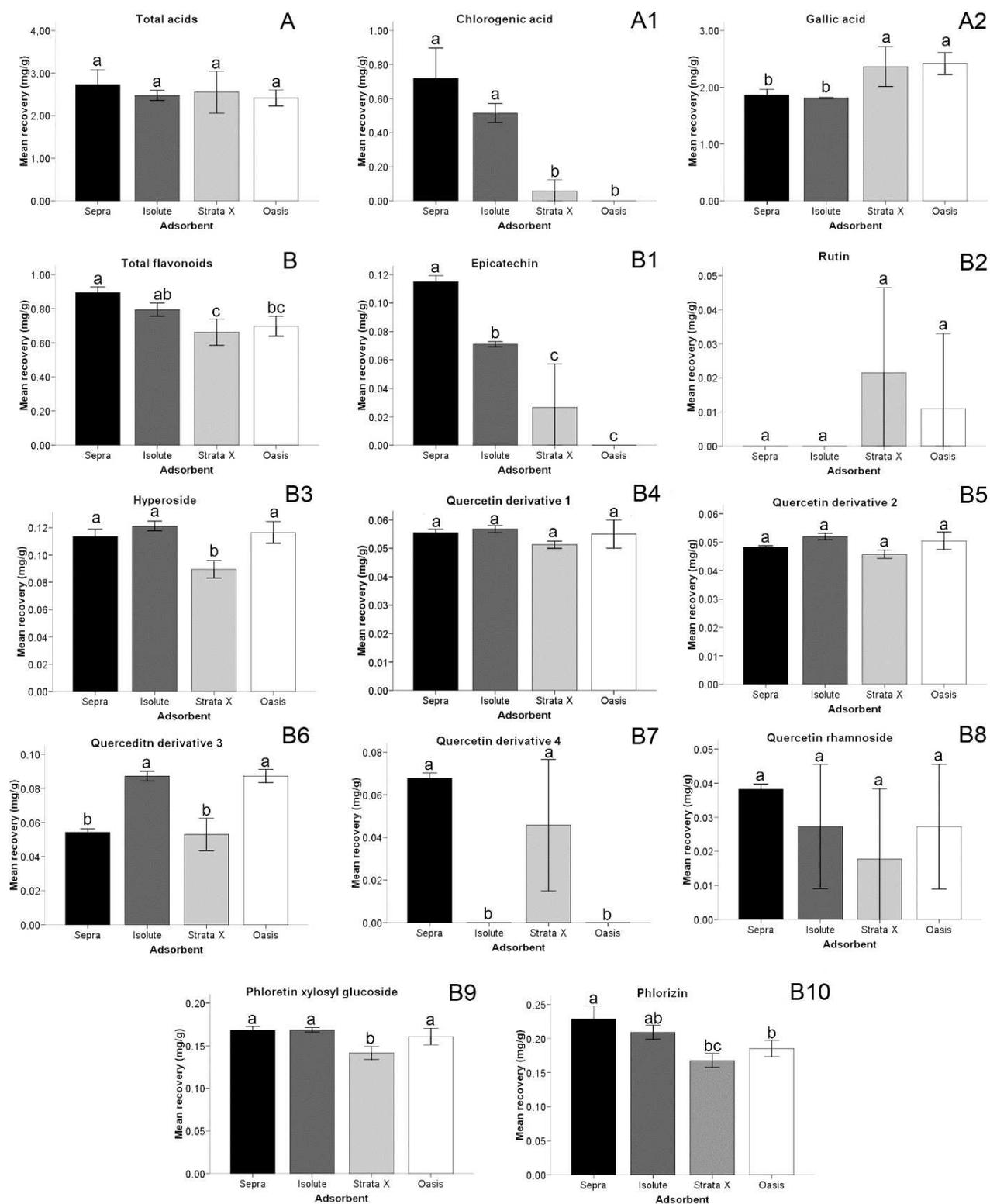


Figura 6. - Recuperação (mg/g) de ácidos fenólicos (A) e flavonoides (B) com diferentes adsorventes (Sepra, Isolute, Strata X e Oasis).

A epicatequina (Figura 6.B1), por exemplo, foi detectada apenas nos extratos da fração orgânica dos adsorventes convencionais, com uma recuperação significativamente maior produzida pelo adsorvente Sepra do que pelo Isolute ($p < 0,01$). A epicatequina não foi detectada em nenhuma das frações aquosas ou orgânicas produzidas com adsorventes Oasis, o que também pode ser devido à eluição gradual desse composto na fração aquosa, ocasionando baixa concentração (abaixo dos níveis de detecção), semelhante ao ácido clorogênico. No entanto, neste caso, a epicatequina não foi adequadamente retida pelo adsorvente, em vez de ser retida mais fortemente, como foi o caso do ácido clorogênico.

A maior recuperação de hiperósideo (Figura 6.B3) também foi observada com os adsorventes convencionais Sepra e Isolute, quando comparado aos poliméricos, sendo que o adsorvente Strata X produziu a menor recuperação ($p < 0,001$). Os adsorventes convencionais também foram mais eficientes para a recuperação do floretina xilosil glucosideo (Figura 6.B9) que o Strata X ($p < 0,001$). Curiosamente, para este composto, o adsorvente polimérico Oasis foi mais eficiente que o Strata X ($p = 0,009$). Resultados semelhante também foram obtidos para a floridzina (Figura 6.B10), com maior recuperação produzida por adsorventes convencionais ($p < 0,001$), sem diferença significativa entre os dois adsorventes poliméricos e o Isolute. Além disso, a maior recuperação do derivado de quercetina 3 (Figura 6.B6) foi observada ao usar o adsorvente Isolute, enquanto os mais baixos foram produzidos com o adsorvente Sepra e Strata X ($p < 0,001$).

Contudo, em alguns casos, não houve diferenças significativas entre os adsorventes, como os derivados de quercetina 1 e 2 e quercetina ramnosideo (Figura 6.B4, 6.B5 e 6.B8, respectivamente). Em outros casos, os adsorventes convencionais não foram capazes de reter compostos, como a rutina (Figura 6.B2), que só foi detectada na fração orgânica dos adsorventes poliméricos, e a recuperação tenha sido melhor alcançada com o adsorvente Strata X, do que com o adsorvente Oasis. A má retenção desses compostos e sua presença nas frações aquosas, associadas à baixa concentração também podem explicar a falta de recuperação com adsorventes convencionais. Finalmente, o derivado de quercetina 4 (Figura 6.B7) mostrou um comportamento diferente e não foi detectado na fração orgânica dos adsorventes Isolute e Oasis, enquanto a maior recuperação foi observada com o adsorvente Sepra ($p < 0,001$).

Portanto, embora todos os adsorventes compartilhem a mesma estrutura básica (C18), devido a diferenças em suas características químicas, elas terão diferentes

capacidades de retenção para compostos semelhantes. Essas diferenças na capacidade de retenção são mais evidentes ao considerar compostos com estruturas químicas muito diferentes. No geral, os melhores resultados foram produzidos com o adsorvente Sepra, que produziu as maiores recuperações para a maioria dos flavonoides e ácidos fenólicos. Assim, este adsorvente foi selecionado para ser utilizado no desenvolvimento posterior do método.

4. Temperatura de extração

A temperatura é um dos principais fatores que influenciam o processo de extração e é particularmente relevante para a PLE e o comportamento dos adsorventes. A importância da temperatura se deve ao aprimoramento da transferência de massa de analitos da matriz para o solvente, melhorando o rendimento da extração. A temperatura, pode afetar ainda a retenção de compostos por que afeta propriedades de adsorventes e solventes, incluindo viscosidade e constante dielétrica. Também é essencial considerar que vários compostos fenólicos podem ser submetidos a degradação quando altas temperaturas são utilizadas (Manchón et al., 2010; Manchón et al., 2013; Rostagno et al., 2010). Nesse contexto, a temperatura do processo foi aumentada a 60°C, 70°C e 80°C mantendo a utilização do adsorvente Sepra, conforme discutido na seção 3. Os resultados mostrados na Tabela 6 sugerem que os compostos foram afetados diferentemente pela temperatura. Enquanto a temperatura não influenciou a recuperação da maioria dos compostos, em alguns casos, reduziu a eficiência do adsorvente em retê-los.

Alguns ácidos fenólicos foram particularmente afetados pelo aumento de temperatura e a recuperação total foi significativamente reduzida se a temperatura foi superior a de 70°C ($p = 0,04$). Quando há análise individual dos dados, o principal fator determinante do rendimento total de ácido foi a recuperação do ácido clorogênico, que foi drasticamente reduzido a 80°C ($p < 0,001$). Estes resultados podem ser explicados pela degradação de ácido clorogênico causado pela temperatura mais alta, entre outros fatores. Em geral, a estabilidade dos ácidos e outros fenólicos é afetada pela temperatura, luz e tempo de extração, porque na degradação ocorrem reações como hidrólise, redução ou polimerização, bem como a liberação de enzimas oxidativas presente nas amostras, alterando as quantidades finais dos compostos nas frações de extração (Liazid et al., 2007).

A degradação é um fator provável que influencia a recuperação, uma vez que o ácido clorogênico pode ser suscetível a perdas durante processamento em altas temperaturas (Milić et al., 1968). A luz não é um fator a ser considerado, uma vez que a PLE é realizada em um sistema fechado, não exposto à radiação UV. Por ser um material seco, também não é provável que a atividade enzimática esteja ocorrendo em níveis tão altos para explicar a redução drástica observada na recuperação deste composto em tão pouco tempo. Portanto, é possivelmente uma combinação de fatores que estão ocorrendo, incluindo reações de hidrólise, redução ou polimerização e atividade enzimática, envolvidos na degradação do ácido clorogênico durante a extração e, assim, reduzindo-o na recuperação final.

O aumento da temperatura não afetou a recuperação do ácido gálico/PcAG, possivelmente devido à sua alta solubilidade em água e ao alto volume de solvente utilizado, proporcionando uma extração eficaz, sem necessidade de aumento da temperatura. À medida que a temperatura aumenta, a degradação do ácido gálico/PcAG pode ocorrer (Réblová, 2012), enquanto há ao mesmo tempo a transferência de massa da matriz da matéria-prima para o solvente. A solubilidade aumentada de ácido gálico/PcAG no solvente também pode contribuir para o aumento observado na recuperação deste composto. O resultado desses efeitos podem explicar a não diferença estatística nos resultados observados em diferentes temperaturas para ácido gálico/PcAG.

Em termos de recuperação total de flavonoides, não houve diferença significativa entre as temperaturas testadas. Embora a maioria dos flavonoides não sejam afetados pela temperatura, a recuperação de alguns compostos foi grandemente influenciada por essa variável. A recuperação da epicatequina, derivados de rutina, hiperósideo, quercetina 1, 2 e 4, quercetina ramnósideo e floretina xilosil glucosideo não foram significativamente afetados pelo aumento da temperatura de extração. Embora a recuperação da rutina não tenha sido estatisticamente diferente em todas as temperaturas, esse composto foi detectado apenas na fração de solvente orgânico do processo realizado a 80°C. As diferenças não foram estatisticamente significantes devido à baixa concentração deste composto e à variabilidade observada na retenção do composto pelo adsorvente a 80°C.

Entre os resultados mais relevantes, é essencial destacar que o recuperação do principal flavonoide encontrado nas maçãs, a floridzina, significativamente aumentou com o aumento da temperatura de 60°C para 70°C ($p = 0,007$). No entanto, um aumento adicional na temperatura de extração a 80°C não teve um efeito significativo. A

recuperação é determinada em grande parte pela retenção dos compostos pelo adsorvente, que é influenciado pela temperatura (Garcia-Salas et al., 2010; Gómez Caravaca et al., 2005; Palma et al., 2002). Portanto, temperaturas mais altas (ou seja, 80°C) poderiam reduzir a capacidade de retenção, levando à perda do composto na fase aquosa em vez da fase orgânica. Devido ao alto volume da fase aquosa e à eluição gradual do adsorvente, a concentração no extrato era muito baixa para permitir a detecção e, portanto, podem explicar a falta de diferença entre 70 e 80°C.

Outra explicação, além da degradação térmica, é que a recuperação quantitativa já foi alcançada a 70°C, e não houve floridzina disponível para ser extraída nas melhores condições de extração com a temperatura mais elevada. A recuperação quantitativa também explicaria a falta de efeito pelo aumento da temperatura na recuperação de todos os outros flavonoides, uma vez que floridzina é o flavonoide encontrado com a maior concentração na amostra. A não diferença significativa na recuperação total de flavonoides entre todas as temperaturas, é devido a diferenças acumulativas não estatisticamente significativas de outros flavonoides, como o hiperosideo e o derivado de quercetina 1, compensando a diferença significativa na recuperação de floridzina no total geral. Também é possível que um efeito combinado da degradação térmica dos flavonoides e menor retenção e detecção na fase aquosa compense a extração desses compostos da matriz da amostra, explicando a falta de significantes efeitos da temperatura na recuperação.

Tabela 6 - Recuperação (mg/g) de compostos fenólicos do bagaço de maçã utilizando diferentes temperaturas de extração. Galico/PcAG: ácido gálico e ácido glucosídeo protocateico; Que-Drv: derivado de quercetina; Que-Rhn: Quercetin rhamnoside; Pht-Xyl-Glc: floretina xilosil glucosídeo.

Classes	Picos #	Compostos	Recuperação (mg/g)		
			60°C	70°C	80°C
Ácidos	1	Galico/PcAG	1,867 ^a ± 0,096	1,925 ^a ± 0,068	1,755 ^a ± 0,087
	2	Clorogênico	0,718^a ± 0,176	0,153^b ± 0,103	0,000^b ± 0,000
	-	Total de Ácidos	2,727^a ± 0,352	2,221^b ± 0,179	1,755^b ± 0,087
Flavonoides	3	Epicatequina	0,115 ^a ± 0,004	0,114 ^a ± 0,002	0,077 ^a ± 0,051
	4	Rutina	0,000 ^a ± 0,000	0,000 ^a ± 0,000	0,008 ^a ± 0,017
	5	Hiperosídeo	0,113 ^a ± 0,005	0,085 ^a ± 0,030	0,091 ^a ± 0,010
	6	Que-Drv 1	0,555 ^a ± 0,001	0,052 ^a ± 0,000	0,052 ^a ± 0,005
	7	Que-Drv 2	0,048 ^a ± 0,000	0,047 ^a ± 0,000	0,045 ^a ± 0,002
	8	Que-Drv 3	0,054^a ± 0,002	0,056^a ± 0,000	0,049^b ± 0,002
	9	Que-Drv 4	0,067 ^a ± 0,002	0,065 ^a ± 0,001	0,061 ^a ± 0,005
	10	Que-Rhn	0,038 ^a ± 0,001	0,028 ^a ± 0,019	0,036 ^a ± 0,009
	11	Pht-Xyl-Glc	0,168 ^a ± 0,003	0,154 ^a ± 0,018	0,168 ^a ± 0,015
	12	Floridzina	0,228^b ± 0,017	0,295^a ± 0,050	0,285^a ± 0,064
	-	Total de Flavonoides	0,895^a ± 0,033	0,920^a ± 0,055	0,880^a ± 0,081

Valores em negrito indicam diferenças significativas (one-way ANOVA) $p < 0,005$; Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (teste de Bonferroni) $p < 0,05$.

5. Solvente de ativação e extração/eluição

Devido à natureza tóxica, maior custo e impacto ambiental do metanol, o etanol foi uma alternativa a ser usada na ativação e solvente de extração/eluição. Assim, o etanol foi utilizado na substituição do metanol, primeiro como solvente de ativação, mantendo o metanol como solvente de extração/eluição (M-E). O etanol também foi utilizado como solvente de ativação e extração/eluição (E-E), e os resultados foram comparados com os produzidos com o metanol nos dois estágios (M-M). O adsorvente Sepra foi utilizado e a temperatura de extração foi de 60°C. A recuperação de ácidos fenólicos e flavonoides obtidos com os diferentes solventes é mostrado na Tabela 7. Os resultados revelam que o

solvente de ativação e extração/eluição pode influenciar significativamente a recuperação dos compostos alvo. Como esperado, a recuperação de ácidos fenólicos não foi afetada pela substituição de metanol por etanol em nenhum dos dois estágios, já que esses compostos são recuperados nas primeiras frações com água e não são bem retidos pelo adsorvente e, portanto, a ativação e extração/eluição com diferentes solventes não deve afetar sua recuperação.

Por outro lado, resultados surpreendentemente bons foram obtidos quando houve a substituição do metanol como solvente de extração/eluição pelo etanol, uma vez que não foram encontradas diferenças estatísticas na recuperação de ácidos fenólicos e na maioria dos flavonoides, sugerindo que é possível reduzir o uso de solventes tóxicos no processo. Entretanto, a substituição do metanol pelo etanol como solvente de ativação afetou negativamente a recuperação de alguns flavonoides, como o derivado de quercetina 4 ($p < 0,001$), enquanto que ao mesmo tempo, melhorou a recuperação de rutina ($p < 0,001$). A ativação do adsorvente é fundamental para a capacidade do adsorvente de reter compostos, sendo que o solvente de ativação desempenha um papel essencial na recuperação de compostos moderadamente polares, como flavonoides, que dependem da retenção para serem recuperados. Se o adsorvente não reter corretamente, os compostos podem se perder nas frações aquosas da primeira etapa de extração. Os resultados indicam que o etanol é um solvente adequado para extração/eluição de compostos fenólicos do bagaço de maçã e pode ser usado para substituir o metanol. Além disso, os dados indicam que o etanol pode ser utilizado para a ativação do adsorvente, mas é importante ressaltar que isso pode afetar negativamente a retenção de alguns compostos.

No geral, os resultados obtidos com o método desenvolvido são excelentes, considerando que ele utiliza solventes “verdes” (e uma pequena quantidade de metanol, que pode ser reciclado) enquanto obtém altos rendimentos e boa separação entre compostos em diferentes frações. Como pode ser visto nas Figuras 5.B e 5.C, existe apenas contaminação marginal entre frações bem definidas, com cromatogramas limpos, revelando um enorme potencial a ser explorado em aplicações similares.

Tabela 7 - Recuperação (mg/g) de compostos fenólicos do bagaço de maçã usando diferentes solventes de ativação e extração/eluição. Galico/PcAG: ácido gálico e ácido glucosídeo protocateico; Que-Drv: derivado de quercetina; Que-Rhn: Quercetina ramnosídeo; Pht-Xyl-Glc: floretina xilosil glucosídeo. M-M: adsorvente ativado com metanol e extração/eluição com metanol; M-E: adsorvente ativado com metanol e extração/eluição com etanol; E-E: adsorvente ativado com etanol e extração/eluição com etanol.

Compostos	Recuperação (mg/g)		
	Solvente de Ativação e Extração/Eluição		
	M-M	M-E	E-E
Galico/PcAG	1,867 ^a ± 0,968	2,024 ^a ± 0,134	1,915 ^a ± 0,076
Ácido Clorogênico	0,718 ^a ± 0,176	0,824 ^a ± 0,053	0,862 ^a ± 0,064
Total de Ácidos	2,727 ^a ± 0,352	2,851 ^a ± 0,187	2,786 ^a ± 0,223
Epicatequina	0,115 ^a ± 0,004	0,116 ^a ± 0,011	0,104 ^a ± 0,006
Rutina	0,000^b ± 0,000	0,000^b ± 0,000	0,035^a ± 0,002
Hiperosídeo	0,113 ^a ± 0,005	0,135 ^a ± 0,024	0,135 ^a ± 0,021
Que-Drv #1	0,055 ^a ± 0,001	0,062 ^a ± 0,006	0,065 ^a ± 0,008
Que-Drv #2	0,048 ^a ± 0,000	0,053 ^a ± 0,004	0,051 ^a ± 0,001
Que-Drv #3	0,054^b ± 0,002	0,104^a ± 0,011	0,097^a ± 0,006
Que-Drv #4	0,067^a ± 0,002	0,000^b ± 0,000	0,000^b ± 0,000
Que-Rhn	0,038 ^a ± 0,001	0,118 ^a ± 0,161	0,035 ^a ± 0,000
Pht-Xyl-Glc	0,168 ^a ± 0,004	0,177 ^a ± 0,022	0,169 ^a ± 0,012
Floridzina	0,228 ^a ± 0,018	0,278 ^a ± 0,098	0,309 ^a ± 0,050
Total de Flavonoides	0,895 ^a ± 0,033	0,970 ^a ± 0,111	1,012 ^a ± 0,101

Valores em negrito indicam diferenças significativas (one-way ANOVA) $p < 0,005$; Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (teste de Bonferroni) $p < 0,05$.

6. Comparação com técnicas convencionais

Para avaliar o desempenho do método desenvolvido os resultados foram comparados com os produzidos com diferentes solventes (água, 50-100% de metanol e 50-100% de etanol) e técnicas previamente testados por outros autores (Ignat et al., 2011; Rostagno et al., 2004; Rostagno et al., 2003). Água, etanol e metanol 50%, 80% e 100% (v/v) foram selecionados para fornecer uma resistência intermediária ao solvente, a fim de permitirem a extração simultânea de todos os compostos, apesar de suas diferenças de polaridade e solubilidade nos solventes.

As extrações com ultrassom (US) foram realizadas em banho ultrassônico (P60H, Elmasonic, Singen, Alemanha), operando a 37kHz e 100% da potência do US. As extrações por agitação magnética (Mag-Stir) foram realizadas em um agitador IKA C-MAG (Werke GmbH & Co.KG/Germany), ajustado para a velocidade 3. A agitação foi realizada em um MaxQ 4000 (Thermo Fisher Science, Germering, Alemanha). As extrações com essas técnicas foram realizadas com 1,0 g de amostra e 25 mL de solvente (água, 50% a 100% de etanol e 50% a 100% de metanol). As extrações foram realizadas por 30 min a 60°C. A extração com líquidos pressurizados (PLE) também foi realizada no sistema *Extract-US* sem a coluna de adsorventes. As extrações foram realizadas no modo estático, a uma pressão constante (100 bar), usando as mesmas condições das técnicas convencionais (60°C, 25 mL de solvente, 30 min). Todas as amostras foram centrifugadas, filtradas em um filtro de seringa (nylon, 25 mm, 0,22 µm, Analítica, São Paulo, Brasil) e armazenadas a -20°C antes da análise. Todas as extrações foram realizadas em duplicata.

Como pode ser visto na Figura 7, a PLE-SPE proporcionou recuperação mais alta ou semelhante de ácidos fenólicos e flavonoides do que a maioria das técnicas, independentemente do solvente utilizado. A recuperação de ácidos fenólicos pelo método desenvolvido (que utilizava água e etanol a 100%) foi de 3,69 a 1,45 vezes maior ($p < 0,001$) do que os produzidos por PLE, US, Agitação Magnética e Agitador. O maior volume de água utilizado na primeira etapa do PLE-SPE foi um fator chave influenciador dos resultados, permitindo extrair vários fenólicos do bagaço de maçã (Fernandes et al., 2019; Reis et al., 2012). Para a extração de ácidos fenólicos, os piores resultados foram observados com Shaker e Mag-Stir utilizando etanol 100% como solvente. A água foi relativamente eficiente para a extração de ácidos fenólicos independentemente da técnica utilizada e forneceu resultados semelhantes aos obtidos com 50-80% de EtOH e 50% de

MeOH. Contudo, a maior recuperação de ácidos fenólicos para todas as técnicas convencionais foram obtidas usando 80% de MeOH.

As misturas de metanol e água são consideradas excelentes como solvente para extração de fenólicos, que combinados com uma técnica eficiente de extração, como o ultrassom, fornece altas recuperações, e ilustra a dificuldade de substituí-lo por outro mais barato e ambientalmente compatível. A combinação da técnica e do solvente é particularmente relevante no caso de flavonoides. Como pode ser visto na Figura 7, a água não foi capaz de extrair flavonoides da amostra usando técnicas convencionais. Existem alguns relatos na literatura sugerindo que a água não é eficiente para a extração de flavonoides, principalmente glicosídeos de quercetina, o que está de acordo com nossos resultados (Reis et al., 2012). O método PLE-SPE proporcionou maior recuperação de flavonoides do que a maioria das técnicas usando 80%, 100% EtOH e 100% MeOH ($p < 0,001$), mas as diferenças entre todas as técnicas não foram estatisticamente significativas quando se utilizou 50% de EtOH. É essencial destacar que a combinação de US e 80% de MeOH permitiu obter uma recuperação mais alta de flavonoides do que o método desenvolvido. Também é importante indicar que o US forneceu a maior variação dos resultados entre todas as técnicas, que pode estar relacionado à presença de menor energia nos pontos do banho ultrassônico e propagação irregular de ondas ultrassônicas. Devido a essas variações, as diferenças entre os US e o PLE-SPE não foram estatisticamente diferentes. Em geral, o US forneceu os melhores resultados entre as técnicas convencionais, mas o rendimento de todas as técnicas depende do solvente utilizado.

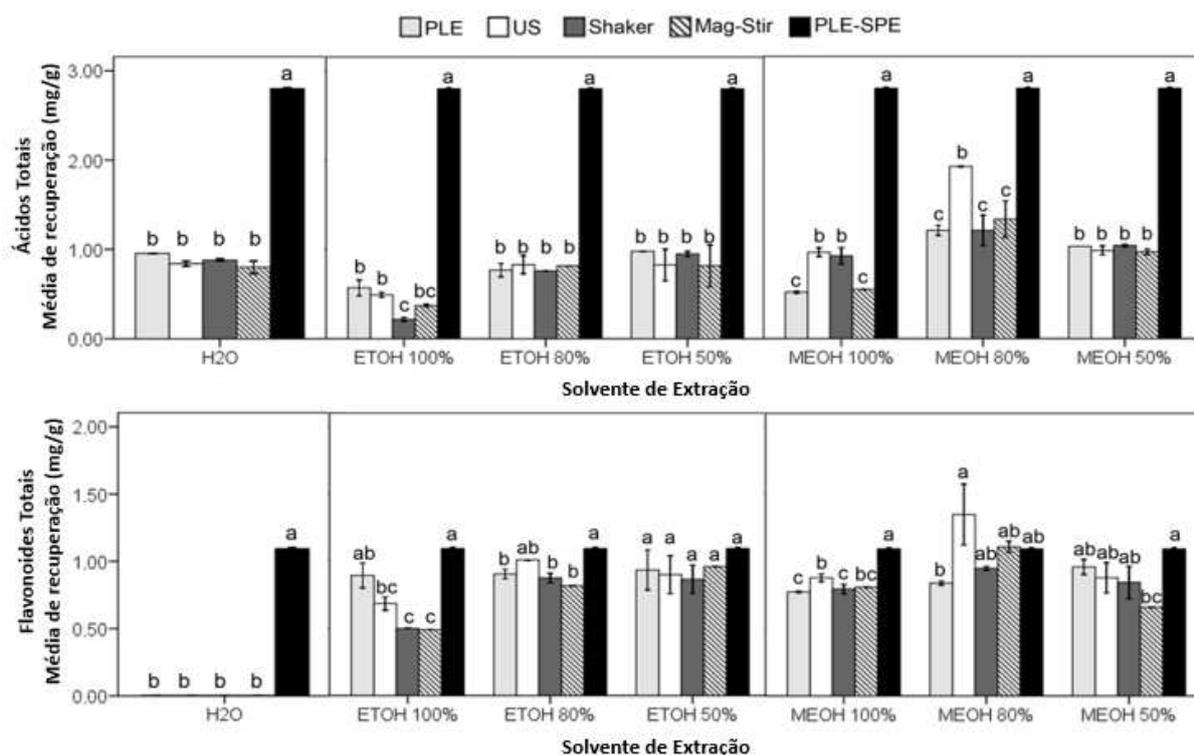


Figura 7 - Comparação da recuperação (mg/g) de ácidos fenólicos e flavonoides produzidos pelo método desenvolvido (PLE-SPE) e os obtidos com diferentes técnicas convencionais (PLE: extração líquida pressurizada; US: extração assistida por ultrassom; Mag-Agitação: agitação magnética) e solventes (água, etanol, metanol e misturas com água). Letras diferentes no mesmo solvente indicam diferenças significativas (teste de Bonferroni) $p < 0,05$ quando comparadas com o método desenvolvido (PLE-SPE).

Nesse contexto, os dados sustentam nossa hipótese e indicam um excelente desempenho do método desenvolvido, quando comparado à outras técnicas. Além das altas recuperações com solventes verdes, foi possível separar compostos em diferentes frações e obter cromatogramas limpos, eliminando a necessidade de processos de pós-extração, como centrifugação e concentração, protegendo a amostra de luz e oxigênio, e prevenindo a degradação de compostos (Azmir et al., 2013; Rostagno et al., 2010; Lijun Wang & Weller, 2006). Além disso, é relevante ressaltar que é possível combinar ultrassom e um gás de expansão com PLE, o que poderia acelerar o processo e melhorar a recuperação e maximizar o rendimento, conforme sugerido por outros estudos (Santos et al., 2019; Sumere et al., 2018).

Conclusão

Os dados fornecidos em todos os experimentos confirmam os benefícios do método PLE-SPE *online* para extração e fracionamento simultâneos de compostos fenólicos de produtos naturais. No entanto, dependendo da compostos alvo, será necessário selecionar cuidadosamente as condições de extração/eluição para produzir altas recuperações. Além disso, o uso de um gradiente de água para o solvente orgânico também pode permitir separação entre diferentes flavonoides, e é uma área promissora de pesquisa. Os adsorventes convencionais revelaram resultados surpreendentemente bons quando comparados a adsorventes poliméricos, com desempenho consistentemente superior em termos de recuperação de compostos alvo. A maioria dos compostos foi retida adequadamente por adsorventes convencionais, permitindo a separação e recuperação em frações distintas, com maior desempenho relacionado ao adsorvente Septra. A temperatura não foi um parâmetro significativo que afetasse o processo, possivelmente devido ao processo de extração dinâmica usando diferentes solventes, com diferentes polaridades. Os resultados também sugerem que o etanol pode ser usado como uma alternativa ao metanol para a extração/eluição. O método desenvolvido permitiu a separação de compostos fenólicos em diferentes frações, ao mesmo tempo em que fornece uma recuperação mais alta do que a maioria dos métodos convencionais. As excelentes recuperações sugerem que a proposta de combinar PLE com extração em fase sólida utilizando solventes “verdes” em um processo de duas etapas de extração/fracionamento, pode ser explorado para processos analíticos, produção inicial de padrões analíticos ou mesmo para a produção de extratos a serem utilizados pelos alimentos e indústria farmacêutica.

Referências Bibliográficas

- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Baskaran, R., Pullencheri, D., & Somasundaram, R. (2016). Characterization of free, esterified and bound phenolics in custard apple (*Annona squamosa* L) fruit pulp by UPLC-ESI-MS/MS. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.001>
- Esteki, M., Shahsavari, Z., & Simal-Gandara, J. (2019). Food identification by high performance liquid chromatography fingerprinting and mathematical processing. *Food Research International*, *122*, 303–317. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.025>
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>
- Fernandes, P. A. R., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. G. C., Nunes, F. M., Bastos, R., Coelho, E., Wessel, D. F., Coimbra, M. A., & Cardoso, S. M. (2019). Revisiting the chemistry of apple pomace polyphenols. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.006>
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. In *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules15128813>
- Gómez Caravaca, A. M., Carrasco Pancorbo, A., Cañabate Díaz, B., Segura Carretero, A., & Fernández Gutiérrez, A. (2005). Electrophoretic identification and quantitation of compounds in the polyphenolic fraction of extra-virgin olive oil. *Electrophoresis*. <https://doi.org/10.1002/elps.200500202>
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. In *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>
- Kalinowska, M., Bielawska, A., Lewandowska-Siwkiewicz, H., Priebe, W., & Lewandowski, W. (2014). Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry*, *84*, 169–188. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.09.006>
- Kamal, M., & Karoui, R. (2015). Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *46*(1), 27–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.007>
- Liaqid, A., Palma, M., Brigui, J., & Barroso, C. G. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, *1140*(1–2), 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.040>

- Manchón, N., D'Arrigo, M., García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Ramos, A., Martínez, J. A., & Rostagno, M. A. (2010). Fast analysis of isoflavones by high-performance liquid chromatography using a column packed with fused-core particles. *Talanta*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.08.050>
- Manchón, Noelia, Mateo-Vivaracho, L., Darrigo, M., GARCÍA-LAFUENTE, A., Guillamón, E., Villares, A., & Rostagno, M. A. (2013). Distribution patterns of polyphenols and alkaloids in instant coffee, soft and energy drinks, and tea. *Czech Journal of Food Sciences*.
- Mari, A., Tedesco, I., Nappo, A., Russo, G. L., Malorni, A., & Carbone, V. (2010). Phenolic compound characterisation and antiproliferative activity of “Annurca” apple, a southern Italian cultivar. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.023>
- Milić, B., Stojanović, S., Vučurević, N., & Turčić, M. (1968). Chlorogenic and quinic acids in sunflower meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740190211>
- Palma, M., Piñeiro, Z., & Barroso, C. G. (2002). In-line pressurized-fluid extraction-solid-phase extraction for determining phenolic compounds in grapes. *Journal of Chromatography A*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00823-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00823-3)
- Réblová, Z. (2012). Effect of temperature on the antioxidant activity of phenolic acids. *Czech Journal of Food Sciences*.
- Reis, S. F., Rai, D. K., & Abu-Ghannam, N. (2012). Water at room temperature as a solvent for the extraction of apple pomace phenolic compounds. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.068>
- Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2004). Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans. *Analytica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.05.078>
- Rostagno, M.A., D'Arrigo, M., Martínez, J. A., & Martínez, J. A. (2010). Combinatory and hyphenated sample preparation for the determination of bioactive compounds in foods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(6), 553–561. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.02.015>
- Rostagno, M A, Manchón, N., D'Arrigo, M., Guillamón, E., Villares, A., García-Lafuente, A., Ramos, A., & Martínez, J. A. (2011). Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. *Analytica Chimica Acta*, 685(2), 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.11.031>
- Rostagno, Mauricio A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01184-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01184-1)
- Rostagno, Mauricio A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2005). Solid-phase extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.04.045>
- Santos, M. P., Souza, M. C., Sumere, B. R., da Silva, L. C., Cunha, D. T., Bezerra, R. M. N., & Rostagno, M. A. (2019). Extraction of bioactive compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.) with pressurized liquids assisted by ultrasound combined with an expansion gas. *Ultrasonics Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.02.021>

- Simpson, N. (1991). Solid-phase extraction - Principles, Techniques and Applications. In *Acta chemica Scandinavica (Copenhagen, Denmark : 1989)*. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.45-1047>
- Sumere, B. R., de Souza, M. C., dos Santos, M. P., Bezerra, R. M. N., da Cunha, D. T., Martinez, J., & Rostagno, M. A. (2018). Combining pressurized liquids with ultrasound to improve the extraction of phenolic compounds from pomegranate peel (*Punica granatum L.*). *Ultrasonics Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.05.028>
- Treutter, D. (2001). Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1023/A:1013378702940>
- Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. In *Trends in Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>

CAPÍTULO 3:

EXTRAÇÃO EM GRADIENTE, PURIFICAÇÃO *INLINE* E ANÁLISE *ONLINE* DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO SUBPRODUTO INDUSTRIAL DA MAÇÃ

A escolha do solvente no processo de extração é fundamental para um bom rendimento da extração de compostos alvo da amostra. Em amostras que possuem diversas classes de compostos, como o subproduto industrial da maçã, a mistura de solventes com diferentes polaridades é comumente utilizada em processos de extração. O gradiente de solventes é uma alternativa para o processo de extração por que explora justamente as diferentes polaridades de solventes enquanto acontece o processo de extração, garantindo o melhor aproveitamento do processo e maior rendimento de compostos alvo.

Este capítulo trata do desenvolvimento de um método de extração de compostos bioativos do subproduto da industrialização da maçã com gradientes de solventes (água e etanol) utilizando extração com líquidos pressurizados acoplado em linha com extração em fase sólida e *online* com HPLC (2D-PLE-SPE-HPLC-PDA). Assim, o equipamento utilizado no trabalho permite que ao mesmo tempo que aconteça o processo de extração com gradiente de solvente por PLE, ocorra a purificação simultânea da amostra em diferentes classes de compostos distribuídas em frações isoladas e o monitoramento em tempo real do processo de extração.

É importante ressaltar que o equipamento com o sistema bidimensional de extração e análise de compostos possui patente já depositada no INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial: “Sistema bidimensional para a extração, purificação e análise de compostos bioativos” (Patente: Privilégio de Inovação em período de sigilo. Número do registro: BR1020200172387. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 24/08/2020. Instituição(ões) financiadora(s): FAPESP) e “Processo de separação de compostos provenientes de matrizes vegetais com detecção em linha” (Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1320210151691. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 30/07/2021) (Anexo 4).

1. Extração por Líquidos Pressurizados (PLE) aplicando gradientes de solventes

Para o desenvolvimento deste trabalho o bagaço de maçã (*Malus domestica* Borkh) foi obtido da empresa Macçã Desidratados e Congelados (Fraiburgo, SC, Brasil). A amostra foi recebida desidratada e, no laboratório, foi triturada e peneirada. A fração retida em 32 MESHs (Bertel Indústria Metalúrgica Ltda.) foi separada e armazenada a -20 °C até ser utilizada nos processos de extração

A PLE foi realizada em um equipamento *home-made* capaz de realizar PLE acoplada em linha com SPE e monitoramento *online* da composição química do extrato por HPLC. O sistema também oferece flexibilidade de trabalho apenas com PLE, PLE-SPE, apenas HPLC ou PLE-SPE-HPLC. O equipamento (2D-PLE-SPE-HPLC-PDA) permitiu a análise bidimensional abrangente de amostras complexas e foi previamente descrito e validado por Viganó et al. (2021). Um diagrama representativo do 2D-PLE-SPE-HPLC-PDA é mostrado na Figura 9. Resumidamente, o sistema consiste em duas dimensões; no primeiro, os compostos são extraídos com gradiente de solvente (PLE-SPE), e no segundo, há separação por HPLC e detecção por PDA.

Ao contrário do PLE tradicional, em que um solvente ou mistura de solventes é utilizado isocraticamente durante todo o período de extração, neste trabalho a composição do solvente foi variável durante a extração. Cinco gradientes de solventes diferentes (A: água e B: etanol) foram formulados automaticamente pelo equipamento: Método A (0-100 min, 100% A; 100-160 min, 100% B), Método B (0-75min, 100 % A; 100-160 min, 100% B), Método C (0-50 min, 100% A; 100-160 min, 100% B), Método D (0-25 min, 100% A; 100-160 min, 100% B), Método E (0 min, 100% A; 100-160 min, 100% B) (Figura 11). Os cinco diferentes métodos de extração por gradiente de solvente foram avaliados a 40 °C a fim de escolher o método mais eficiente para extrair os compostos alvo (ácidos fenólicos, furfurais e flavonoides). Adicionalmente, o efeito da temperatura (40-80 °C) e o tempo estático de extração (0-30 min) foram avaliados em etapas posteriores, mantendo o gradiente de solvente fixo.

O seguinte procedimento operacional foi realizado para cada experimento PLE: A amostra sólida (6 g) foi colocada dentro da célula de extração com esferas de vidro (5 g) e lã de vidro (0,5 g) para preencher o volume livre da célula e filtrar o extrato. Em seguida, o sistema foi pressurizado a $10 \pm 0,5$ MPa, a temperatura foi ajustada (40-80 °C) e o tempo de extração estática foi iniciado (0-30 min). Em seguida, o processo de extração

iniciou-se automaticamente, mantendo a pressão ($10 \pm 0,5$ MPa) e o fluxo de solvente constantes (1 mL/min). A cada 16 minutos, uma fração foi coletada, totalizando 10 frações de 16 mL. Todas as extrações foram realizadas em triplicata, e as amostras foram coletadas em tubos falcons (50 mL), filtradas com filtro de seringa de nylon (nylon, 25 mm, $0,22 \mu\text{m}$, Analítica, São Paulo, Brasil), e armazenadas em frascos de vidro âmbar a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ para análise *offline* adicional.

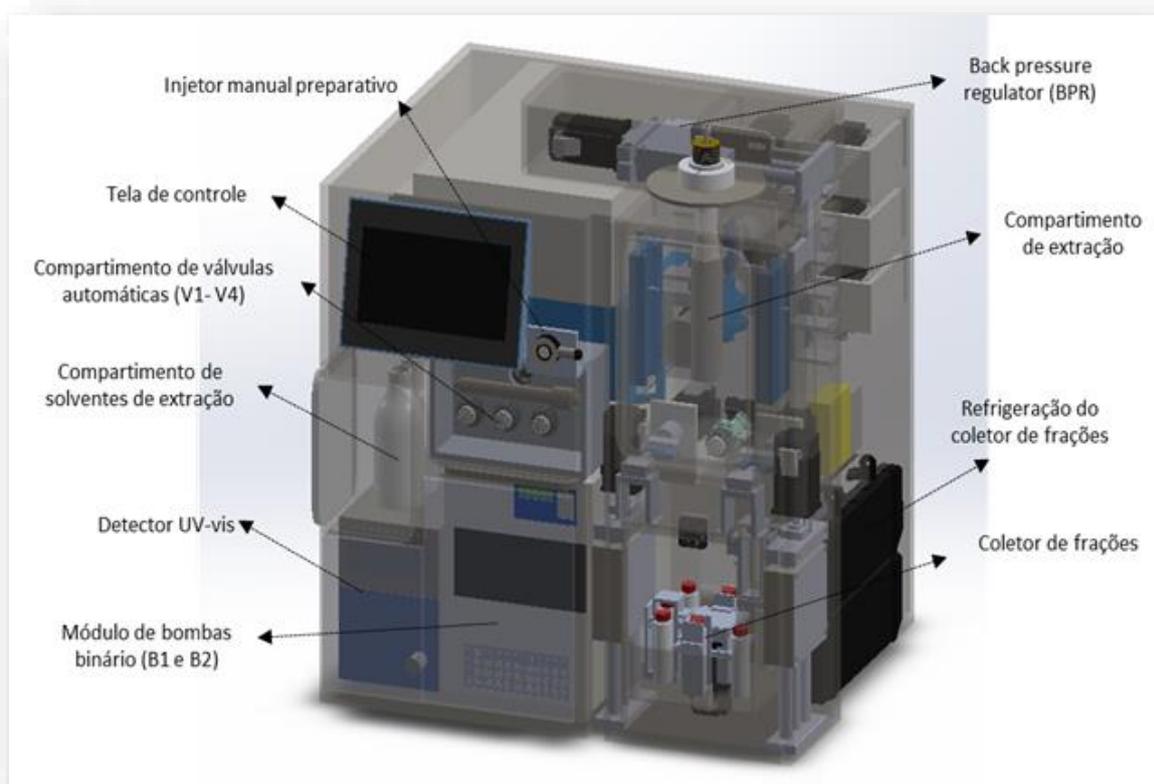


Figura 8 – Sistema bidimensional de extração e análise de compostos bioativos.

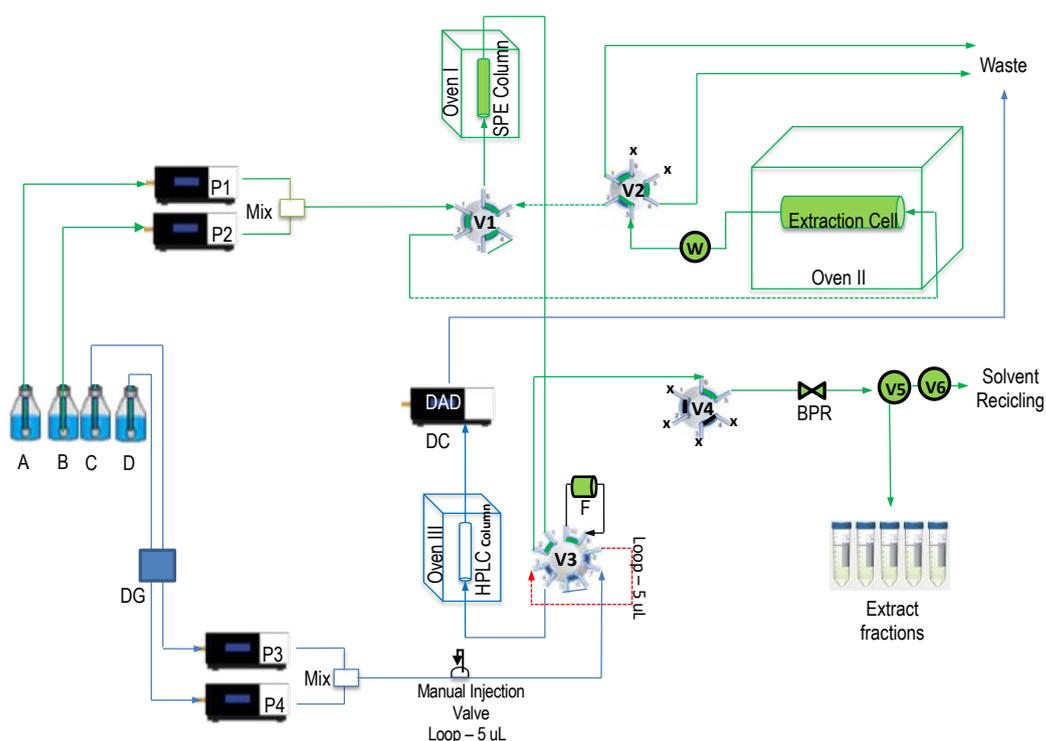


Figura 9. Diagrama de configuração do sistema PLE-SPE-HPLC-PDA 2D. A, B, C e D: reservatórios de solventes; P1 e P2: bombas binárias (PLE-SPE); P3 e P4: bombas binárias do sistema de análise (HPLC); DG: desgaseificador; DC: detector; W: trocador de aquecedor; V1: válvula de seleção; V2: válvula de despressurização; V3: válvula de interface; V4: válvula de pressurização automática; V5 e V6: válvulas coletoras de frações; BPR: válvula de contrapressão; F: filtro; Forno I: forno para coluna SPE; Forno II: forno para célula de extração (PLE-SPE); Forno III: forno cromatográfico (HPLC). Verde: módulo de extração. Azul: HPLC módulo. Fonte: Viganó et al. (2021).

2. Processo integrado: 2D-PLE-SPE-HPLC-PDA

A PLE aplicando o método de gradiente de solvente selecionado foi acoplada em linha com SPE e *online* com HPLC-PDA. Desta forma, a extração/purificação foi monitorada *online*, com o PLE ocorrendo simultaneamente e automaticamente com a análise por HPLC.

Para o processo 2D-PLE-SPE-HPLC-PDA, o adsorvente (0,5 g) foi embalado em uma coluna SPE e aquecido a 40°C. A ativação do adsorvente foi realizada passando 30 mL de etanol e o condicionamento passando 30 mL de água, ambos a 3 mL/min. Em seguida, a célula de extração foi preparada conforme descrito na Seção 1, e o processo de

extração foi iniciado. O forno de extração foi aquecido a 80°C e o tempo de extração estático (20 min) foi contado. Em seguida, iniciou-se o período de extração dinâmica com fluxo de solvente de 1 mL/min. Semelhante ao descrito na anterior, 10 frações contendo 16 mL foram coletadas. Durante o processo de extração, o sistema realizou automaticamente 10 injeções no módulo HPLC; a primeira ocorreu aos 8 min do período de extração dinâmica, e as seguintes foram repetidas a cada 16 min. As extrações foram realizadas em triplicata e as frações foram coletadas e armazenadas conforme também descrito na Seção 1.

As frações do extrato foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no sistema bidimensional. O equipamento permite que o HPLC opere *online* e *offline*, ou seja, injeções manuais (*offline*) e injeções automáticas durante a extração (*online*). A coluna utilizada para separar os compostos foi a Kinetex C18 (2,6 µm, 100 Å, 100 × 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, EUA), mantida a 48 °C. A fase móvel do método de análise foi composta por água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos acidificados com ácido acético 0,1%. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 1,1 mL/min, e o gradiente compreendeu: 0 min, 5% B; 2 min, 9% B; 4 min, 13% B; 5 min, 15% B; 6 min, 18% B; 7 min, 20% B; 8 min, 25% B; 10 min, 5% B. O tempo de equilíbrio foi de 6 minutos e as injeções foram realizadas com um volume de 10 µL. Os picos foram identificados e integrados em 260nm, 280nm e 350nm. A identificação dos compostos foi realizada comparando-se o tempo de retenção dos padrões analíticos, espectro UV-Vis de cada composto e coeluição da amostra com padrões autênticos. A curva de calibração (7 pontos: 0,1–100,0 mg/L) foi preparada plotando concentração *versus* área de pico. A quantificação dos compostos conhecidos foi realizada a partir da curva de calibração de cada composto. Ácidos fenólicos não identificados foram quantificados por equivalência de furfural e flavonoides não identificados foram quantificados por equivalência de rutina.

O métodos em gradiente PLE-SPE-HPLC foi comparado à técnicas convencionais de extração. A extração assistida por ultrassom (UAE) (P60H, Elmasonic, Singen, Alemanha) a 37 kHz e 100% de potência, e extração em agitador magnético (Mag-Stir) IKA C-MAG (Werke GmbH & Co.KG/Alemanha) foram realizado com 6 g de amostra, 25 mL de etanol 80% (v/v) como solvente, por 30 min a 80 °C. Além dessas duas técnicas, foi realizado PLE sem SPE e monitoramento online em HPLC. A montagem da célula de extração foi semelhante ao descrito na Seção 1, com 6 g de amostra, pressão de 10 ± 0,5 Mpa, temperatura ajustada em 80 °C e tempo estático ajustado em 20 minutos. Todas as

extrações foram realizadas em triplicata, centrifugadas, filtradas com filtro de seringa (nylon, 25 mm, 0,22 μm , Analítica, São Paulo, Brasil) e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise em HPLC.

Todos os resultados foram avaliados utilizando one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Foi considerado um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). As análises foram realizadas no software Jamovi.

3. Identificação dos compostos alvo

A caracterização prévia do subproduto industrial da maçã foi realizada por meio de extração por UAE e análise por HPLC, conforme descrito nas Seções 1 e 2, respectivamente. Esta etapa teve como objetivo desenvolver o método cromatográfico e identificar os analitos alvo. A Figura 10 mostra o cromatograma representativo do extrato de bagaço de maçã com a identificação dos compostos alvo. Os compostos mais polares são mostrados na Figura 10(A), e a Figura 10(B) apresenta os flavonoides. Os seguintes compostos foram identificados: furfural (λ_{max} : 284 nm; rt: 2,73 min; Pico #1), hidroximetilfurfural (HMF) (λ_{max} : 276 nm; rt: 3,28 min; Pico #2), ácido clorogênico (λ_{max} : 325 nm ; rt: 4,58 min; Pico #3), rutina (λ_{max} : 354,1 nm; rt: 7,81 min; Pico #6), floridzina (PLD) (λ_{max} : 284,1 nm; rt: 9,32 min; Pico #11) e seis outros flavonoides não identificados (Pico #4; rt: 7,05 min), (Pico #5; rt: 7,64min), (Pico #7; rt: 7,94 min), (Pico #8; rt: 8,34 min), (Pico #9; rt : 8,63 min), (Pico #10; rt: 8,88 min).

Os compostos identificados na amostra correspondem aos já descritos na literatura. HMF e furfural, embora não sejam compostos fenólicos, são originários da reação de Maillard e estão amplamente presentes em vegetais desidratados como os resíduos industriais (Evrendilek et al., 2017; Filiz & Seydim, 2018). A classe dos ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido clorogênico, assim como os flavonoides (rutina e PLD), também são comumente encontrados em maçãs e seus derivados (Lyu et al., 2020). É importante ressaltar que o caráter de cada amostra também depende da cultivar, ambiente de plantio, colheita, armazenamento da amostra e método de quantificação e identificação da amostra (Kalinowska et al., 2014).

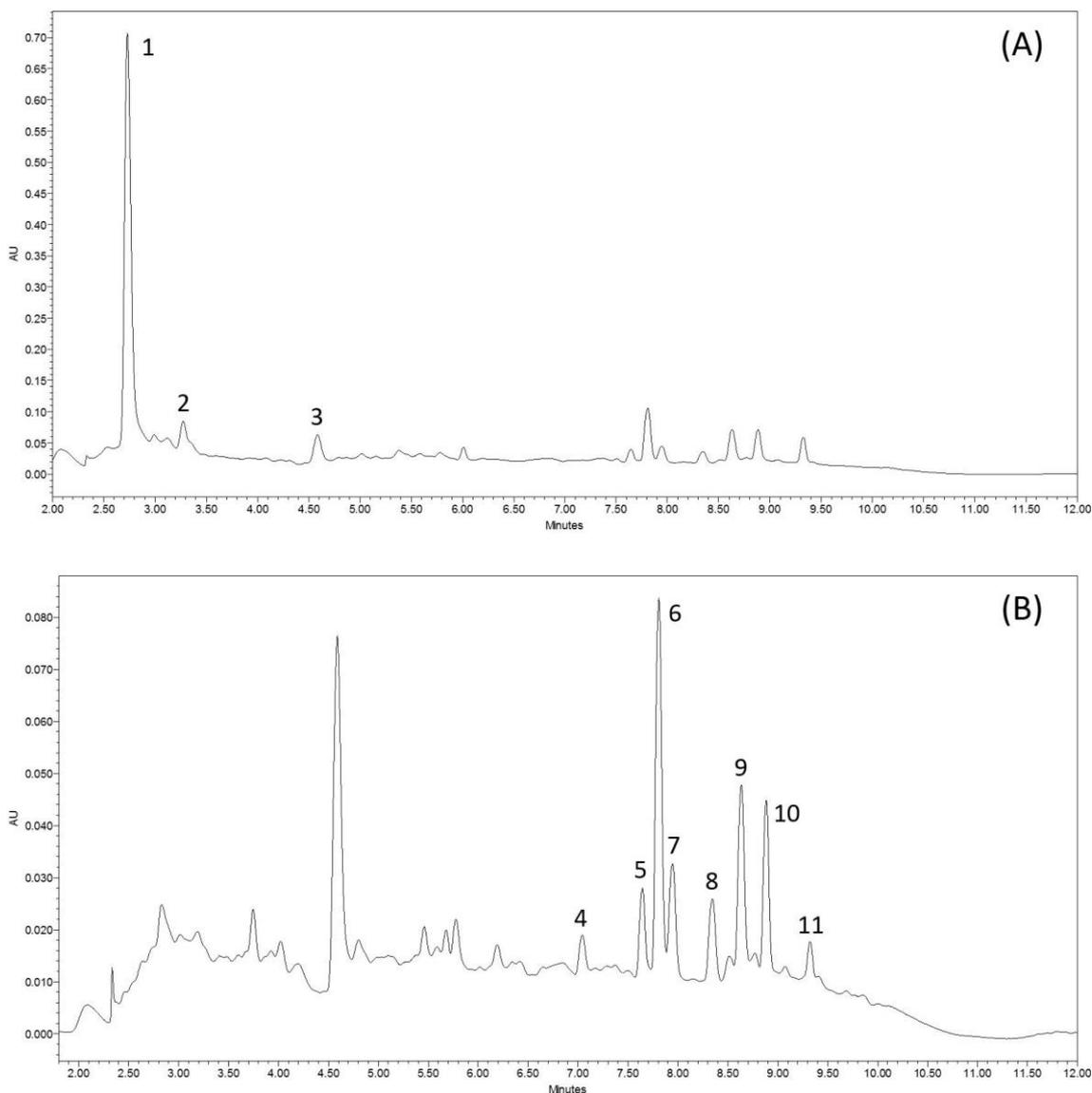


Figura 10 - Cromatogramas representativos do extrato do subproduto industrial da maçã obtido por HPLC-PDA: (A) compostos polares a 260 nm; (B) flavonoides a 350 nm. Pico #1: Furfural; Pico #2: HMF; Pico #3: Ácido Clorogênico; Pico #6: Rutina; Pico #11: PLD; Picos #4, #5, #7, #8, #9, #10: flavonoides não identificados.

Empregando sistemas como HPLC e UPLC, com altas pressões de fase móvel e colunas mais curtas ou empacotadas com partículas de núcleo fundido, existe a possibilidade de encurtar os métodos de análise (Gumustas et al., 2013). Os métodos de análises curtas são alternativas eficientes para maior resolução cromatográfica do processo bidimensional por que permitem injeções sucessivas durante o processo de extração com monitoramento *online*, resultando em uma separação analítica mais detalhada na primeira dimensão. Além disso, um perfil cromatográfico mais definido (segunda dimensão) da amostra fornece informações mais específicas sobre como cada composto se comporta durante a extração (Rostagno et al., 2011). O método

cromatográfico desenvolvido descrito neste trabalho possui 16 minutos, pois é próprio para HPLC. Se o sistema 2D-PLE-SPE-HPLC-PDA fosse composto por um UPLC, o tempo de análise ainda menor poderia ser alcançado, resultando em um cromatograma 3D mais resolutivo. Por exemplo, dez injeções automáticas foram realizadas durante os 160 minutos do processo de extração, o que é um número razoável; porém, se o tempo de análise fosse reduzido à metade, seriam possíveis 20 injeções, resultando em um cromatograma 3D ainda mais detalhado.

4. Efeitos dos métodos em gradiente de solvente em PLE

Inicialmente, cinco métodos de extração com gradientes de solventes foram formulados para modular a composição do solvente ao longo da PLE e, conseqüentemente, alterar a polaridade do solvente, resultando em diferentes interações entre solvente e classes de analitos presentes no bagaço de maçã. Os cinco métodos desenvolvidos possuem a mesma quantidade de água e etanol nos pontos inicial (0 min) e final (160 min), mas diferem no gradiente de solvente em função do tempo de extração. Assim, como pode ser visto na Figura 11, a transição entre 100% A (água) e 100% B (etanol) ocorre de forma diferente nos cinco métodos.

Em amostras complexas, como bagaço de maçã industrial, diferentes classes de analitos interagem de diferentes maneiras com diferentes solventes. Ácidos fenólicos, furfural e HMF são moléculas mais polares, facilmente extraídas em meio aquoso. Os flavonoides, por sua vez, possuem polaridade moderada e, portanto, são extraídos em meios menos polares e na presença de solventes orgânicos, como o etanol. Os métodos desenvolvidos foram estudados para identificar qual dentre os cinco gradientes melhor recupera os analitos alvo do bagaço de maçã.

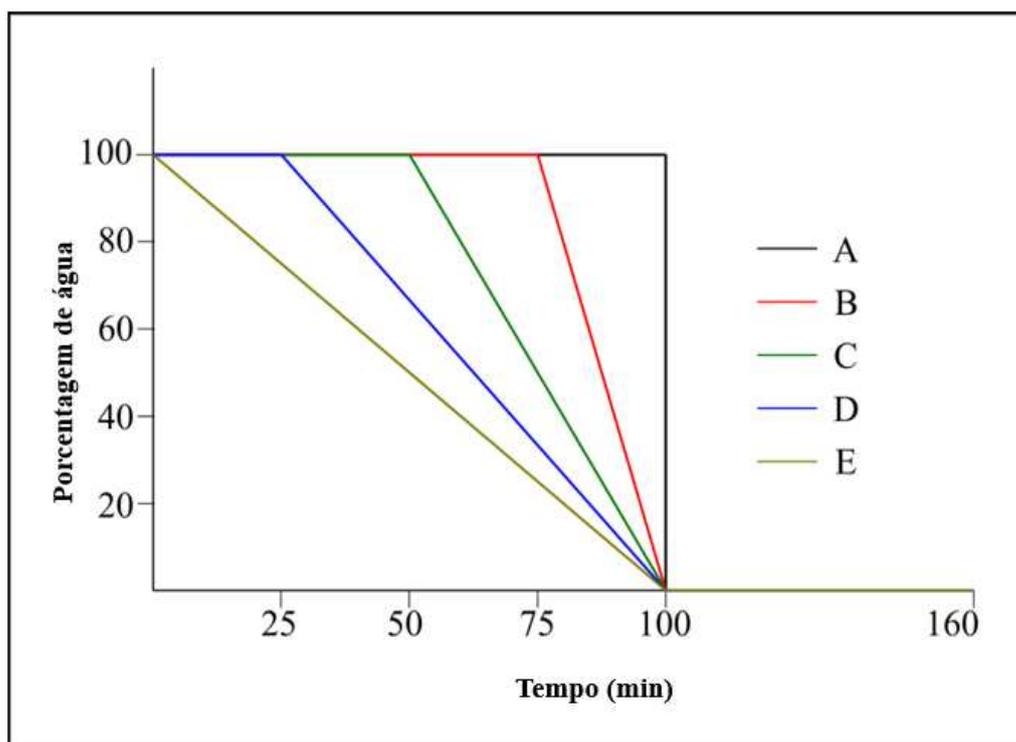


Figura 11 - Representação gráfica dos métodos de gradiente de solvente PLE (A-E) em função do tempo (min): porcentagem de água em uma solução binária com etanol.

A Figura 12 mostra os rendimentos dos compostos alvo (soma de todas as frações coletadas), em que o efeito dos métodos pode ser observado. O método E produziu compostos polares significativamente menores (furfurais e ácido clorogênico), que apresentaram rendimentos estatisticamente iguais nos métodos A, B, C e D. Em relação aos compostos de polaridade relativa (flavonoides e PLD), os métodos D e E mostraram-se estatisticamente iguais e rendimentos maiores que os métodos A, B e C. Portanto, como o método D resultou em rendimentos maiores para ambos os grupos, foi escolhido para ser utilizado nas etapas seguintes deste trabalho.

O método D tem um recurso interessante; possui o menor tempo de vazão de água e maior tempo de gradiente entre os métodos testados; a água é utilizada até aproximadamente os primeiros 25 min de extração e, de 25 a 100 min, o sistema opera com uma mistura linear crescente de etanol em água. Essa característica provavelmente influenciou nos maiores rendimentos de extração dos grupos mostrados na Figura 12. Os resultados corroboram com os encontrados na literatura, indicando que a água é um solvente adequado para a extração de furfural e ácidos fenólicos, bem como soluções com

maior teor de solventes orgânicos (70%) têm maior recuperação para flavonoides, como rutina (Oreopoulou et al., 2019).

Além disso, as misturas de solventes em contato com a matriz atuam como emolientes e proporcionam uma quebra nas estruturas das membranas das células vegetais, aumentando a permeabilidade dos analitos no meio. A maior interação química devido à similaridade de polaridade entre solvente e composto também é essencial para garantir um maior rendimento de extração. Nesse sentido, alterando a proporção de solvente aquoso para orgânico, é possível alterar a polaridade do meio e a interação da matriz com o solvente, aumentando o rendimento final da extração (Panja, 2018), o que é muito importante para obter extrações quantitativas.

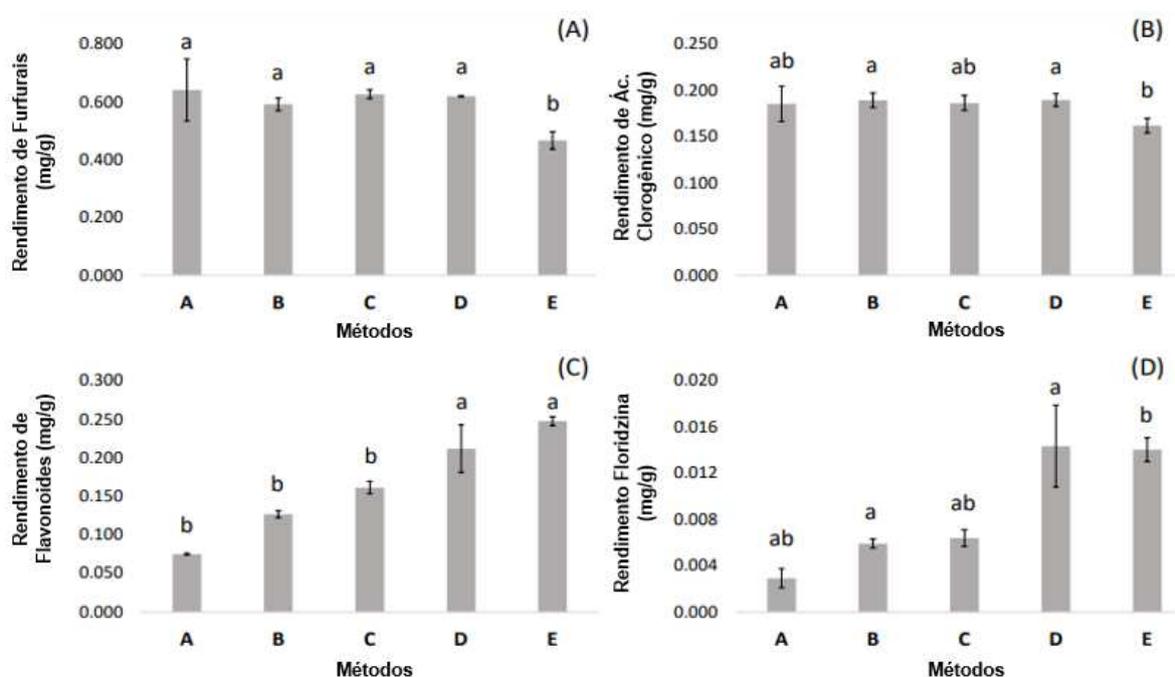


Figura 12 - Comparação de métodos PLE com gradiente de solvente a 40 °C e 160 min de extração: impacto nos compostos alvo do extrato do subproduto industrial da maçã. (A) rendimento de furfurais; (B) rendimento de ácido clorogênico; (C) rendimento de flavonoides; (D) rendimento de PLD. O mesmas letras nas barras indicam nenhuma diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$).

5. Efeito do tempo estático e temperatura na PLE

O tempo estático de extração em PLE é definido pelo tempo em que a amostra sólida e o solvente estão em contato nas condições do experimento, mas sem fluxo de solvente. Em processos de extração dinâmicos, o tempo estático é uma etapa crítica de três pontos de vista. Primeiro, identificar o tempo estático suficiente para saturar o solvente com o extrato é importante para maximizar a ação do solvente, reduzindo o tempo dinâmico. Em segundo lugar, o tempo estático afeta o tempo total do processo; portanto, evitar seu excesso permite maior rapidez na obtenção do resultado e reduz o custo de operação. Por outro lado, o tempo estático é relevante na extração de compostos bioativos, como os fenólicos. Pode ser positivo dependendo da classe de compostos e das condições adotadas durante este período. A exposição da amostra ao solvente pode ser positiva e aumentar a permeabilidade dos compostos no meio extrativo devido à interação do solvente com a matriz, ou negativa quando o tempo de contato dos compostos no meio líquido permite a degradação ou oxidação de compostos. Nesse sentido, encontrar o tempo otimizado para a maior recuperação dos compostos alvo é um fator chave na PLE, tanto para fins analíticos, quanto de processamento industrial.

A PLE com o método com gradiente de solventes “D” foi adotada e o tempo estático variado (0, 10, 20 e 30 min). A Figura 13 mostra que o tempo de contato da amostra com o solvente é uma variável a ser considerada, pois há uma diferença significativa entre os tempos estudados para as classes que adotamos como alvo. O tempo estático de 30 minutos resultou no maior rendimento dos compostos polares (furfural e ácido clorogênico), seguido de 20 minutos. No entanto, este mesmo tempo apresentou redução no rendimento de flavonoides e PLD, que apresentou rendimentos máximos em 20 minutos de tempo estático. Esses resultados revelam que o intumescimento da amostra e o equilíbrio químico entre sólido e solvente são fatores importantes e dependentes do tempo. Com base nisso, adotamos um tempo estático de 20 minutos para as etapas seguintes do trabalho.

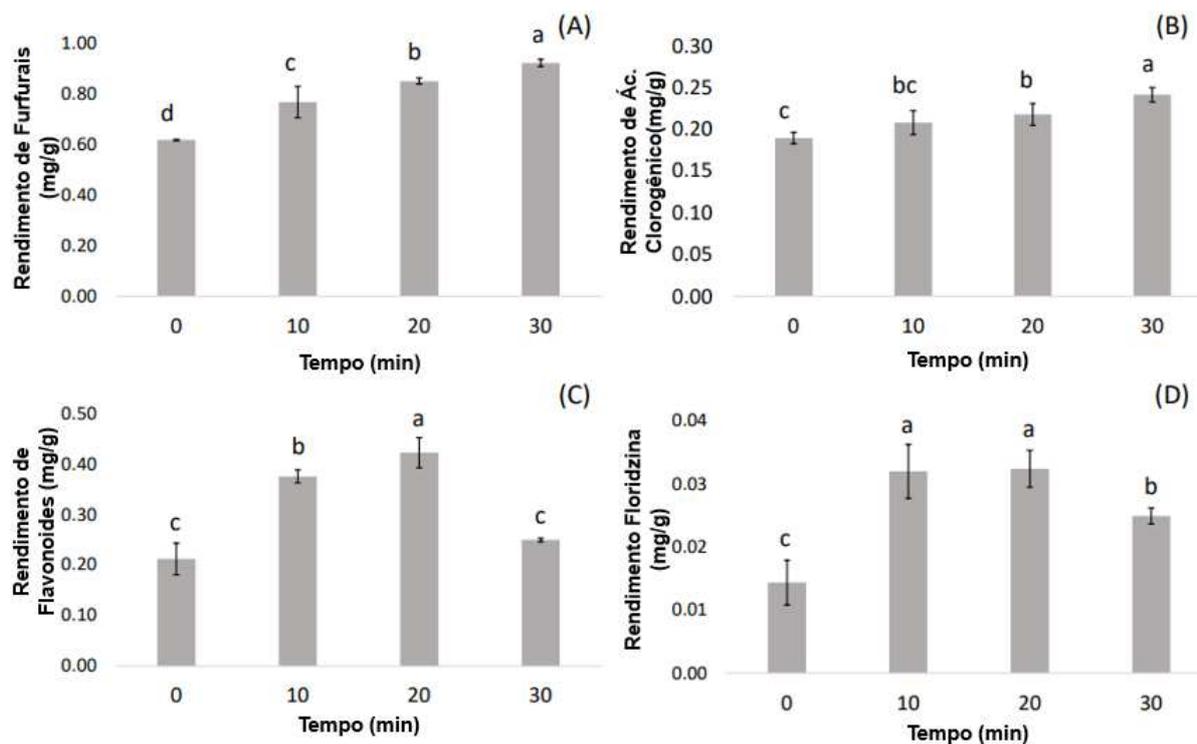


Figura 13 - Efeito do tempo estático de PLE com o método D, a 40 °C, no rendimento de compostos alvo do extrato de bagaço de maçã: furfurais (A), ácido clorogênico (B), flavonoides (C) e PLD (D). As mesmas letras nas barras não indicam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$).

É bem relatado na literatura que a temperatura de extração é uma variável com um impacto substancial no rendimento da extração e na concentração do extrato. O aumento da temperatura melhora a interação matriz-solvente, a transferência de massa e a taxa de extração devido à solubilização do extrato, ruptura entre as ligações soluto-matriz, diminuição da viscosidade do solvente e redução da tensão superficial (Viganó et al., 2022). Por outro lado, o aumento da temperatura pode degradar compostos termossensíveis (Garcia-Mendoza et al., 2017). Nesse sentido, temperaturas entre 40 e 80°C foram testadas para aprimorar o método PLE em desenvolvimento. Os dados foram avaliados cineticamente, conforme mostrado na Figura 14.

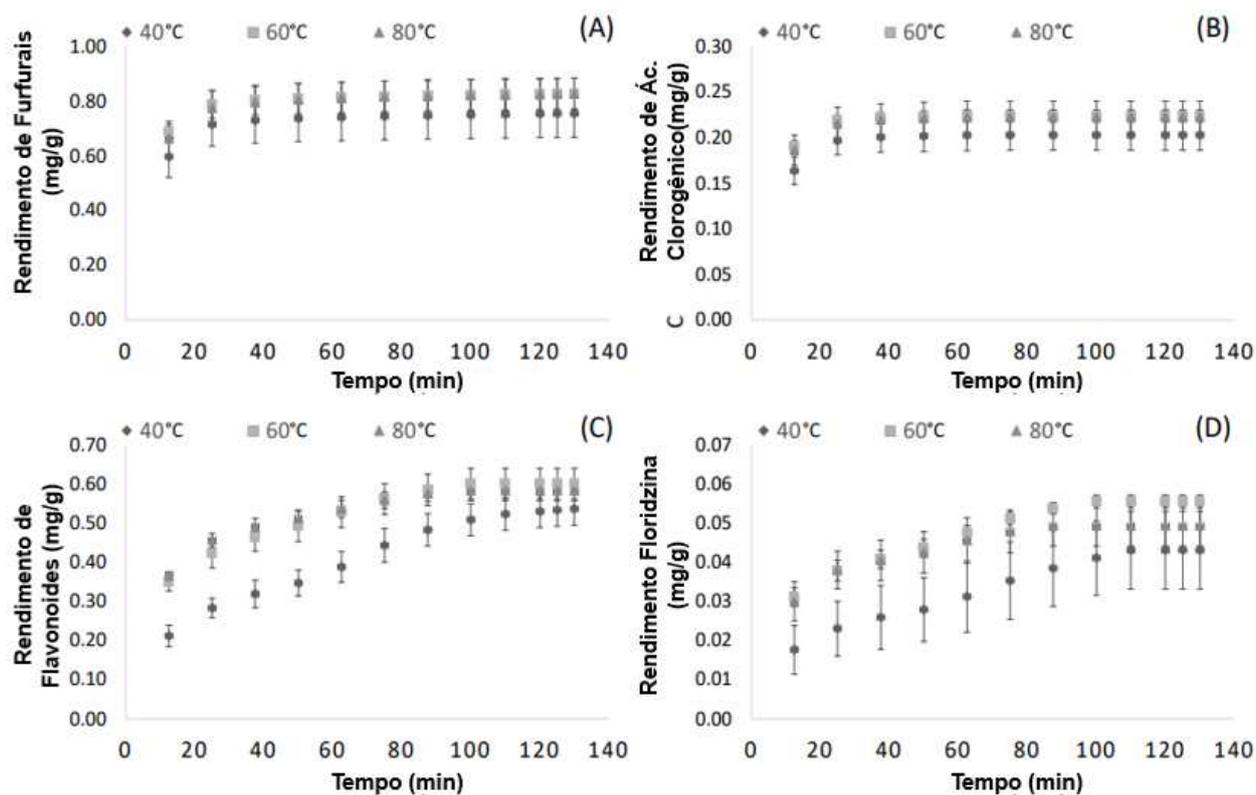


Figura 14 - Curvas cinéticas das diferentes temperaturas do PLE usando o método D e 20 min de tempo estático de extração, referente ao rendimento dos compostos alvo do bagaço de maçã: furfurais (A); ácido clorogênico (B); flavonoides (C); PLD (D).

A temperatura, neste caso, não aparece como fator determinante na recuperação final dos analitos da amostra, pois não houve diferença significativa entre as temperaturas testadas. No entanto, as curvas cinéticas demonstram um comportamento que reforça a importância do gradiente de solvente e o bom funcionamento do SPE no método. O período de extração controlada por difusão (DC) nas curvas de furfurais (Figura 14(A)) e ácido clorogênico (Figura 14(B)) ocorre cerca de 40 min de extração. Em comparação, para flavonoide (Figura 14(C)) e PLD (Figura 14(D)) ocorre próximo a 100 min, para todas as temperaturas testadas. Este resultado concorda com o resultado esperado para o método de gradiente de solvente desenvolvido (método D) que inicialmente contém água como solvente, com extração inicial de compostos mais polares (furfurais e ácido clorogênico), seguido pela extração de compostos menos polares (flavonoides e PLD) até atingirem seu ponto máximo de recuperação. Além disso, os rendimentos de flavonoides e PLD aumentaram linearmente com o tempo durante o mesmo período em que o solvente mudou linearmente de água para etanol.

6. Monitoramento da PLE acoplado com separação em duas dimensões: *inline* com SPE e *online* com HPLC

Uma vez definidos o gradiente de solvente, tempo estático e temperatura da PLE, foi realizado o acoplamento em linha com SPE e *online* com HPLC com a PLE. O HPLC monitorou todo o processo de extração em tempo real. A Figura 15(A) mostra o cromatograma tridimensional representativo das injeções automáticas das frações do extrato de bagaço de maçã. A separação na primeira dimensão resultante do PLE-SPE é representada pelas 10 frações, F1-10 (eixo z). A separação em segunda dimensão é consequência da separação cromatográfica em HPLC (eixo x), e o eixo y mostra a intensidade do sinal recuperado pelo PDA. Conforme mostrado na Figura 15(A), o processo completo obteve 10 frações de extrato (10 injeções automáticas). Os compostos mais polares (ácidos fenólicos e furfurais) foram extraídos nas primeiras sete frações, e os compostos moderadamente polares (flavonoides) foram extraídos na oitava fração.

A adição do gradiente de solvente PLE à coluna SPE auxiliou o processo de separação/purificação na primeira dimensão. O gradiente de solvente durante a PLE permite a extração sequencial de diferentes grupos ao longo da extração, desde que a PLE iniciou com água como solvente até os primeiros 25 minutos, favorecendo a extração de ácidos fenólicos como ácido clorogênico e furfurais. Como visto na Figura 15(A), a força do sinal para a maioria dos compostos polares (primeira parte do cromatograma, eixo x) não é máxima até a quarta injeção. A partir da quinta injeção, a intensidade do sinal aumenta. Portanto, esse fenômeno é uma indicação de que os analitos facilmente solúveis em água foram extraídos nos primeiros 25 minutos e ficaram retidos no adsorvente. A partir do momento em que o gradiente mudou e o etanol passou a fazer parte da mistura de solventes, esses compostos foram eluídos, intensificando o sinal das injeções 5, 6 e 7. Por outro lado, os flavonoides aparecem nas injeções 8, 9 e 10, o que revela que foram extraídos antes disso, foram retidos no adsorvente e eluídos quando a composição do solvente atingiu uma maior polaridade com uma proporção crescente de etanol (128 min-100% etanol).

A Figura 15(A) também tem duas observações que merecem atenção. A primeira é a ausência de compostos detectados na primeira injeção, porque a tubulação entre a célula PLE e a válvula de interface (Figura 9) é preenchida com o solvente de limpeza (etanol), ou seja, quando uma nova corrida é iniciada, toda a extensão dessa tubulação é preenchida com etanol e, portanto, o tempo para a primeira injeção não foi suficiente para

que o solvente/extrato chegasse à válvula de interface. Este fato não prejudica a quantificação desde que a tubulação esteja livre de extrato da corrida anterior. No entanto, este é um detalhe que pode ser facilmente ajustado pelo operador do equipamento, calculando o tempo necessário para que a interface limpeza/extração chegue à válvula de interface e reprogramando a primeira injeção automática. A segunda observação é dada pelas duas injeções feitas após a injeção 10, nas quais, novamente, não há detecção de sinais nelas, indicando o esgotamento da amostra sólida e o alcance da extração quantitativa. Essas duas pós-injeções (F11 e F12) foram realizadas para verificar se a extração foi concluída.

O acoplamento por HPLC *online* ao método PLE-SPE para acompanhamento da extração é moderno e inédito para o subproduto industrial de maçã. Esse recurso permitiu o rastreamento em tempo real da extração de compostos alvo. Ao mesmo tempo em que os analitos são extraídos da amostra, é possível observar a intensidade do pico, retenção e eluição, certificando a extração completa dos compostos de interesse. As vantagens desse processo são resultados rápidos, menor chance de erro associado a etapas *offline*, caracterização completa de todas as frações do extrato, menor desperdício de solventes, tempo e energia que levam a custos operacionais reduzidos. Adicionalmente, é incentivada a utilização de solventes verdes nas etapas de PLE e HPLC, bem como a aplicação de resinas alternativas na SPE, para processos ecologicamente corretos.

Os dados na Figura 15(B)-(E) mostram que o acoplamento em linha com o SPE também foi eficiente. As classes de compostos apresentaram curvas cinéticas diferentes dependendo da afinidade entre analito-solvente-adsorvente. Compostos polares como furfurais (Figura 15(B)) e ácido clorogênico (Figura 15(C)) possuem maior afinidade pela água e menor afinidade pelo adsorvente, o que resultou em maiores recuperações nas primeiras injeções, atingindo o período DC cerca de 60 min, ao contrário do que foi apresentado na Figura 14, quando foi identificado 40 min. Portanto, este atraso de 20 minutos é uma consequência do adsorvente SPE. Da mesma forma, compostos moderadamente polares como flavonoides (Figura 15(D)) e PLD (Figura. 15(E)) apresentaram um comportamento cinético muito diferente do observado na Figura 14; ambos foram retidos inteiramente no adsorvente até F7 quando começou a ser eluído pelo etanol (~100 min). Adicionalmente, a Figura 15(D) e a Figura 15(E) mostram a eluição rápida de ambos os compostos que ocorreu entre F7 e F9.

As curvas cinéticas de cada composto apresentadas na Figura 15 indicam que furfurais e ácido clorogênico apresentaram um comportamento tradicional de extração de

composto por três períodos de extração. O período de CER (Constat Extraction Rate) ocorreu no início da extração, aproximadamente até os primeiros 30 minutos. O período de FER (Falling Extraction Rate), ou seja, a resistência à extração próxima ao esgotamento da amostra, também ocorreu em aproximadamente 60 minutos, quando se iniciou a DC. É importante destacar que esses três tempos observados foram uma aproximação e que os tempos exatos devem ser definidos após a modelagem das curvas com modelos teóricos ou empíricos. Por outro lado, flavonoides e PLD apresentaram comportamentos de curvas de extração não convencionais, pois há uma forte influência do adsorvente, por isso é um desafio definir períodos de extração a partir das Figuras 15(D) e 15(E) e, portanto, as Figuras 14(C) e 14(D) são aconselhados a serem usados em qualquer discussão sobre períodos de extração.

Resumindo, vale ressaltar que as quatro curvas de extração apresentadas na Figura 15 atingiram extrações quantitativas, o que é crucial para outros processos, como os analíticos. Além disso, o SPE permitiu uma limpeza da amostra antes de cada injeção, o que ajudou a preservar a coluna cromatográfica. Além disso, a Figura 15 também mostra que as frações alcançadas apresentaram composições diferentes, tal achado indica que o 2D-PLC-SPE-HPLC-PDA também pode ser utilizado como uma ferramenta preparativa para fracionar extratos a serem utilizados em outras avaliações de extratos, como por exemplo, em atividades biológicas. Por fim, o monitoramento *online* é outra vantagem do sistema, pois permite entender o processo de extração em tempo real e finalizar a extração quando são obtidas frações concentradas dos analitos alvo, evitando, por exemplo, a diluição do extrato.

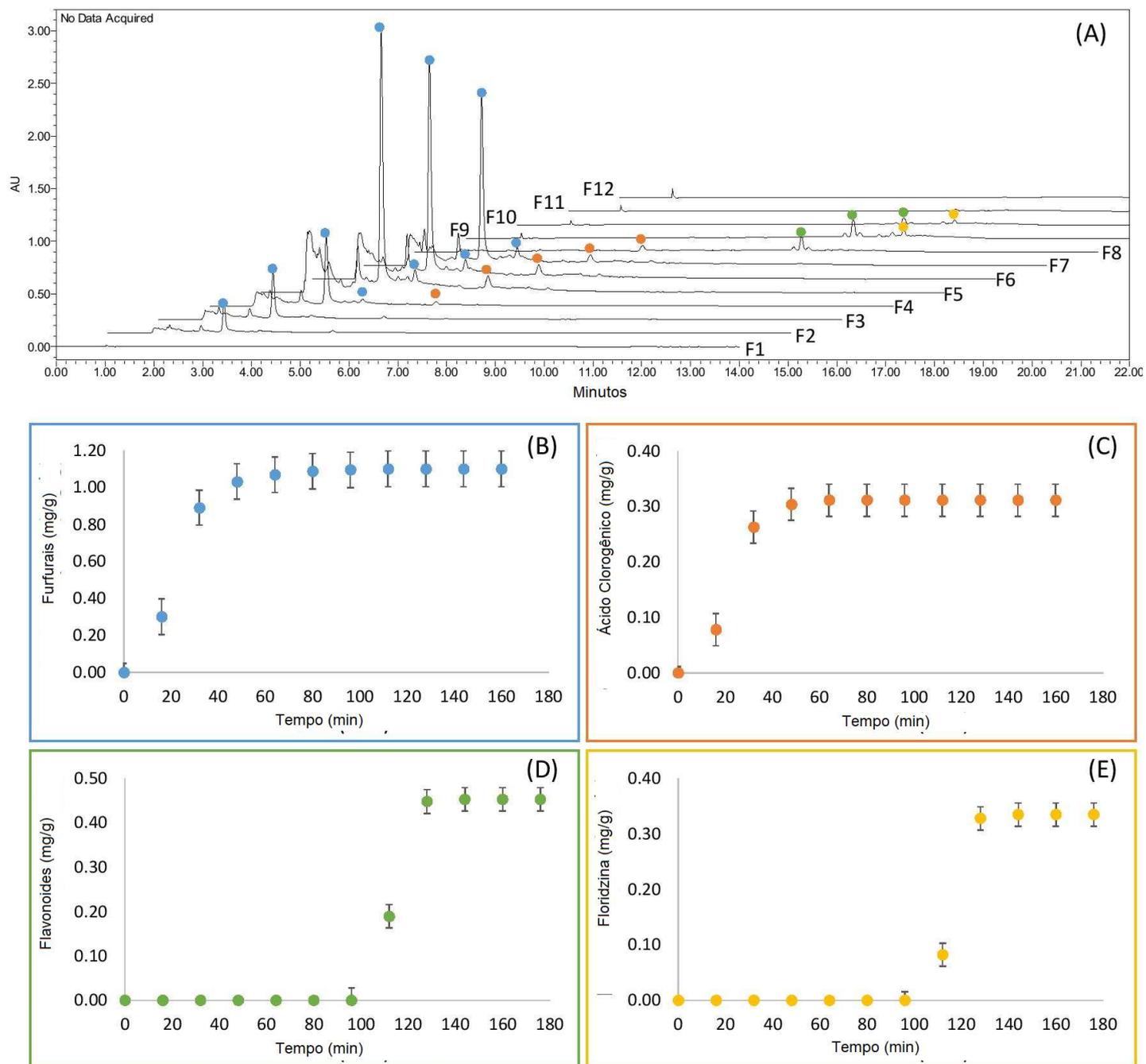


Figura 15 - Cromatograma tridimensional (A) representativo do PLE-SPE-HPLC-PDA realizado pelo método D, a 80 °C, e 20 min de tempo estático de extração. F1 a F10 representa as injeções automáticas do PLE-SPE em HPLC-PDA. Curvas cinéticas de furfurais (B), ácido clorogênico (C), flavonoides (D) e PLD (E).

7. Comparação do novo método PLE-SPE-HPLC-PDA com outras técnicas

O método PLE-SPE-HPLC-PDA foi comparado com outras injeções *offline* de técnicas de extração. A PLE sem SPE, UAE e extração com agitador magnético foram realizado conforme descrito na Seção 2. A Figura 16 compara os rendimentos dos analitos alvo obtidos pelos quatro métodos de extração diferentes. O método PLE-SPE-HPLC-PDA mostrou-se promissor para todos os analitos estudados; o rendimento de furfural foi significativamente igual ao PLE, superior à agitação magnética e inferior à UAE (Figura 16(A)); o rendimento de ácido clorogênico foi significativamente igual ao PLE e agitação magnética, mas inferior a UAE (Figura 16(B)); em relação aos flavonoides, o novo método resultou em rendimentos significativamente maiores que PLE e agitação magnética, mas menores que UAE (Figura 16(C)); e, finalmente, o novo método proporcionou rendimento de PLD superior ao PLE e agitação mecânica, e significativamente igual ao UAE (Figura 16(D)). Portanto, o método PLE-SPE-HPLC-PDA desenvolvido não foi quantitativamente superior ao dos UAE, revelando que necessita de ajustes para ser validado qualitativamente. Possíveis fontes de divergência nos resultados podem ter ocorrido na eluição incompleta de compostos do adsorvente de SPE, o que é um ponto de atenção. Portanto, recomenda-se para pesquisas futuras analisar o resíduo sólido da amostra para verificar se o conteúdo dos analitos alvo foi totalmente extraído e analisar o adsorvente para garantir que a eluição foi completa. De qualquer forma, a inferioridade do novo método em relação a UAE não invalida as conclusões obtidas, principalmente porque os resultados apresentados neste trabalho mostram o grande potencial que a extração por gradiente de solvente em PLE e a análise bidimensional PLE-SPE-HPLC possuem. Ainda, este trabalho mostrou os pontos críticos que precisam ser aprimorados no novo método para futuras pesquisas.

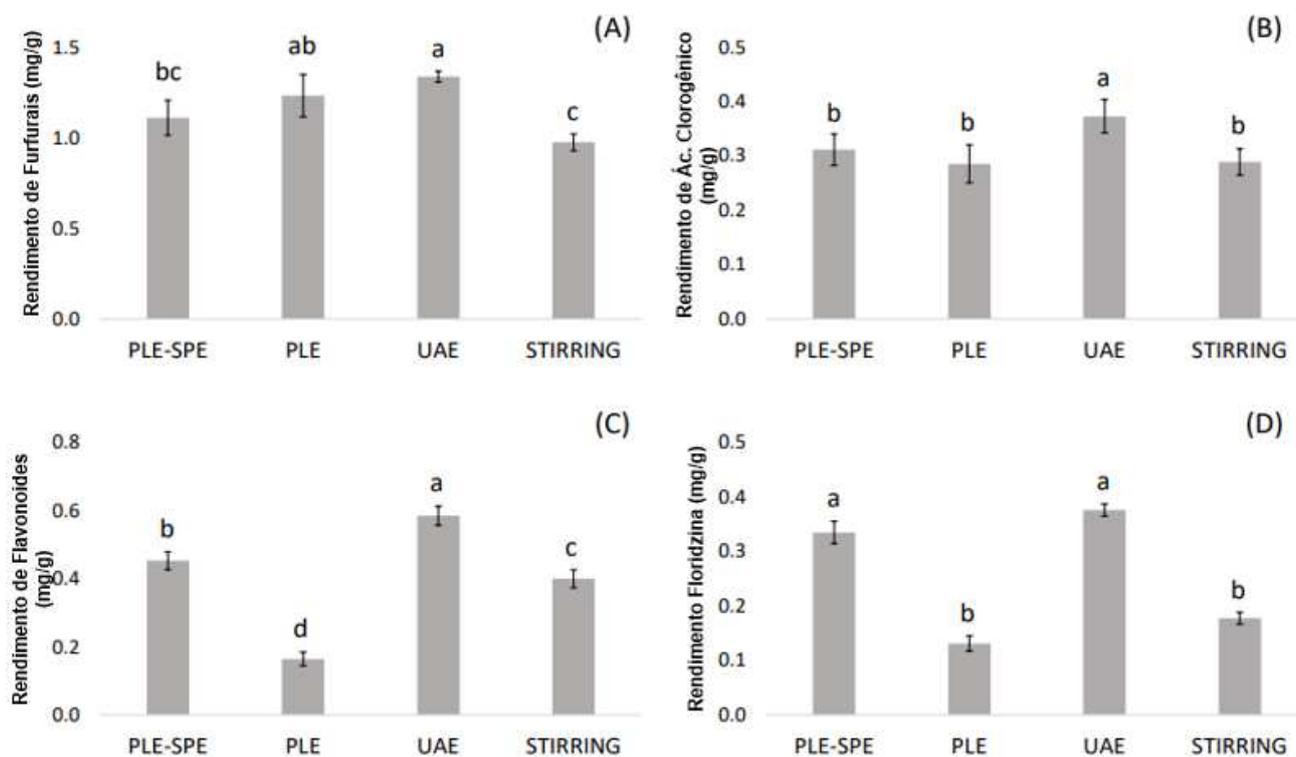


Figura 16 - Comparação de diferentes técnicas de extração no rendimento de compostos alvo do bagaço de maçã industrial. (A) furfural; (B) ácido clorogénico; (C) flavonoides; (D) floridzina. As mesmas letras nas barras não indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

Conclusão

Este trabalho desenvolveu um novo método para analisar de forma abrangente os compostos fenólicos do subproduto industrial da maçã. A PLE com gradiente de solvente foi acoplada em linha a SPE e *online* ao HPLC, permitindo a extração e análise química simultaneamente e o monitoramento do processo de extração, separação e análise em tempo real. O gradiente de solvente (25 min: 100% água; 100-160 min: 100% etanol), tempo estático (20 min) e temperatura de extração (80 °C) foram decisivos para a maior transferência de massa dos analitos alvo (furfurais, clorogênico ácidos, flavonoides e PLD) da matriz para o solvente de extração, aumentando o rendimento da extração e obtendo extrações quantitativas. Cada injeção foi representativa de uma fração de extrato coletada do sistema que pode ser usada para outros objetivos, como avaliações de atividades biológicas. O método desenvolvido (2D-PLE-SPE-HPLC-PDA) confirmou a importância do PLE como método moderno e eficiente de preparação de amostras, do SPE como ferramenta de limpeza prévia para injeções e do HPLC automático e simultâneo para obtenção de resultados precisos com menor intervenção humana. O acoplamento *online* resultou em cromatogramas tridimensionais com resoluções satisfatórias na primeira e na segunda dimensão das separações. Também é importante ressaltar que o método tem caráter ecologicamente correto, pois utiliza solventes verdes (água e etanol) e técnicas avançadas que permitem menor tempo de extração e menores custos em materiais e energia. O método desenvolvido produziu rendimentos de analitos equivalentes ou superiores a PLE e agitação magnética, mas rendimentos ligeiramente inferiores a UAE. Vale ressaltar que o novo método é automatizado desde a extração até a análise, produzindo frações de extrato, e a análise é *online*, o que não é possível acontecer em extrações UAE. Em suma, o método desenvolvido representa um avanço na integração de PLE com HPLC, principalmente pela aplicação de gradiente de solvente em análises abrangentes e pode ser extrapolado para outras matrizes naturais.

Referências Bibliográficas

- Akdemir Evrendilek, G., Celik, P., Agcam, E., & Akyildiz, A. (2017). Assessing impacts of pulsed electric fields on quality attributes and furfural and hydroxymethylfurfural formations in apple juice. *Journal of Food Process Engineering*, 40(5), e12524. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12524>
- Ertekin Filiz, B., & Seydim, A. C. (2018). Kinetic changes of antioxidant parameters, ascorbic acid loss, and hydroxymethyl furfural formation during apple chips production. *Journal of Food Biochemistry*, 42(6), e12676. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12676>
- Garcia-Mendoza, M. del P., Espinosa-Pardo, F. A., Baseggio, A. M., Barbero, G. F., Maróstica Junior, M. R., Rostagno, M. A., & Martínez, J. (2017). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, 119, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.08.014>
- Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B., & Ozkan, S. A. (2013). UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia*, 76(21–22), 1365–1427. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2477-8>
- Kalinowska, M., Bielawska, A., Lewandowska-Siwkiewicz, H., Priebe, W., & Lewandowski, W. (2014). Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84, 169–188. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.09.006>
- Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. In *Polyphenols in Plants* (pp. 243–259). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00025-6>
- Panja, P. (2018). Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science*, 23, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.012>
- Rostagno, M. A., Manchón, N., D'Arrigo, M., Guillamón, E., Villares, A., García-Lafuente, A., Ramos, A., & Martínez, J. A. (2011). Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. *Analytica Chimica Acta*, 685(2), 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.11.031>
- Viganó, J., de Aguiar, A. C., Veggi, P. C., Sanches, V. L., Rostagno, M. A., & Martínez, J. (2022). Techno-economic evaluation for recovering phenolic compounds from acai (*Euterpe oleracea*) by-product by pressurized liquid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 179, 105413. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2021.105413>
- Viganó, J., Sanches, V. L., de Souza Mesquita, L. M., de Souza, M. C., da Silva, L. C., Chaves, J. O., Forster-Carneiro, T., & Rostagno, M. A. (2021). Comprehensive analysis of phenolic compounds from natural products: Integrating sample preparation and analysis. *Analytica Chimica Acta*, 1178, 338845. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338845>

CONCLUSÕES GERAIS

O subproduto industrial da maçã é uma matéria-prima que abrange diversas classes de compostos de interesse comercial e biológico. Este trabalho foi direcionado aos estudos de compostos fenólicos presentes no bagaço da maçã. Dentre as classes de fenólicos encontradas e estudadas no bagaço da maçã durante o desenvolvimento deste trabalho, estão os ácidos, como ácido gálico e clorogênico, e os flavonoides, como a rutina, epicatequina, quercetina, hiperosídeo e floridzina. Outros compostos oriundos do processamento (secagem e armazenamento) de resíduos industriais, como os furfurais (HMF e Furfural), também foram encontrados na amostra estudada. Atualmente, diversas técnicas de extração são utilizadas para a extração de compostos no bagaço da maçã, como a extração por líquidos pressurizados (PLE) e a extração assistida por ultrassom (UAE), mas a purificação de extratos e o acoplamento de técnicas, por sua vez, são pouco recorrentes em estudos, evidenciando a carência de trabalhos neste sentido. Assim, métodos com técnicas acopladas de extração e purificação de compostos, como os apresentados neste trabalho (PLE-SPE) ainda são pouco exploradas em matrizes vegetais e em subprodutos da maçã. As variáveis do processo de extração e purificação, como tempo, temperatura, adsorventes e solventes foram estudadas. Adicionalmente, um método em gradiente de solvente verdes (água e etanol) utilizando PLE foi desenvolvido, sendo eficiente em extrair as diferentes classes de compostos da amostra. O método em gradiente foi utilizado no acoplamento em linha com extração em fase sólida (PLE-SPE) e também obteve bons rendimentos de compostos alvo quando comparado às técnicas convencionais de extração. O monitoramento de extração em tempo real por HPLC não havia sido reportado em estudos com o resíduo industrial da maçã. Os resultados do acoplamento *online* em HPLC do método desenvolvido neste trabalho mostrou uma nova possibilidade de análises em tempo real de extração de compostos fenólicos do resíduo industrial da maçã. Assim, os resultados aqui mostrados sugerem que este trabalho trouxe inovações em extração, purificação e análise *online* de compostos do subproduto industrial da maçã em equipamentos totalmente inéditos e automatizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Valéro, J. R. (2011). Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium* - Liberation and extraction of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.129>
- Akdemir Evrendilek, G., Celik, P., Agcam, E., & Akyildiz, A. (2017). Assessing impacts of pulsed electric fields on quality attributes and furfural and hydroxymethylfurfural formations in apple juice. *Journal of Food Process Engineering*, 40(5), e12524. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12524>
- Alberti, A., Zielinski, A. A. F., Zardo, D. M., Demiate, I. M., Nogueira, A., & Mafra, L. I. (2014). Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.086>
- Alonso-Salces, R. M., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (2001a). Determination of polyphenolic profiles of Basque cider apple varieties using accelerated solvent extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf010021s>
- Alonso-Salces, R. M., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (2001b). Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. *Journal of Chromatography A*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01212-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01212-2)
- Alvarez-Vasco, C., Ma, R., Quintero, M., Guo, M., Geleynse, S., Ramasamy, K. K., Wolcott, M., & Zhang, X. (2016). Unique low-molecular-weight lignin with high purity extracted from wood by deep eutectic solvents (DES): a source of lignin for valorization. *Green Chemistry*, 18(19), 5133–5141.
- Arks, S. E. C. M., Ullen, W. I. M., Orges, G. I. N. A. B., & Rozier, A. L. A. N. C. (2009). Absorption, Metabolism, and Excretion of Cider Dihydrochalcones in Healthy Humans and Subjects with an Ileostomy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf802757x>
- Armenta, S., Garrigues, S., Esteve-Turrillas, F. A., & de la Guardia, M. (2019). Green extraction techniques in green analytical chemistry. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.016>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013a). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013b). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Barreca, D., Bellocco, E., Laganà, G., Ginestra, G., & Bisignano, C. (2014). Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosylated derivatives present in apple and kumquat. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.118>
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., & Santos-Buelga, C. (2009). Phenolic acids determination by HPLC–DAD–ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1076–1079. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.039>
- Baskaran, R., Pullencheri, D., & Somasundaram, R. (2016). Characterization of free, esterified and bound phenolics in custard apple (*Annona squamosa* L) fruit pulp by UPLC-ESI-MS/MS. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.001>

- Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., Devkota, H. P., Orhan, I. E., Patra, J. K., Das, G., Anandharamakrishnan, C., Gomez-Gomez, L., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., & Atanasov, A. G. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.018>
- Bolarinwa, I. F., Orfila, C., & Morgan, M. R. A. (2015). Determination of amygdalin in apple seeds, fresh apples and processed apple juices. *Food Chemistry*, *170*, 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.083>
- Bondonno, N. P., Bondonno, C. P., Ward, N. C., Hodgson, J. M., & Croft, K. D. (2017). The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. *Trends in Food Science & Technology*, *69*, 243–256. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.012>
- Bot, F., Verkerk, R., Mastwijk, H., Anese, M., Fogliano, V., & Capuano, E. (2018). The effect of pulsed electric fields on carotenoids bioaccessibility: The role of tomato matrix. *Food Chemistry*, *240*, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.102>
- Bouras, M., Chadni, M., Barba, F. J., Grimi, N., Bals, O., & Vorobiev, E. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from Quercus bark. *Industrial Crops and Products*, *77*, 590–601. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.018>
- Boyer, J., Brown, D., & Rui, H. L. (2004). Uptake of quercetin and quercetin 3-glucoside from whole onion and apple peel extracts by Caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf030733d>
- Brewer, M. S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>
- Budzynska, B., Faggio, C., Kruk-Slomka, M., Samec, D., Nabavi, S. F., Sureda, A., Devi, K. P., & Nabavi, S. M. (2017). Rutin as Neuroprotective Agent: From Bench to Bedside. *Current Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.2174/0929867324666171003114154>
- Cai, X., Xiao, M., Zou, X., Tang, J., Huang, B., & Xue, H. (2021). Extraction and separation of flavonoids from Malus hupehensis using high-speed countercurrent chromatography based on deep eutectic solvent. *Journal of Chromatography A*, *1641*, 461998.
- Cai, H., You, S., Xu, Z. *et al.* Novel extraction methods and potential applications of polyphenols in fruit waste: a review. *Food Measure* **15**, 3250–3261 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00901-1>
- Casazza, A. A., Pettinato, M., & Perego, P. (2020). Polyphenols from apple skins: A study on microwave-assisted extraction optimization and exhausted solid characterization. *Separation and Purification Technology*, *240*, 116640. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116640>
- Ćetković, G., Čanadanović-Brunet, J., Djilas, S., Savatović, S., Mandić, A., & Tumbas, V. (2008). Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.046>
- Chan, A., & Shea, T. B. (2009). Dietary supplementation with apple juice decreases endogenous amyloid- β levels in murine brain. *Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-0959>
- Chandrasekar, V., Martín-González, M. F. S., Hirst, P., & Ballard, T. S. (2015). Optimizing Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Antioxidants from Red Delicious and Jonathan Apple Pomace. *Journal of Food Process Engineering*. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12187>
- Chanioti, S., & Tzia, C. (2018). Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *48*, 228–239.

- Chavan, U. ., Shahidi, F., & Naczk, M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00234-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00234-5)
- Chemat, Abert Vian, Ravi, Khadhraoui, Hilali, Perino, & Tixier. (2019). Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects. *Molecules*, 24(16), 3007. <https://doi.org/10.3390/molecules24163007>
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., & Cravotto, G. (2019). Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.037>
- Chemat, F., Abert Vian, M., Ravi, H. K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S., & Fabiano Tixier, A.-S. (2019). Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects. *Molecules*, 24(16), 3007.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. In *Ultrasonics Sonochemistry* (Vol. 34, pp. 540–560). <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Chen, C. (2016). Sinapic acid and its derivatives as medicine in oxidative stress-induced diseases and aging. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2016/3571614>
- Connor, C. A., Adriaens, M., Pierini, R., Johnson, I. T., & Belshaw, N. J. (2014). Procyanidin induces apoptosis of esophageal adenocarcinoma cells via JNK activation of c-Jun. *Nutrition and Cancer*. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.868914>
- D'Archivio, M., Scazzocchio, B., Giovannini, C., & Masella, R. (2013). Role of Protocatechuic Acid in Obesity-Related Pathologies. In *Polyphenols in Human Health and Disease*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00015-3>
- Da Silva, L. C., Souza, M. C., Sumere, B. R., Silva, L. G. S., da Cunha, D. T., Barbero, G. F., Bezerra, R. M. N., & Rostagno, M. A. (2020). Simultaneous extraction and separation of bioactive compounds from apple pomace using pressurized liquids coupled on-line with solid-phase extraction. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126450>
- Dachineni, R., Ai, G., Kumar, D. R., Sadhu, S. S., Tummala, H., & Bhat, G. J. (2016). Cyclin A2 and CDK2 as novel targets of aspirin and salicylic acid: A potential role in cancer prevention. *Molecular Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0360>
- De Abreu, F. P., Dornier, M., Dionisio, A. P., Carail, M., Caris-Veyrat, C., & Dhuique-Mayer, C. (2013). Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: A focus on carotenoids. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.028>
- Faria, E. L. P., Shabudin, S. V, Cláudio, A. F. M., Válega, M., Domingues, F. M. J., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., & Freire, M. G. (2017). Aqueous solutions of surface-active ionic liquids: remarkable alternative solvents to improve the solubility of triterpenic acids and their extraction from biomass. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(8), 7344–7351.
- De Souza Mesquita, Leonardo M, Martins, M., Maricato, É., Nunes, C., Quinteiro, P. S. G. N., Dias, A. C. R. V, Coutinho, J. A. P., Pisani, L. P., de Rosso, V. V, & Ventura, S. P. M. (2020). Ionic liquid-mediated recovery of carotenoids from the *Bactris gasipaes* fruit waste

- and their application in food-packaging chitosan films. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(10), 4085–4095.
- De Souza Mesquita, Leonardo Mendes, Ventura, S. P. M., Braga, A. R. C., Pisani, L. P., Dias, A., & de Rosso, V. V. (2019). Ionic liquid-high performance extractive approach to recover carotenoids from *Bactris gasipaes* fruits. *Green Chemistry*.
- Dias, A. L. B., Arroio Sergio, C. S., Santos, P., Barbero, G. F., Rezende, C. A., & Martínez, J. (2016). Effect of ultrasound on the supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 284–294. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.01.013>
- Dias, A. L. B., Arroio Sergio, C. S., Santos, P., Barbero, G. F., Rezende, C. A., & Martínez, J. (2017). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L.): Effects on the vegetable matrix and mathematical modeling. *Journal of Food Engineering*, 198, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.11.020>
- Dias, A. L. B., de Aguiar, A. C., & Rostagno, M. A. (2021). Extraction of natural products using supercritical fluids and pressurized liquids assisted by ultrasound: Current status and trends. *Ultrasonics Sonochemistry*, 74, 105584. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105584>
- Ding, M., Feng, R., Wang, S. Y., Bowman, L., Lu, Y., Qian, Y., Castranova, V., Jiang, B. H., & Shi, X. (2006). Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600861200>
- DU, F., DENG, B., GAO, L., XIANG, Y., & ZHANG, J. (2013). Optimization of microwave-assisted extraction technology of total flavonoids from *Malus micromalus* Makino using Ionic liquids and response surface methodology. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 17.
- Silva, F. A., Carmo, R. M. C., Fernandes, A. P. M., Kholany, M., Coutinho, J. A. P., & Ventura, S. P. M. (2017). Using Ionic Liquids To Tune the Performance of Aqueous Biphasic Systems Based on Pluronic L-35 for the Purification of Naringin and Rutin. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(8), 6409–6419. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00178>
- Eisvand, F., Razavi, B. M., & Hosseinzadeh, H. (2020). The effects of *Ginkgo biloba* on metabolic syndrome: A review. *Phytotherapy Research*. <https://doi.org/10.1002/ptr.6646>
- Ertekin Filiz, B., & Seydim, A. C. (2018). Kinetic changes of antioxidant parameters, ascorbic acid loss, and hydroxymethyl furfural formation during apple chips production. *Journal of Food Biochemistry*, 42(6), e12676. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12676>
- Eskin, N. A. M.; Przybylski, R. (2001). Antioxidants and Shelf Life of Foods. In: *Food Shelf Life Stability*. In *Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes* (pp. 175–209).
- Esteki, M., Shahsavari, Z., & Simal-Gandara, J. (2019). Food identification by high performance liquid chromatography fingerprinting and mathematical processing. *Food Research International*, 122, 303–317. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.025>
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>
- Ferenczyova, K., Kalocayova, B., & Bartekova, M. (2020). Potential implications of quercetin and its derivatives in cardioprotection. In *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms21051585>
- Fernandes, P. A. R., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. G. C., Nunes, F. M., Bastos, R., Coelho,

- E., Wessel, D. F., Coimbra, M. A., & Cardoso, S. M. (2019). Revisiting the chemistry of apple pomace polyphenols. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.006>
- Fernández-Jalao, I., Sánchez-Moreno, C., & De Ancos, B. (2019). Effect of high-pressure processing on flavonoids, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones and antioxidant activity of apple ‘Golden Delicious’ from different geographical origin. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *51*, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.06.002>
- Ferrentino, G., Morozova, K., Mosibo, O. K., Ramezani, M., & Scampicchio, M. (2018a). Biorecovery of antioxidants from apple pomace by supercritical fluid extraction. *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.03.165>
- Ferrentino, G., Morozova, K., Mosibo, O. K., Ramezani, M., & Scampicchio, M. (2018b). Biorecovery of antioxidants from apple pomace by supercritical fluid extraction. *Journal of Cleaner Production*, *186*, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.03.165>
- Flieger, J., & Flieger, M. (2020). Ionic Liquids Toxicity—Benefits and Threats. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 6267.
- Francini, A., & Sebastiani, L. (2013). Phenolic Compounds in Apple (*Malus x domestica* Borkh.): Compounds Characterization and Stability during Postharvest and after Processing. *Antioxidants*. <https://doi.org/10.3390/antiox2030181>
- Franquin-Trinquier, S., Maury, C., Baron, A., Le Meurly, D., & Mehinagic, E. (2014). Optimization of the extraction of apple monomeric phenolics based on response surface methodology: Comparison of pressurized liquid-solid extraction and manual-liquid extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.01.005>
- Fromm, M., Loos, H. M., Bayha, S., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2013). Recovery and characterisation of coloured phenolic preparations from apple seeds. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.042>
- Fu, L., Xu, B.-T., Xu, X.-R., Gan, R.-Y., Zhang, Y., Xia, E.-Q., & Li, H.-B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, *129*(2), 345–350. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.079>
- Garcia-Mendoza, M. del P., Espinosa-Pardo, F. A., Baseggio, A. M., Barbero, G. F., Maróstica Junior, M. R., Rostagno, M. A., & Martínez, J. (2017). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, *119*, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.08.014>
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. In *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules15128813>
- Goli, A. H., Barzegar, M., & Sahari, M. A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.020>
- Gómez Caravaca, A. M., Carrasco Pancorbo, A., Cañabate Díaz, B., Segura Carretero, A., & Fernández Gutiérrez, A. (2005). Electrophoretic identification and quantitation of compounds in the polyphenolic fraction of extra-virgin olive oil. *Electrophoresis*. <https://doi.org/10.1002/elps.200500202>
- Grigoras, C. G., Destandau, E., Fougère, L., & Elfakir, C. (2013). Evaluation of apple pomace extracts as a source of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.026>
- Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B., & Ozkan, S. A. (2013). UPLC versus HPLC on Drug

- Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia*, 76(21–22), 1365–1427. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2477-8>
- Guo, X. F., Liu, J. P., Ma, S. Q., Zhang, P., & Sun, W. De. (2018). Avicularin reversed multidrug-resistance in human gastric cancer through enhancing Bax and BOK expressions. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.110>
- Hajjalyani, M., Farzaei, M. H., Echeverría, J., Nabavi, S. M., Uriarte, E., & Eduardo, S. S. (2019). Hesperidin as a neuroprotective agent: A review of animal and clinical evidence. In *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules24030648>
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.16.1.33>
- Hameed, A., Hafizur, R. M., Hussain, N., Raza, S. A., Rehman, M., Ashraf, S., Ul-Haq, Z., Khan, F., Abbas, G., & Choudhary, M. I. (2018). Eriodictyol stimulates insulin secretion through cAMP/PKA signaling pathway in mice islets. *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.12.015>
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2023–2044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x>
- Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M., Horton, A., Adhikari, L., Zelovich, T., & Doherty, B. W. (2020). Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chemical Reviews*.
- Hartogh, D. J. D., & Tsiani, E. (2019). Antidiabetic properties of naringenin: A citrus fruit Polyphenol. *Biomolecules*. <https://doi.org/10.3390/biom9030099>
- He, B., Zhang, L. L., Yue, X. Y., Liang, J., Jiang, J., Gao, X. L., & Yue, P. X. (2016). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.094>
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Hernández-Carranza, P., Ávila-Sosa, R., Guerrero-Beltrán, J. A., Navarro-Cruz, A. R., Corona-Jiménez, E., & Ochoa-Velasco, C. E. (2016). Optimization of Antioxidant Compounds Extraction from Fruit By-Products: Apple Pomace, Orange and Banana Peel. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(1), 103–115. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12588>
- Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Kromhout, D., Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Hertog, M. G. L., & Katan, M. B. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)92876-U](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)92876-U)
- Hosseinzadeh, R., Khorsandi, K., & Hemmaty, S. (2013). Study of the effect of surfactants on extraction and determination of polyphenolic compounds and antioxidant capacity of fruits extracts. *PloS One*, 8(3), e57353.
- Hyson, D. A. (2011). A Comprehensive Review of Apples and Apple Components and Their Relationship to Human Health. *Advances in Nutrition*, 2(5), 408–420. <https://doi.org/10.3945/an.111.000513>
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. In *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>
- Illera, A. E., Chaple, S., Sanz, M. T., Ng, S., Lu, P., Jones, J., Carey, E., & Bourke, P. (2019). Effect of cold plasma on polyphenol oxidase inactivation in cloudy apple juice and on the

- quality parameters of the juice during storage. *Food Chemistry: X*, 3, 100049. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2019.100049>
- Imran, M., Rauf, A., Abu-Izneid, T., Nadeem, M., Shariati, M. A., Khan, I. A., Imran, A., Orhan, I. E., Rizwan, M., Atif, M., Gondal, T. A., & Mubarak, M. S. (2019). Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. In *Biomedicine and Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108612>
- Jakobek, L., & Barron, A. R. (2016). Ancient apple varieties from Croatia as a source of bioactive polyphenolic compounds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 45, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.09.007>
- Jakobek, L., Boc, M., & Barron, A. R. (2015). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Apples. *Food Analytical Methods*. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0161-3>
- Jakopič, J., Veberič, R., & štampar, F. (2009). Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. *Acta Agriculturae Slovenica*. <https://doi.org/10.2478/v10014-009-0002-4>
- Jeong, K. M., Zhao, J., Jin, Y., Heo, S. R., Han, S. Y., Yoo, D. E., & Lee, J. (2015). Highly efficient extraction of anthocyanins from grape skin using deep eutectic solvents as green and tunable media. *Archives of Pharmacal Research*, 38(12), 2143–2152.
- Kalinowska, M., Bielawska, A., Lewandowska-Siwkiewicz, H., Priebe, W., & Lewandowski, W. (2014). Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84, 169–188. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.09.006>
- Kamal, M., & Karoui, R. (2015). Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 27–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.007>
- Krakowska, A., Rafińska, K., Walczak, J., & Buszewski, B. (2018). Enzyme-assisted optimized supercritical fluid extraction to improve *Medicago sativa* polyphenolics isolation. *Industrial Crops and Products*, 124, 931–940. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.004>
- Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- Kumar, N., & Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. In *Biotechnology Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.09.002>
- Leontowicz, H., Gorinstein, S., Lojek, A., Leontowicz, M., Íž, M., Soliva-Fortuny, R., Park, Y. S., Jung, S. T., Trakhtenberg, S., & Martin-Belloso, O. (2002). Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00206-1](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00206-1)
- Lesjak, M., Beara, I., Simin, N., Pintać, D., Majkić, T., Bekvalac, K., Orčić, D., & Mimica-Dukić, N. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *Journal of Functional Foods*. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.047>
- Li, H., Deng, Z., Wu, T., Liu, R., Loewen, S., & Tsao, R. (2012). Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.019>
- Li, W., Shi, M., Wang, P., Guo, X., Li, C., & Kang, W. (2018). Efficient determination of three flavonoids in *Malus pumila* flowers by ionic liquid-HPLC. *Journal of Molecular Liquids*, 263, 139–146.

- Li, Z., Meng, F., Zhang, Y., Sun, L., Yu, L., Zhang, Z., Peng, S., & Guo, J. (2016). Simultaneous quantification of hyperin, reynoutrin and guaijaverin in mice plasma by LC-MS/MS: Application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*. <https://doi.org/10.1002/bmc.3660>
- Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., & Barroso, C. G. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, *1140*(1–2), 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.040>
- Lima, Á. S., Soares, C. M. F., Paltram, R., Halbwirth, H., & Bica, K. (2017). Extraction and consecutive purification of anthocyanins from grape pomace using ionic liquid solutions. *Fluid Phase Equilibria*, *451*, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.08.006>
- Lohani, U. C., & Muthukumarappan, K. (2016). Application of the pulsed electric field to release bound phenolics in sorghum flour and apple pomace. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *35*, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.03.012>
- Lončarić, A.; Matanović, K.; Ferrer, P.; Kovač, T.; Šarkanj, B.; Skendrović Babojelić, M.; Lores, M. Peel of Traditional Apple Varieties as a Great Source of Bioactive Compounds: Extraction by Micro-Matrix Solid-Phase Dispersion. *Foods* **2020**, *9*, 80. <https://doi.org/10.3390/foods9010080>
- Lu, Y., & Yeap Foo, L. (1998). Constitution of some chemical components of apple seed. *Food Chemistry*, *61*(1–2), 29–33. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00123-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00123-4)
- Macan, A. M., Kraljević, T. G., & Raić-malić, S. (2019). Therapeutic perspective of vitamin C and its derivatives. In *Antioxidants*. <https://doi.org/10.3390/antiox8080247>
- Machado, A. P. D. F., Pasquel-Reátegui, J. L., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2015). Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. *Food Research International*, *77*, 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.042>
- Makarova, E., Górnas, P., Konrade, I., Tirzite, D., Cirule, H., Gulbe, A., Pugajeva, I., Seglina, D., & Dambrova, M. (2014). Acute anti-hyperglycaemic effects of an unripe apple preparation containing phlorizin in healthy volunteers: A preliminary study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6779>
- Malinowska, M., Śliwa, K., Sikora, E., Ogonowski, J., Oszmiański, J., & Kolniak-Ostek, J. (2018). Ultrasound-assisted and micelle-mediated extraction as a method to isolate valuable active compounds from apple pomace. *Journal of Food Processing and Preservation*, *42*(10), e13720. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13720>
- Manchón, N., D'Arrigo, M., García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Ramos, A., Martínez, J. A., & Rostagno, M. A. (2010). Fast analysis of isoflavones by high-performance liquid chromatography using a column packed with fused-core particles. *Talanta*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.08.050>
- Manchón, Noelia, Mateo-Vivaracho, L., Darrigo, M., GARCÍA-LAFUENTE, A., Guillamón, E., Villares, A., & Rostagno, M. A. (2013). Distribution patterns of polyphenols and alkaloids in instant coffee, soft and energy drinks, and tea. *Czech Journal of Food Sciences*.
- Mari, A., Tedesco, I., Nappo, A., Russo, G. L., Malorni, A., & Carbone, V. (2010). Phenolic compound characterisation and antiproliferative activity of “Annurca” apple, a southern Italian cultivar. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.023>
- Martins Strieder, M., Neves, M. I. L., Silva, E. K., & Meireles, M. A. A. (2020). Low-frequency and high-power ultrasound-assisted production of natural blue colorant from the milk and unripe *Genipa americana* L. *Ultrasonics Sonochemistry*, *66*, 105068. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105068>
- Massias, A., Boisard, S., Baccaunaud, M., Leal Calderon, F., & Subra-Paternault, P. (2015a).

- Recovery of phenolics from apple peels using CO₂ + ethanol extraction: Kinetics and antioxidant activity of extracts. *Journal of Supercritical Fluids*. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.12.007>
- Massias, A., Boisard, S., Baccaunaud, M., Leal Calderon, F., & Subra-Paternault, P. (2015b). Recovery of phenolics from apple peels using CO₂+ethanol extraction: Kinetics and antioxidant activity of extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*, 98, 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.12.007>
- Matsui, T. (2015). Condensed catechins and their potential health-benefits. In *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.09.017>
- Mihailović, N. R., Mihailović, V. B., Kreft, S., Ćirić, A. R., Joksović, L. G., & Đurđević, P. T. (2018). Analysis of phenolics in the peel and pulp of wild apples (*Malus sylvestris* (L.) Mill.). *Journal of Food Composition and Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.11.007>
- Milić, B., Stojanović, S., Vučurević, N., & Turčić, M. (1968). Chlorogenic and quinic acids in sunflower meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740190211>
- Moreira, M. M., Barroso, M. F., Boeykens, A., Withouck, H., Morais, S., & Delerue-Matos, C. (2017a). Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: Comparison between conventional and microwave-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.038>
- Moreira, M. M., Barroso, M. F., Boeykens, A., Withouck, H., Morais, S., & Delerue-Matos, C. (2017b). Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: Comparison between conventional and microwave-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*, 104, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.038>
- Musacchi, S., & Serra, S. (2018). Apple fruit quality: Overview on pre-harvest factors. *Scientia Horticulturae*, 234, 409–430. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.057>
- Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>
- Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., Ahmad, F., Babazadeh, D., FangFang, X., Modarresi-Ghazani, F., WenHua, L., & XiaoHui, Z. (2018). Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 97(October 2017), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>
- Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. In *Polyphenols in Plants* (pp. 243–259). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00025-6>
- Palma, M., Piñeiro, Z., & Barroso, C. G. (2001). Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. *Journal of Chromatography A*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00882-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00882-2)
- Palma, M., Piñeiro, Z., & Barroso, C. G. (2002). In-line pressurized-fluid extraction-solid-phase extraction for determining phenolic compounds in grapes. *Journal of Chromatography A*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00823-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00823-3)
- Panadare, D., Dialani, G., & Rathod, V. (2021). Extraction of volatile and non-volatile components from custard apple seed powder using supercritical CO₂ extraction system and its inventory analysis. *Process Biochemistry*, 100, 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.030>

- Panja, P. (2018). Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science*, 23, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.11.012>
- Papagiannopoulos, M., & Mellenthin, A. (2002). Automated sample preparation by pressurized liquid extraction-solid-phase extraction for the liquid chromatographic-mass spectrometric investigation of polyphenols in the brewing process. *Journal of Chromatography A*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01230-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01230-X)
- Papagiannopoulos, M., Zimmermann, B., Mellenthin, A., Krappe, M., Maio, G., & Galensa, R. (2002). Online coupling of pressurized liquid extraction, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for automated analysis of proanthocyanidins in malt. *Journal of Chromatography A*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00364-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00364-3)
- Pavlić, B., Naffati, A., Hojan, T., Vladić, J., Zeković, Z., & Vidović, S. (2017). Microwave-assisted extraction of wild apple fruit dust-production of polyphenol-rich extracts from filter tea factory by-products. *Journal of Food Process Engineering*, 40(4), e12508. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12508>
- Pei, K., Ou, J., Huang, J., & Ou, S. (2016). p-Coumaric acid and its conjugates: Dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7578>
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., Bourvellec, C. Le, Renard, C. M. G. C., & Chemat, F. (2012). Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.026>
- Pratt, D. E., & Hudson, B. J. F. (1990). Natural Antioxidants Not Exploited Commercially. *Food Antioxidants*. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0753-9_5
- Rahath Kubra, I., Kumar, D., & Jagan Mohan Rao, L. (2016). Emerging Trends in Microwave Processing of Spices and Herbs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.818933>
- Rajan, V. K., Shameera, S. A., Hasna, C. K., & Muraleedharan, K. (2018). A non toxic natural food colorant and antioxidant ‘Peonidin’ as a pH indicator: A TDDFT analysis. *Computational Biology and Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.07.015>
- Ramirez, G., Zamilpa, A., Zavala, M., Perez, J., Morales, D., & Tortoriello, J. (2016). Chrysoeriol and other polyphenols from *Tecoma stans* with lipase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.014>
- Rana, S., Gupta, S., Rana, A., & Bhushan, S. (2015). Functional properties, phenolic constituents and antioxidant potential of industrial apple pomace for utilization as active food ingredient. *Food Science and Human Wellness*. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.10.001>
- Réblová, Z. (2012). Effect of temperature on the antioxidant activity of phenolic acids. *Czech Journal of Food Sciences*.
- Reis, S. F., Rai, D. K., & Abu-Ghannam, N. (2012). Water at room temperature as a solvent for the extraction of apple pomace phenolic compounds. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.068>
- Rezaei, S., Rezaei, K., Haghighi, M., & Labbafi, M. (2013). Solvent and solvent to sample ratio as main parameters in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from apple pomace. *Food Science and Biotechnology*, 22(5), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0212-8>
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>
- Rostagno M. A., Prado, J. M. (2013). *Natural Product Extraction: Principles and Applications*.
- Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2004). Pressurized liquid extraction of isoflavones

- from soybeans. *Analytica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.05.078>
- Rostagno, M.A., D'Arrigo, M., Martínez, J. A., & Martínez, J. A. (2010). Combinatory and hyphenated sample preparation for the determination of bioactive compounds in foods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(6), 553–561. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.02.015>
- Rostagno, M A, Manchón, N., D'Arrigo, M., Guillamón, E., Villares, A., García-Lafuente, A., Ramos, A., & Martínez, J. A. (2011). Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. *Analytica Chimica Acta*, 685(2), 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.11.031>
- Rostagno, Mauricio A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01184-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01184-1)
- Rostagno, Mauricio A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2005). Solid-phase extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.04.045>
- Rostagno, Mauricio A., Araújo, J. M. A., & Sandi, D. (2002). Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour. *Food Chemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00106-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00106-1)
- Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., Lucarini, M., Santini, A., Souto, E. B., Novellino, E., Antolak, H., Azzini, E., Setzer, W. N., & Martins, N. (2019). The therapeutic potential of Apigenin. In *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms20061305>
- Santos, M. P., Souza, M. C., Sumere, B. R., da Silva, L. C., Cunha, D. T., Bezerra, R. M. N., & Rostagno, M. A. (2019). Extraction of bioactive compounds from pomegranate peel (*Punica granatum L.*) with pressurized liquids assisted by ultrasound combined with an expansion gas. *Ultrasonics Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.02.021>
- Santos, P., Aguiar, A. C., Barbero, G. F., Rezende, C. A., & Martínez, J. (2015). Supercritical carbon dioxide extraction of capsaicinoids from malagueta pepper (*Capsicum frutescens L.*) assisted by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.001>
- Sato, K., Sasaki, S. S., Goda, Y., Yamada, T., Nunomura, O., Ishikawa, K., & Maitani, T. (1999). Direct connection of supercritical fluid extraction and supercritical fluid chromatography as a rapid quantitative method for capsaicinoids in placentas of *Capsicum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf990488r>
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., & Iseki, K. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.035>
- Sebrae. (2018). *O cultivo e o mercado da maçã*.
- Shahidi, F., & Naczk, M. (1995). Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. <https://doi.org/10.1080/14616700220145650>
- Sharma, S., Kori, S., & Parmar, A. (2015). Surfactant mediated extraction of total phenolic contents (TPC) and antioxidants from fruits juices. *Food Chemistry*, 185, 284–288.
- Shay, J., Elbaz, H. A., Lee, I., Zielske, S. P., Malek, M. H., & Hüttemann, M. (2015). Molecular mechanisms and therapeutic effects of (-)-epicatechin and other polyphenols in cancer, inflammation, diabetes, and neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/181260>
- Simpson, N. (1991). Solid-phase extraction - Principles, Techniques and Applications. In *Acta*

- chemica Scandinavica* (Copenhagen, Denmark : 1989).
<https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.45-1047>
- Skinner, R. C., Gigliotti, J. C., Ku, K.-M., & Tou, J. C. (2018). A comprehensive analysis of the composition, health benefits, and safety of apple pomace. *Nutrition Reviews*.
<https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy033>
- Skrypnik, L., & Novikova, A. (2020). Response Surface Modeling and Optimization of Polyphenols Extraction from Apple Pomace Based on Nonionic Emulsifiers. *Agronomy*, 10(1), 92.
- Souza, M. C., Santos, M. P., Sumere, B. R., Silva, L. C., Cunha, D. T., Martínez, J., Barbero, G. F., & Rostagno, M. A. (2020). Isolation of gallic acid, caffeine and flavonols from black tea by on-line coupling of pressurized liquid extraction with an adsorbent for the production of functional bakery products. *LWT*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108661>
- Souza Mesquita, Leonardo M., Martins, M., Pisani, L. P., Ventura, S. P. M., & Rosso, V. V. (2021). Insights on the use of alternative solvents and technologies to recover bio-based food pigments. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 787–818.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12685>
- Srinivasulu, C., Ramgopal, M., Ramanjaneyulu, G., Anuradha, C. M., & Suresh Kumar, C. (2018). Syringic acid (SA) – A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological and Industrial Importance. In *Biomedicine and Pharmacotherapy*.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.069>
- Suárez, B., Álvarez, Á. L., García, Y. D., Barrio, G. del, Lobo, A. P., & Parra, F. (2010). Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.073>
- Subar, A., & Patterson, B. (1992). Fruit, Vegetables, and Cancer Prevention: A Review of the Epidemiological Evidence. In *Nutrition and Cancer*.
<https://doi.org/10.1080/01635589209514201>
- Sumere, B. R., de Souza, M. C., dos Santos, M. P., Bezerra, R. M. N., da Cunha, D. T., Martinez, J., & Rostagno, M. A. (2018). Combining pressurized liquids with ultrasound to improve the extraction of phenolic compounds from pomegranate peel (*Punica granatum L.*). *Ultrasonics Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.05.028>
- Tanase, C., Coşarcă, S., & Muntean, D.-L. (2019). A Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity. *Molecules*, 24(6), 1182. <https://doi.org/10.3390/molecules24061182>
- Taylor, S. L., & King, J. W. (2002). Preparative-scale supercritical fluid extraction/supercritical fluid chromatography of corn bran. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*.
<https://doi.org/10.1007/s11746-002-0616-1>
- Treutter, D. (2001). Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1023/A:1013378702940>
- Tsao, R., Yang, R., Xie, S., Sockovie, E., & Khanizadeh, S. (2005). Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf048289h>
- Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Classification of Phenolic Compounds in Plants. In *Polyphenols in Plants* (pp. 263–284). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00026-8>
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines*, 5(3), 93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>
- Ullah, R., Ikram, M., Park, T. J., Ahmad, R., Saeed, K., Alam, S. I., Rehman, I. U., Khan, A.,

- Khan, I., Jo, M. G., & Kim, M. O. (2020). Vanillic Acid, a Bioactive Phenolic Compound, Counteracts LPS-Induced Neurotoxicity by Regulating c-Jun N-Terminal Kinase in Mouse Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 361. <https://doi.org/10.3390/ijms22010361>
- Valdebenito-Sanhueza, R. M. (2003). *Produção Integrada de Maçãs no Brasil*. Sistema de Produção.
- Van der Sluis, A. A., Dekker, M., De Jager, A., & Jongen, W. M. F. (2001). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf001493u>
- Van der Sluis, Addie A., Dekker, M., Skrede, G., & Jongen, W. M. F. (2002). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf020115h>
- Vanzani, P., Rossetto, M., Rigo, A., Vrhovsek, U., Mattivi, F., D'Amato, E., & Scarpa, A. M. (2005). Major phytochemicals in apple cultivars: Contribution to peroxy radical trapping efficiency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf040482o>
- Ventura, S. P. M., e Silva, F. A., Quental, M. V, Mondal, D., Freire, M. G., & Coutinho, J. A. P. (2017). Ionic-liquid-mediated extraction and separation processes for bioactive compounds: past, present, and future trends. *Chemical Reviews*, 117(10), 6984–7052.
- Viganó, J., Aguiar, A. C., Moraes, D. R., Jara, J. L. P., Eberlin, M. N., Cazarin, C. B. B., Maróstica, M. R., & Martínez, J. (2016). Sequential high pressure extractions applied to recover piceatannol and scirpusin B from passion fruit bagasse. *Food Research International*, 85, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.015>
- Viganó, J., Assis, B. F. de P., Náthia-Neves, G., dos Santos, P., Meireles, M. A. A., Veggi, P. C., & Martínez, J. (2020). Extraction of bioactive compounds from defatted passion fruit bagasse (*Passiflora edulis* sp.) applying pressurized liquids assisted by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64, 104999. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.104999>
- Viganó, J., de Aguiar, A. C., Veggi, P. C., Sanches, V. L., Rostagno, M. A., & Martínez, J. (2022). Techno-economic evaluation for recovering phenolic compounds from acai (*Euterpe oleracea*) by-product by pressurized liquid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 179, 105413. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2021.105413>
- Viganó, J., Sanches, V. L., de Souza Mesquita, L. M., de Souza, M. C., da Silva, L. C., Chaves, J. O., Forster-Carneiro, T., & Rostagno, M. A. (2021). Comprehensive analysis of phenolic compounds from natural products: Integrating sample preparation and analysis. *Analytica Chimica Acta*, 1178, 338845. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338845>
- Viganó, J., Zabet, G. L., & Martínez, J. (2017). Supercritical fluid and pressurized liquid extractions of phytonutrients from passion fruit by-products: Economic evaluation of sequential multi-stage and single-stage processes. *The Journal of Supercritical Fluids*, 122, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.12.006>
- Wang, Lijun, & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. In *Trends in Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>
- Wang, Lu, Boussetta, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2018). Selectivity of ultrasound-assisted aqueous extraction of valuable compounds from flesh and peel of apple tissues. *LWT*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.007>
- Wang, Lu, Boussetta, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2019). Ultrasound assisted purification of polyphenols of apple skins by adsorption/desorption procedure. *Ultrasonics Sonochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.03.002>
- Wang, X., Yang, Y., An, Y., & Fang, G. (2019). The mechanism of anticancer action and potential

- clinical use of kaempferol in the treatment of breast cancer. In *Biomedicine and Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109086>
- Wijngaard, H., & Brunton, N. (2009). The optimization of extraction of antioxidants from apple pomace by pressurized liquids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf902498y>
- Wiktor, A., Sledz, M., Nowacka, M., Rybak, K., & Witrowa-Rajchert, D. (2016). The influence of immersion and contact ultrasound treatment on selected properties of the apple tissue. *Applied Acoustics*. <https://doi.org/10.1016/j.apacoust.2015.05.001>
- Withoutuck, H., Boeykens, A., Vanden Broucke, M., Moreira, M. M., Delerue-Matos, C., & De Cooman, L. (2019). Evaluation of the impact of pre-treatment and extraction conditions on the polyphenolic profile and antioxidant activity of Belgium apple wood. *European Food Research and Technology*, 245(11), 2565–2578. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03373-2>
- Wu, X., Cao, G., & Prior, R. L. (2002). Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *The Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1093/jn/132.7.1865>
- Xu, D.-P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J.-J., & Li, H.-B. (2017). Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 96. <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>
- Xu, Y., Fan, M., Ran, J., Zhang, T., Sun, H., Dong, M., Zhang, Z., & Zheng, H. (2016). Variation in phenolic compounds and antioxidant activity in apple seeds of seven cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(3), 379–388. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.002>
- Yue, T., Shao, D., Yuan, Y., Wang, Z., & Qiang, C. (2012). Ultrasound-assisted extraction, HPLC analysis, and antioxidant activity of polyphenols from unripe apple. *Journal of Separation Science*. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200295>
- Zhang, X., Xu, J., Xu, Z., Sun, X., Zhu, J., & Zhang, Y. (2020). Analysis of Antioxidant Activity and Flavonoids Metabolites in Peel and Flesh of Red-Fleshed Apple Varieties. *Molecules*, 25(8), 1968. <https://doi.org/10.3390/molecules25081968>
- Zhi, K., Li, M., Bai, J., Wu, Y., Zhou, S., Zhang, X., & Qu, L. (2016). Quercitrin treatment protects endothelial progenitor cells from oxidative damage via inducing autophagy through extracellular signal-regulated kinase. *Angiogenesis*. <https://doi.org/10.1007/s10456-016-9504-y>
- Zhou, L., Xiong, Z., Liu, W., & Zou, L. (2017). Different inhibition mechanisms of gentisic acid and cyaniding-3-O-glucoside on polyphenoloxidase. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.010>

ANEXOS

Anexo 1 – Primeira página do artigo referência para o desenvolvimento do capítulo 1 desta tese



Recent advances and trends in extraction techniques to recover polyphenols compounds from apple by-products

Laise C. da Silva^a, Juliane Viganó^a, Leonardo M. de Souza Mesquita^a, Arthur L. Baião Dias^b, Mariana C. de Souza^a, Vitor L. Sanches^a, Jaisa O. Chaves^a, Rodrigo S. Pizani^a, Leticia S. Contieri^a, Mauricio A. Rostagno^{a,*}

^a Multidisciplinary Laboratory of Food and Health (LabMAS), School of Applied Sciences (FCA), University of Campinas (UNICAMP), Rua Pedro Zaccaria 1300, 13484-350 Limeira, SP, Brazil

^b Laboratory of High Pressure in Food Engineering, School of Food Engineering (FEA), University of Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato 80, 13083-862 Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keyword:
Apple pomace
Malus sp.
Phenolics compounds
Bioactive compounds
Conventional extraction
Non-conventional extraction

ABSTRACT

Apple is one of the most consumed fruits worldwide and has recognized nutritional properties. Besides being consumed fresh, it is the raw material for several food products, whose production chain generates a considerable amount of by-products that currently have an underestimated use. These by-products are a rich source of chemical compounds with several potential applications. Therefore, new ambitious platforms focused on reusing are needed, targeting a process chain that achieves well-defined products and mitigates waste generation. This review covers an essential part of the apple by-products reuse chain. The apple composition regarding phenolic compounds subclasses is addressed and related to biological activities. The extraction processes to recover apple biocompounds have been revised, and an up-to-date overview of the scientific literature on conventional and emerging extraction techniques adopted over the past decade is reported. Finally, gaps and future trends related to the management of apple by-products are critically presented.

1. Introduction

Apples (*Malus* sp.) are among the most popular fruits consumed worldwide and are a rich source of valuable chemical compounds (e.g., polyphenols, pectin, and fibers) in the human diet. Bioactive compounds such as polyphenols are naturally produced by a plant or induced by physical or chemical stresses. Generally, polyphenols act as regulators of growth factors and secondary antioxidant defense in different vegetable tissues. These compounds act as antioxidants and anti-inflammatory agents for human health, playing an important role in preventing (or treat) non-communicable chronic diseases (Kumar & Pandey, 2013; Ponte et al., 2021).

Due to the wide variety of phenolic compounds and potential biological properties, the investigation of apple and apple by-products is a boundless field, notably focusing on a better understanding of the main bioactive compounds, the most appropriate extraction methods, purification techniques, and refinement of the final product and its biological applications and analysis methods. Thus, this review aims to fill part of this gap by gathering studies from the past two decades dealing with

phenolic extraction from apple and apple by-products through conventional and non-conventional techniques. The primary fruit compounds are comprehensively summarized, and the future trends and perspectives for apple by-product extraction are provided.

2. Apple and its main bioactive compounds

>60 phenolic compounds are currently identified in apple fruit. They are part of plants' secondary metabolism, performing essential roles, such as growth, defense mechanisms against pathogens, coloring, and aroma properties. Moreover, they are vital to growth and reproduction and are synthesized mainly when the plant is submitted to stressful conditions, such as infections, wounds, and ultra-violet radiation (Haminiuk et al., 2012; Hyson, 2011).

Phenolic compounds have one or more aromatic rings in their molecular structures with one or more hydroxyl groups, which are related to the human body's antioxidant properties, i.e., they react with free radicals forming stable radicals (Fu et al., 2011). The antioxidant properties promote biological benefits such as anti-cancer,

* Corresponding author.

<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100133>

Received 14 July 2021; Received in revised form 3 September 2021; Accepted 22 September 2021

Available online 25 September 2021

2590-1575/© 2021 The Author(s).

Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Anexo 2 – Primeira página do artigo referência para o desenvolvimento do capítulo 2 desta tese

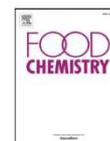
Food Chemistry 318 (2020) 126450



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Simultaneous extraction and separation of bioactive compounds from apple pomace using pressurized liquids coupled on-line with solid-phase extraction



Laise C. da Silva^a, Mariana C. Souza^a, Beatriz R. Sumere^a, Luiz G.S. Silva^a, Diogo T. da Cunha^a, Gerardo F. Barbero^b, Rosangela M.N. Bezerra^a, Mauricio A. Rostagno^{a,*}

^a Multidisciplinary Laboratory of Food and Health (LabMAS), School of Applied Sciences (FCA), University of Campinas (UNICAMP), Rua Pedro Zaccaria, n. 1300, 13484-350 Limeira, SP, Brazil

^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Cadiz, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), IVAGRO, P.O. Box 40, 11510 Puerto Real, Cadiz, Spain

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:
Gallic acid (PubChem CID: 370)
Chlorogenic acid (PubChem CID: 1794427)
Epicatechin (PubChem CID: 722276)
Rutin (PubChem CID: 5280805)
Hyperoside (PubChem CID: 5281643)
Quercetin rhamnoside (PubChem CID: 5353915)
Phloretin xylosil glucoside
Phlorizin (PubChem CID: 6072)

Keywords:

Apple pomace
Phenolics
Flavonoids
Pressurized liquid extraction
Solid-phase extraction

ABSTRACT

The objective of this work was the development of an on-line extraction/fractionation method based on the coupling of pressurized liquid extraction and solid-phase extraction for the separation of phenolic compounds from apple pomace. Several variables of the process were evaluated, including the amount of water of the first stage (0–120 mL), temperature (60–80 °C), solid-phase extraction adsorbent (Septra, Isolute, Strata X and Oasis) and activation/elution solvent (methanol and ethanol). The best results were observed with the adsorbent Septra. The temperature had a small effect on recovery, but significant differences were observed for phlorizin and a quercetin derivative. Results indicate that ethanol can be used to replace methanol as an activation, extraction/elution solvent. While using mostly green solvents (water, ethanol, and a small amount of methanol that could be reused), the developed method produced higher or similar yields of acids (2.85 ± 0.19 mg/g) and flavonoids (0.97 ± 0.11 mg/g) than conventional methods.

1. Introduction

Mounting evidences are suggesting that several naturally occurring chemical compounds in fruit residues have biological properties with potential to be used for the prevention and treatment of the main causes of death worldwide, such as cardiovascular diseases and cancer (Babbar, Oberoi, & Sandhu, 2015; Baiano, 2014; Rostagno and Prado, 2013). Phenolics are one of the most studied bioactive compounds due to their high antioxidant capacity, which is associated with health benefits and the prevention of oxidative stress. However, their effects on the organism are far more complex and may involve interference in cell cycle and signaling, anti-inflammatory properties, and physiological effects (García-Lafuente, Guillamón, Villares, Rostagno, &

Martínez, 2009; Maleki, Crespo, & Cabanillas, 2019).

Among fruits, apple is known to contain large quantities of phenolic compounds, including phenolic acids (such as gallic), flavanols (such as epicatechin), flavonols (such as quercetin and its derivatives) and dihydrochalcones (such as phloretin and phlorizin) (Suárez et al., 2010). Evidence suggests that phlorizin is uniquely found in apples and apple products (Lee, Chan, & Mitchell, 2017).

The greater part of the apple phenolics is found in the cell vacuoles, and their concentration is higher in the peel when compared to other tissues of the fruit. It is estimated that between 0.6 and 18% of the phenolic compounds are extracted with the juice, and therefore most phenolics remain in the pomace (Grigoros, Destandau, Fougère, & Elfakir, 2013). More importantly, the pomace can make up to 35% of

* Corresponding author.

E-mail addresses: diogo.cunha@fca.unicamp.br (D.T. da Cunha), gerardo.fernandez@uca.es (G.F. Barbero), rosangela.bezerra@fca.unicamp.br (R.M.N. Bezerra), mauricio.rostagno@fca.unicamp.br (M.A. Rostagno).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126450>

Received 19 August 2019; Received in revised form 18 February 2020; Accepted 18 February 2020

Available online 19 February 2020

0308-8146/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Anexo 3 – Patente 1: PROCESSO DE SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM MATRIZES VEGETAIS. 2020, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020200171895. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 21/08/2020.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 017189 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 46068425000133

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária Zeferino Vaz

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13084-971

País: Brasil

Telefone:

Fax:

Email: patentes@nova.unicamp.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 21/08/2020 às 19:14, Petição 870200105633

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM MATRIZES VEGETAIS

Resumo: A presente invenção se refere a um processo de separação e extração de compostos fenólicos em matrizes vegetais, possuindo aplicação nas indústrias químicas de produtos naturais. O processo de extração através da combinação de uma técnica de extração alta pressão com um adsorvente em linha e por meio de um gradiente de solventes permite realizar simultaneamente a extração e o fracionamento dos compostos da matéria-prima, que são coletados em frações diferentes sem que ocorra a degradação dos compostos. A obtenção de compostos fenólicos purificados a partir de uma matriz vegetal permite aplicação desses compostos em diversas áreas como na indústria química, farmacêutica, e de alimentos.

Figura a publicar: 1

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Raquel Moutinho Barbosa

Numero OAB:

Numero API:

CPF/CNPJ: 30579878856

Endereço: Rua Roxo Moreira, 1831

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13083-591

Telefone: 1935212620

Fax:

Email: raquel.barbosa@nova.unicamp.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 21/08/2020 às 19:14, Petição 870200105633

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 3

Nome: MAURICIO ARIEL ROSTAGNO
CPF: 00905974603
Nacionalidade: Argentina
Qualificação Física: Professor do ensino superior
Endereço: Cond. Espaço e Verde 2, Casa 18, Estrada da Rhodia
Cidade: Campinas
Estado: SP
CEP: 13085-000
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email: mauricio.rostagno@fca.unicamp.br

Inventor 2 de 3

Nome: MARIANA CORRÊA DE SOUZA
CPF: 42607536812
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação
Endereço: Avenida Homero Vasconcelos de Souza Camargo, 859
Cidade: Campinas
Estado: SP
CEP: 13060-830
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email: marianacorreasouza.mc@gmail.com

Inventor 3 de 3

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 21/08/2020 às 19:14, Petição 870200105633

Nome: LAISE CAPELASSO DA SILVA
CPF: 52707490253
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação
Endereço: Avenida Academico Luis A A Bitencourt, 200
Cidade: Limeira
Estado: SP
CEP: 13484-458
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email: laisecapellasso@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Resumo	1540_RESUMO_210820.pdf
Relatório Descritivo	1540_RELATORIO DESCRITIVO_210820.pdf
Reivindicação	1540_REIVINDICACOES_210820.pdf
Desenho	1540_FIGURAS_210820.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	1540_GRU_DEPOSITO_28370_130320.pdf
Procuração	Procuracao_Unicamp_INPI.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 21/08/2020 às 19:14, Petição 870200105633

Anexo 4 – Patente 2: PROCESSO DE SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS PROVENIENTES DE MATRIZES VEGETAIS COM DETECÇÃO EM LINHA. 2021, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1320210151691. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 30/07/2021.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 13 2021 015169 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 46068425000133

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária Zeferino Vaz

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13084-971

País: Brasil

Telefone:

Fax:

Email: patentes@inova.unicamp.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 30/07/2021 às 18:38, Petição 870210069836

Dados do Pedido

Natureza Patente: 13 - Certificado de Adição (C)

Pedido Original: BR1020200171895

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS PROVENIENTES DE MATRIZES VEGETAIS COM DETECÇÃO EM LINHA

Resumo: O presente certificado de adição de invenção refere-se a um processo de extração/recuperação e fracionamento de compostos bioativos de matrizes vegetais, preferencialmente provenientes de Erva-mate, a qual possui aplicação no ramo alimentar, farmacêutico e químico. O processo desenvolvido possibilita a otimização em termos processuais (tempo, fluxo, pH, temperatura), utilizando técnicas de acoplamento avançadas que consiste inicialmente em uma macro etapa principal de extração de líquidos pressurizados (PLE) seguida em linha de uma etapa de extração em fase sólida (SPE). O presente certificado de adição possibilitou a recuperação de elevados teores de ácidos fenólicos, cafeína e flavonoides, os quais são preferencialmente recuperados em diferentes frações separadas e concentradas.

Figura a publicar: 1

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Raquel Moutinho Barbosa

Numero OAB:

Numero API:

CPF/CNPJ: 30579878856

Endereço: Rua Roxo Moreira, 1831

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13083-591

Telefone: 1935212620

Fax:

Email: raquel.barbosa@inova.unicamp.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 30/07/2021 às 18:38, Petição 870210069836

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 7

Nome: MAURICIO ARIEL ROSTAGNO
CPF: 00905974603
Nacionalidade: Argentina
Qualificação Física: Professor do ensino superior
Endereço: Cond. Espaço e Verde 2, Casa 18, Estrada da Rhodia
Cidade: Campinas
Estado: SP
CEP: 13085-000
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email: mauricio.rostagno@fca.unicamp.br

Inventor 2 de 7

Nome: TANIA FORSTER CARNEIRO
CPF: 15313201808
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Professor do ensino superior
Endereço: Estrada da Rhodia, 7150, casa 18
Cidade: Campinas
Estado: SP
CEP: 13085-906
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email: taniafc@unicamp.br

Inventor 3 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 30/07/2021 às 18:38, Petição 870210069836

Nome: JAÍSA OLIVEIRA CHAVES

CPF: 09977877670

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Avenida Libertino Pizani, 489, ap 2

Cidade: Limeira

Estado: SP

CEP: 13484-666

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: jaisa.chaves@gmail.com

Inventor 4 de 7

Nome: LAISE CAPELASSO DA SILVA

CPF: 52707490253

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Avenida Academico Luis A A Bitencourt, 200

Cidade: Limeira

Estado: SP

CEP: 13484-458

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: laisecapelasso@gmail.com

Inventor 5 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 30/07/2021 às 18:38, Petição 870210069836

Nome: MARIANA CORRÊA DE SOUZA

CPF: 42607536812

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Avenida Homero Vasconcelos de Souza Camargo, 859

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13060-830

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: marianacorreasouza.mc@gmail.com

Inventor 6 de 7

Nome: VITOR LACERDA SANCHES

CPF: 34494884812

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Geraldo Felisberto de Souza, 154

Cidade: Sumaré

Estado: SP

CEP: 13171-829

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: vitorls@unicamp.br

Inventor 7 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 30/07/2021 às 18:38, Petição 870210069836

Nome: LEONARDO MENDES DE SOUZA MESQUITA
CPF: 38429258833
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação
Endereço: Rua Benjamin Constant, 252
Cidade: Santos
Estado: SP
CEP: 11040-140
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email: mesquitams@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	1631_RELATORIO DESCRITIVO_290721.pdf
Desenho	1631_FIGURAS_290721.pdf
Reivindicação	1631_REIVINDICACOES_290721.pdf
Resumo	1631_RESUMO_290721.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	1631_GRU_DEPOSITO_150920.pdf
Procuração	INPI_PROCURAÇÃO_290621_1380261.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 30/07/2021 às 18:38, Petição 870210069836

Anexo 5 – Licença da editora Elsevier para utilização de dados do artigo que deu base ao primeiro capítulo desta tese.



Recent advances and trends in extraction techniques to recover polyphenols compounds from apple by-products

Author:

Laise C. da Silva, Juliane Viganó, Leonardo M. de Souza Mesquita, Arthur L. Baião Dias, Mariana C. de Souza, Vitor L. Sanches, Jaisa O. Chaves, Rodrigo S. Pizani, Leticia S. Contieri, Mauricio A. Rostagno

Publication: Food Chemistry; X

Publisher: Elsevier

Date: 30 December 2021

© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Ltd.

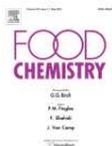
Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

Anexo 6 – Licença da editora Elsevier para utilização de dados do artigo que deu base ao segundo capítulo desta tese.



Simultaneous extraction and separation of bioactive compounds from apple pomace using pressurized liquids coupled on-line with solid-phase extraction

Author:

Laise C. da Silva, Mariana C. Souza, Beatriz R. Sumere, Luiz G.S. Silva, Diogo T. da Cunha, Gerardo F. Barbero, Rosângela M.N. Bezerra, Mauricio A. Rostagno

Publication: Food Chemistry

Publisher: Elsevier

Date: 15 July 2020

© 2020 Elsevier Ltd.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW