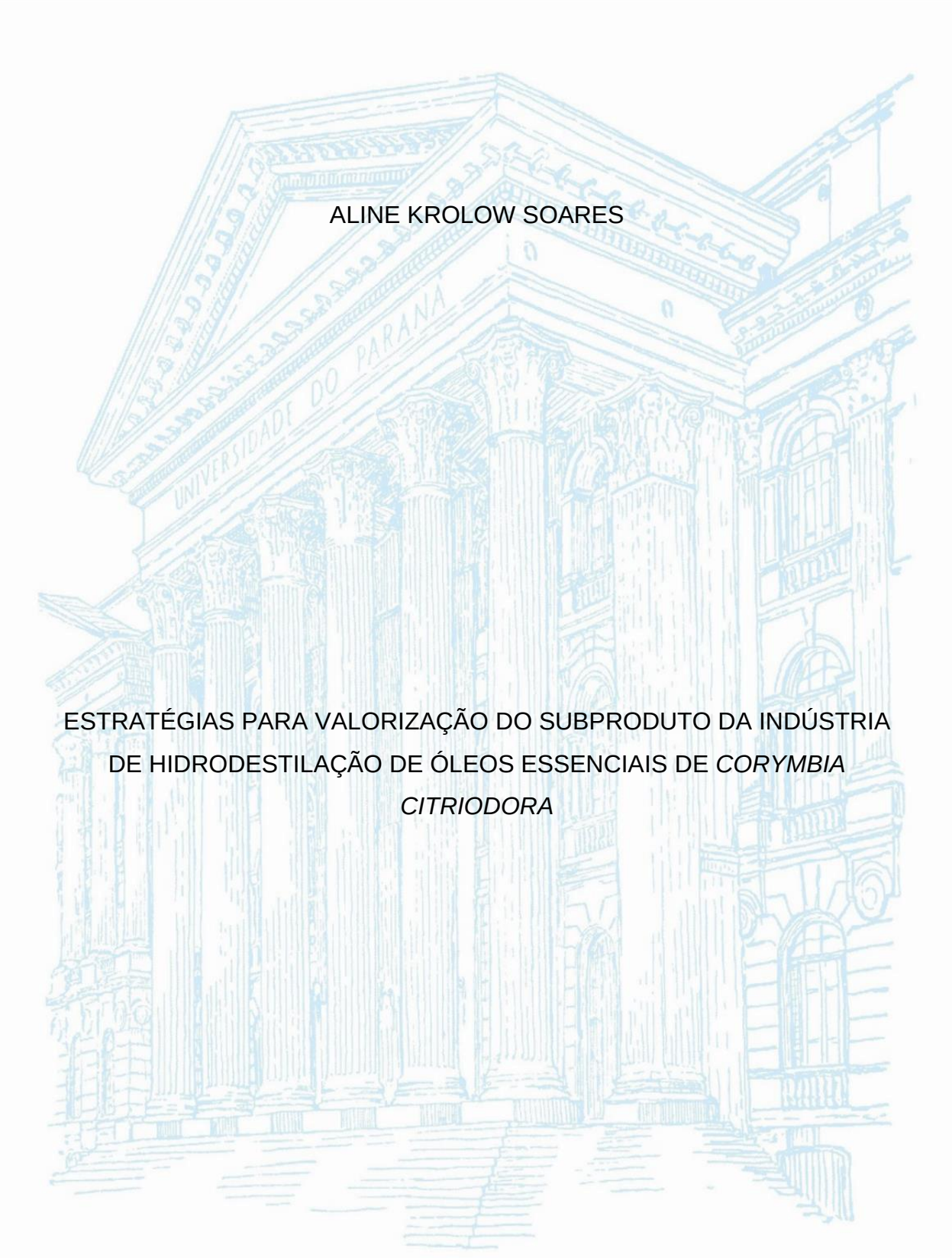
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



ALINE KROLOW SOARES

ESTRATÉGIAS PARA VALORIZAÇÃO DO SUBPRODUTO DA INDÚSTRIA DE HIDRODESTILAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *CORYMBIA CITRIODORA*

CURITIBA

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE KROLOW SOARES

ESTRATÉGIAS PARA VALORIZAÇÃO DO SUBPRODUTO DA INDÚSTRIA DE HIDRODESTILAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *CORYMBIA CITRIODORA*

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais (PIPE). Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Linha de Pesquisa: Materiais de Engenharia

Orientador: Dr. Washington Luiz Esteves Magalhães
Coorientadores: Dr. Pedro Henrique Gonzalez de Cademartori e Dr. Mailson Matos

CURITIBA
2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Soares, Aline Krolow
Estratégias para valorização do subproduto da indústria de hidrodestilação de óleos essenciais de *corymbia citriodora* / Aline Krolow Soares. – Curitiba, 2023.
1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais (PIPE).

Orientador: Dr. Washington Luiz Esteves Magalhães.
Coorientadores: Dr. Pedro Henrique Gonzalez de Cademartori e Dr. Mailson Matos.

1. Eucalipto. 2. Biorrefinaria. 3. Hidrodestilação. I. Magalhães, Washington Luiz Esteves. II. Cademartori, Pedro Henrique Gonzalez de. III. Matos, Mailson. IV. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais. V. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ALINE KROLOW SOARES** intitulada: **ESTRATÉGIAS PARA VALORIZAÇÃO DO SUBPRODUTO DA INDUSTRIA DE HIDRODESTILAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DA *CORYMBIA CITRIODORA***, sob orientação do Prof. Dr. WASHINGTON LUIZ ESTEVES MAGALHÃES, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 10 de Abril de 2023.

Assinatura Eletrônica
11/04/2023 07:56:14.0
WASHINGTON LUIZ ESTEVES MAGALHÃES
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
11/04/2023 09:46:43.0
CRISTIANE VIEIRA HELM
Avaliador Externo (EMBRAPA FLORESTAS)

Assinatura Eletrônica
12/04/2023 09:03:58.0
GRACIELA INES BOLZON DE MUNIZ
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
11/04/2023 04:30:23.0
TAINISE VERGARA LOURENÇON
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
10/04/2023 15:24:19.0
CAMILLA KARLA BRITES QUEIROZ MARTINS DE OLIVEIRA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
11/04/2023 05:59:57.0
MAILSON DE MATOS
Coorientador(a) (INSTITUTO SENAI DE INOVAÇÃO EM ELETROQUÍMICA)

Assinatura Eletrônica
10/04/2023 16:48:51.0
PEDRO HENRIQUE GONZALEZ DE CADEMARTORI
Coorientador(a) (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

“Somos o que fazemos, mas somos, principalmente, o que fazemos para mudar o que somos.”

Eduardo Galeano

AGRADECIMENTOS

Neste momento de conclusão, é imprescindível agradecer a todos aqueles que estiveram presentes nessa longa jornada chamada doutorado. Meu primeiro agradecimento é aos meus pais, Rudinei e Vanilda, pelo incentivo durante minha carreira acadêmica, pelo apoio, amor e suporte emocional. Por sempre estarem presentes para ouvir minhas alegrias e frustações. Por se orgulharem de cada passo e conquista da minha vida e por compreenderem minhas ausências e ansiedades nesse caminho que segui distante deles.

Agradeço à minha irmã, Liane, que é meu exemplo desde que eu aprendi a ser quem sou. Por me ensinar matemática na infância e química depois de adulta, mas, principalmente, me ensinar sobre caráter e inteligência emocional nos momentos mais difíceis. Por ser minha melhor amiga e maior incentivadora em todas as minhas decisões e por nunca me deixar desamparada.

Agradeço aos meus grandes amigos Pedro, Carolina, João Pedro e Renata Lara, por ajudarem a tornar minha vida em Curitiba mais agradável, pelo apoio constante e incentivo para ser sempre a melhor pessoa que eu poderia ser. Obrigada por serem pessoas com quem posso compartilhar minha vida e considero família.

Aos meus amigos da ONG Semeando Amor, por serem luz nesta cidade distante, em especial agradeço à Letícia, Raquel, Algacir, Mateus, Marcele e Anselmo, que foram grandes conselheiros, compreensíveis nas minhas ausências e forneceram apoio emocional, fundamental para que eu alcançasse minhas metas. Agradeço também ao apoio do Grupo de Voluntários do Hospital Universitário Cajuru, em especial à Nilza e à Marcinha, por serem incríveis, cheias de saberia e pelo acolhimento. Não tenho como descrever a importância de suas presenças, principalmente durante a pandemia, em que a tela do celular se tornou a única forma de nos aproximarmos uns dos outros.

Ao meu orientador Washington, que me confiou a oportunidade de realizar essa pesquisa. Aos meus coorientadores Pedro e Mailson, que foram importantes, cada um em uma etapa diferente da realização desta tese, tenho muito orgulho de aprender com esses três profissionais durante minha trajetória acadêmica.

Agradeço à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Florestas, pela disponibilização de espaço para realizar esta pesquisa e aos colaboradores Fabrício, Dayanne, Arnaldo, Mário, Cristiane, Patrícia, Edson e Juliana pelo auxílio.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão de bolsas e provimento de recursos para o desenvolvimento deste trabalho. E à Universidade Federal do Paraná – UFPR, que forneceu além de uma infraestrutura magnífica, também forneceu suporte médico acessível, que foi indispensável.

Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais – PIPE, em especial à Neiva, pelo auxílio esclarecedor sempre que solicitei seus serviços burocráticos e administrativos. E aos professores e pesquisadores que contribuíram com o meu aprendizado e desenvolvimento, Darci Gatto, André Missio, Rilton de Freitas, Evaldo Ribeiro, Mayara Carneiro e Daniela Leme. Gostaria de agradecer também ao Rafael Luiz, que foi mais do que um ouvinte dos meus temores, foi também o responsável por construir minhas tabelas de cromatografia de forma ágil e eficiente.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia da Madeira, Francine, Gabriel, Tielidy, Caroline, Francielen, Mirela, Soraia, Matheus, Leandro M., Leandro V., Ângelo, Elaine, Giovanna, Letícia e Natália. Agradeço o apoio e a amizade durante esses anos. Agradeço também ao Grupo de Nanotecnologia Agroflorestal – GNano Agro, Alice, Daniel, Ivana, Iza, Lincoln, Rosinaldo e Tawani, pela acolhida e conversas edificantes. Compartilhamos momentos de alegrias, tristezas, frustrações, aprendizados, ansiedades e de amadurecimento nesta longa caminhada que aqui se conclui.

RESUMO

O método de extração de óleo essencial mais comum é a hidrodestilação por arraste a vapor, que é eficiente, mas resulta em um grande volume de subprodutos. Tais subprodutos são o extrato aquoso e a biomassa residual, que representam mais de 95% do material extraído. O extrato aquoso é constituído pela fração de compostos químicos solúveis em água quente extraídos das folhas durante o processo de hidrodestilação, como polifenóis, flavonoides, taninos, açúcares e seus derivados. Nesse contexto, estudou-se o reaproveitamento dos subprodutos da hidrodestilação por arraste a vapor das folhas de *C. citriodora*, através de extrações sequenciais com reaproveitamento do extrato para concentração de compostos bioativos visando aplicações em produtos de maior valor comercial. Foi possível reutilizar o extrato aquoso até sete vezes para obter sólidos máximos de 49,94 g L^{-1} sem perda de rendimento de óleo essencial, dos quais 17,19 g L^{-1} são polifenóis e 7,31 g L^{-1} são açúcares. Aminoácidos e ácidos orgânicos também foram encontrados em abundância no extrato. Observou-se que a exposição prolongada às temperaturas de extração (100 °C) promoveram o aumento dos taninos hidrolisáveis no extrato. O extrato com maior concentração de compostos foi separado utilizando colunas de sílica e polimérica, onde a coluna de sílica foi mais eficiente na recuperação de açúcares (99% açúcares totais, 72,5% polifenóis) enquanto a coluna polimérica foi mais eficiente para recuperar polifenóis (71% açúcares totais, 82 % de polifenóis). Embora a recuperação de açúcares seja maior para a coluna de sílica, as colunas poliméricas são mais vantajosas em termos de custo e uso escalonável para a indústria. A fração contendo maior concentração de açúcares recuperados com coluna polimérica foi utilizada na fermentação bacteriana (*L. bulgaricus*) para produção de ácido lático, onde foi obtido um rendimento de 2,5 g L^{-1} de ácido lático em 72h de fermentação. Portanto, em um contexto de biorrefinaria na indústria de óleos essenciais, concluiu-se que foi possível o reaproveitamento da água residual da hidrodestilação, para concentrar compostos de maior valor econômico tais como taninos hidrolisáveis, ciclitóis açúcares e a partir destes açúcares produzir ácido lático.

Palavras-chave: *Corymbia citriodora*, eucalipto, hidrodestilação, bioeconomia, biorrefinaria.

ABSTRACT

The most common essential oil extraction method is hydrodistillation by steam dragging, which is efficient but results in a large volume of by-products, which are underused within industries, such by-products are the aqueous extract and residual biomass, that representing more than 95% of the extracted material. The aqueous extract consists of the fraction of chemical compounds soluble in hot water extracted from the leaves during hydrodistillation process, such as polyphenols, flavonoids, tannins, sugars, and their derivatives. These bioactive compounds can be exploited for a wide range of applications with higher commercial value as in reagent standards or in functional foods with antioxidant activity. Here, we characterized the by-products of the hydrodistillation industry by steam dragging of *C. citriodora* leaves, through sequential extractions with reuse of the extract for concentration of bioactive compounds envisage further application. It was possible to reuse the aqueous extract up to seven times to obtain maximum solids of 49.94 g L^{-1} without loss of essential oil yield, of which 17.19 g L^{-1} are polyphenols and 7.31 g L^{-1} are sugars, amino acids and organic acids were also found in abundance in the extract. It was observed that prolonged exposure to extraction temperatures (100 °C) promoted an increase in hydrolyzable tannins in the extract. The extracts with the highest concentration of compounds were separated using silica and polymeric columns, where the silica column was more efficient in the recovery of sugars (99% total sugars, 72.5% polyphenols) while the polymeric column was more efficient to recover polyphenols (71% total sugars, 82% polyphenols). Although the recovery of sugars is higher for silica column, polymeric columns are more advantageous in terms of cost and scalable usage for industry. The fractions containing the highest concentration of sugars recovered with the polymeric columns were used in conducting experiments on bacterial fermentation (*L. bulgaricus*) to produce lactic acid, where a yield of 2.5 g L^{-1} of lactic acid was obtained in 72 h of fermentation. Therefore, based on it is concluded that it is possible to reuse the residual water from hydrodistillation, to concentrate compounds of greater economic value such as hydrolysable tannins, cyclol, sugars and from these sugars to produce lactic acid.

Keywords: *Corymbia citriodora*, *Eucalyptus*, hydrodistillation, bioeconomy, biorefinery

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DE COMPOSTOS ISOLADOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS. 20

FIGURA 2 – ESQUEMA DE UM CONJUNTO DE DESTILADOR INDUSTRIAL PARA ÓLEOS ESSENCIAIS. 24

FIGURA 3 – ESQUEMA DA DESTILAÇÃO EM ESCALA LABORATORIAL E OS SUBPRODUTOS GERADOS. 26

FIGURA 4 - FLORESTA DE EUCALIPTO NO BRASIL. 27

FIGURA 5 - ASPECTO DA C. citriodora, FOLHAS, FLORES E TRONCO. 32

FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO LÁTICO E SEU MODELO MOLECULAR, RESPECTIVAMENTE. 37

FIGURA 7 - DIAGRAMA DAS APLICAÇÕES DO ÁCIDO LÁTICO. 38

FIGURA 8 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS REALIZADAS. 43

FIGURA 9 - TEOR DE SÓLIDOS PARA OS EXTRATOS OBTIDOS AO LONGO DAS DEZ EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS. 50

FIGURA 10 - TEOR DE POLIFENÓIS, FLAVONOIDES E TANINOS AO LONGO DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS. 51

FIGURA 11 – CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES PRESENTE NOS EXTRATOS OBTIDOS NAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS. 52

FIGURA 12 - CINÉTICA DOS AÇÚCARES E POLIFENÓIS DO EXTRATO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO. 53

FIGURA 13 - ESPECTROS FTIR DOS EXTRATOS OBTIDOS NA EXTRAÇÃO SEQUENCIAL. 55

FIGURA 14 - ESPECTROS FTIR DO EXTRATO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO. 56

FIGURA 15 - TERMOGRAMAS DE MASSA E DTG OBTIDOS NA EXTRAÇÃO SEQUENCIAL. 57

FIGURA 16 - TERMOGRAMAS e DTG EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO. 58

FIGURA 17 – CROMATOGRAMAS DE DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO MOLECULAR. 59

FIGURA 18 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA EXTRAÇÃO SEQUENCIAL. 65

FIGURA 19 - CINÉTICA DE ADSORÇÃO DE POLIFENÓIS PARA OS ADSORVENTES. 70

FIGURA 20 – ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE POLIFENÓIS PARA OS ADSORVENTES. 71

FIGURA 21 – CAPACIDADE DE RECUPERAÇÃO DE AÇÚCARES NA FRAÇÃO AQUOSA a) F.A.K E b) F.A.K (%) UTILIZANDO COLUNAS DE CONTATO. 72

FIGURA 22 - RECUPERAÇÃO MÉDIA DE AÇÚCARES (g L^{-1}) PARA AS COLUNAS K29 E C18 NAS FRAÇÕES AQUOSAS. 73

FIGURA 23 – a) RECUPERAÇÃO DE POLIFENÓIS (g L^{-1}) PARA AS COLUNAS K29 E C18 NAS FRAÇÕES ETANOICAS, b) TANINO HIDROLISÁVEL E c) TANINO CONDENSÁVEL. 74

FIGURA 24 - CROMATOGRAMAS DAS FRAÇÕES a) ETANOICA E b) AQUOSA PROVENIENTES DOS EXTRATO DE + SEPARADOS A PARTIR DE COLUNAS POLIMÉRICA (K29) E DE SÍLICA (C18). 77

FIGURA 25 – ESPECTROS FTIR DAS FRAÇÕES AQUOSA (F.A.7.P) E ETANOICA (F.E.7.P). 78

FIGURA 26 – TERMOGRAMAS DE MASSA E dTG DAS FRAÇÕES AQUOSA (F.A.K) E ETANOICA (F.E.K). 79

FIGURA 27 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FRAÇÕES FRENTE AOS RADICAIS LIVRES DPPH E ABTS. 80

FIGURA 28 – ILUSTRAÇÃO DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO VIA FERMENTAÇÃO BACTERIANA A PARTIR DE SOLUÇÃO CONCENTRADA DE AÇÚCARES DO EXTRATO DA C. citriodora a) RENDIMENTO DE ÁCIDO LÁTICO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO b) ESPECTRO FTIR DO ÁCIDO LÁTICO PRODUZIDO (72h) E c) PERFIL DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DO PRODUTO (72h). 88

FIGURA 29 – ETAPAS DA SÍNTESE DO ÁCIDO LÁTICO EM LACTIDA. 91

FIGURA 30 – a) REAÇÃO DE SÍNTESE DA LACTIDA; b) ESPECTRO FTIR DO PRODUTO DA SÍNTESE E c) TERMOGRAMA DO PRODUTO DA SÍNTESE. 92

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - ASPECTOS GERAIS

I.1 INTRODUÇÃO GERAL 14
I.2 HIPÓTESE E OBJETIVOS 16
I.2.1 Hipótese 16
I.2.2 Objetivo geral 16
I.2.3 Objetivos específicos 16
I.3 REVISÃO DE LITERATURA 17
I.3.4 Metabolismo das plantas 17
I.3.3 Óleos essenciais 18
I.3.3.1 Mercado de óleos essenciais 21
I.3.3.2 Métodos de extração 23
I.3.3.3 Subprodutos da hidrodestilação 25
I.3.1 O eucalipto 26
I.3.2 *Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson 29
I.3.2.1 C. citriodora no Brasil 30
I.3.2.2 Características gerais da espécie 31
I.3.2.3 Óleo essencial da *C. citriodora* 33
I.3.5 Ácido lático 36

CAPÍTULO II - ESTUDO SOBRE O APROVEITAMENTO DO EXTRATO PROVENIENTE DA HIDRODESTILAÇÃO DE FOLHAS DE *C. citriodora* POR EXTRAÇÃO SEQUENCIAL

II.1 INTRODUÇÃO 41
II.2 MATERIAL E MÉTODOS 42
II.2.1 Obtenção e preparo do material 42
II.2.2 Extração sequencial 43
II.2.3 Rendimento do óleo essencial 43
II.2.4 Caracterização do extrato aquoso 44
II.2.4.1 Sólidos totais 44
II.2.4.2 Teor de fenólicos totais 44
II.2.4.3 Teor de flavonoides 45
II.2.4.4 Teor de taninos 45
II.2.4.5 Teor de açúcares 46
II.2.4.6 Cromatografia a gás com espectrometria de massas 46
II.2.5 Influência do tempo de extração 47
II.2.6 Espectroscopia no infravermelho médio 47
II.2.7 Análise termogravimétrica 47
II.2.8 Cromatografia de exclusão de tamanho 48
II.2.9 Pirólise simultânea e trimetilsililação em conjunto com cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa 48

II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 49
II.3.1 Considerações gerais 49
II.3.2 Cromatografia a gás acoplada espectrometria de massas 54
II.3.3 Espectroscopia no infravermelho médio 55
II.3.4 Análise termogravimétrica 56
II.3.5 Distribuição do tamanho molecular 59
II.3.6 Pirólise simultânea e trimetilsililação em conjunto com cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa 59
II.4 CONCLUSÕES 60

CAPÍTULO III - SEPARAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS A PARTIR DOS EXTRATOS DE *C. citriodora* PROVENIENTES DA HIDRODESTILAÇÃO DAS FOLHAS

III.1 INTRODUÇÃO 63
III.2 MATERIAL E MÉTODOS 64
III.2.1 Obtenção dos materiais das colunas 64
III.2.2 Obtenção e preparo do extrato 64
III.2.3 Cinética de adsorção 65
II.2.4 Isoterma de adsorção de polifenóis 65
II.2.5 Reutilização do adsorvente 66
III.2.6 Separação dos compostos 66
III.2.7 Teor de fenólicos totais 67
III.2.8 Teor de açúcares 67
III.2.9 Cromatografia a gás com espectrometria de massas 67
III.2.10 Pirólise simultânea e trimetilsililação em conjunto com cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa 68
III.2.11 Espectroscopia no infravermelho médio 68
III.2.12 Análise termogravimétrica 69
III.2.13 Capacidade antioxidante das frações 69
III.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 70
III.3.1 Características dos materiais adsorventes 70
III.3.2 Recuperação dos compostos 71
III.3.3 Pirólise simultânea e trimetilsililação em conjunto com cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa 75
III.3.4 Cromatografia a gás com espectrometria de massas 76
III.3.5 Caracterização química e térmica das frações 78
III.3.6 Capacidade antioxidante das frações 80
III.4 CONCLUSÕES 81

CAPÍTULO IV - PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE HIDRODESTILAÇÃO DAS FOLHAS DE *C. citriodora*

IV.1 INTRODUÇÃO 84

IV.2 MATERIAL E MÉTODOS 85
IV.2.1 Matéria prima 85
IV.2.2 Extrações sequenciais 85
IV.2.3 Purificação do extrato aquoso 85
IV.2.4 Fermentação dos açúcares 86
IV.2.4.1 Fermentação 86
IV.2.4.2 Quantificação do ácido lático 86
IV.2.5 Produção de lactida 87
IV.2.5.1 Síntese 87
IV.2.5.2 Purificação 87
IV.2.6 Espectroscopia no infravermelho médio 88
IV.2.8 Análise termogravimétrica 88
IV.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 88
IV.3.1 Fermentação dos açúcares 88
IV.3.2 Síntese da lactida 91
IV.4 CONCLUSÕES 93
CONSIDERAÇÕES FINAIS 94
REFERÊNCIAS 96
LISTA DE PUBLICAÇÕES 109
APÊNDICES 110

CAPÍTULO I

ASPECTOS GERAIS

I.1 INTRODUÇÃO GERAL

Biorrefinarias são modelos em que a biomassa é desconstruída em produtos que podem ser utilizados para outros processos, promovendo a sustentabilidade e minimizando o desperdício. Para materiais lignocelulósicos, esse conceito geralmente é aplicado em produtos já decompostos, como a lignina do processo Kraft (GUO et al., 2022; PINALES-MÁRQUEZ et al., 2021) ou o bio-óleo da pirólise rápida (IGLESIAS et al., 2021; MATOS et al., 2020), para obtenção de produtos com maior valor econômico. Mas e se for possível vislumbrar um modelo de biorrefinaria em que o produto inicial não precise ser desconstruído, como a seiva das folhas, a qual possui compostos que podem ser usados diretamente para produzir produtos químicos de alto valor?

A indústria de óleos essenciais permite colocar em prática esse conceito. A quantidade de óleo essencial na planta é de aproximadamente 2%, o qual é usualmente extraído pelo método de hidrodestilação. Esse método é seguro e simples, realizado através do contato da planta com água em temperatura de ebulição, em que os vapores gerados pela água arrastam os componentes voláteis, que são posteriormente condensados, coletados e separados em óleo essencial e hidrolato (BOSO et al., 2022).

O mercado mundial de óleos essenciais movimentou em 2015 o equivalente a US$ 3,4 bilhões, em um total de 178.800 toneladas no ano. Há a expectativa que a produção anual alcance 370.000 toneladas em 2024 (GRAND VIEW RESEARCH, 2017). Esse vasto aumento do mercado deve-se a fatores como a maior procura por produtos de origem natural, aliado ao conceito de sustentabilidade que têm motivado os consumidores. Além disso, os óleos essenciais são compostos bioativos que possuem importantes atividades biológicas já conhecidas, tais como propriedades antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas e inseticidas (FIALHO; PAPA, 2015).

Entretanto, a produção de óleo essencial pelo método convencional de destilação por arraste a vapor resulta em grande volume de subprodutos que, em geral, são utilizados de forma ineficiente. Isso ocorre devido à ausência de tecnologias eficazes baseadas em estudos científicos. Tais subprodutos do

processo são o extrato aquoso e a biomassa residual, que são constituídos pelos compostos solúveis em água e extraídos do material vegetal durante o processo de destilação e pelos compostos que não foram solubilizados nem volatilizados durante o processo, respectivamente.

Uma biorrefinaria que utiliza os subprodutos da extração de óleos essenciais por hidrodestilação tem potencial de crescimento devido às quantidades alarmantes de água residual gerada durante o processo. Os efluentes gerados podem chegar a 90-95 % para sistemas de bancada pequena e 70-80% para grandes plantas industriais com caldeiras separadas (NAPOLI et al., 2022). Este efluente é um biopoluente que altera o pH do solo, porém, possui muitos compostos bioativos que são importantes matérias-primas em outras indústrias (SLAVOV et al., 2017; WEDLER et al., 2016).

A presente pesquisa traz um exemplo da implantação de conceitos de biorrefinaria em indústria de hidrodestilação de óleos essenciais das folhas de *C. citriodora*, promovendo a reutilização do subproduto líquido (extrato aquoso) e explorando aplicações para os subprodutos obtidos desse processo. As informações obtidas e avaliadas neste trabalho podem contribuir para minimizar a geração de resíduos e para tornar o setor agroindustrial mais sustentável.

Esta tese foi desenvolvida em capítulos, em que o **CAPÍTULO I** traz uma revisão dos conceitos relacionados aos óleos essenciais e à espécie de *C. citriodora*, bem como as possibilidades de aplicações frente à composição dos extratos e os desafios a serem superados para o uso eficiente dos subprodutos obtidos. No **CAPÍTULO II** utilizamos extrações sequenciais como alternativa à recuperação do subproduto aquoso a fim de aumentar a concentração de compostos fitoquímicos valiosos. No **CAPÍTULO III** é apresentada uma estratégia separação para as biomoléculas presentes no extrato aquoso, por meio do uso de colunas de contato. O **CAPÍTULO IV** visa a utilização do extrato aquoso contendo majoritariamente açúcares na fermentação bacteriana para produção de ácido lático.

I.2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

I.2.1 Hipótese

"Os subprodutos do processo de hidrodestilação de óleos essenciais podem ser utilizados para obtenção de compostos de maior valor econômico."

I.2.2 Objetivo geral

Reaproveitar o subproduto líquido da hidrodestilação por arraste a vapor de folhas de *C. citriodora* por meio de extrações sequenciais.

I.2.3 Objetivos específicos

- Otimizar o processo de hidrodestilação de óleos essenciais para que seja possível reutilizar a água residual em novas destilações;
- Buscar o máximo rendimento de compostos fitoquímicos do extrato aquoso e suas mudanças em função das condições de processo;
- Avaliar a composição química dos extratos provenientes das extrações sequenciais;
- Separar compostos de maior valor comercial a partir do extrato aquoso por meio do uso de colunas de sílica e polimérica;
- Produzir ácido lático a partir dos açúcares presentes no extrato aquoso da *C. citriodora*.

I.3 REVISÃO DE LITERATURA

I.3.4 Metabolismo das plantas

Os seres vivos apresentam como característica principal a presença de atividade metabólica. O metabolismo consiste no conjunto de reações químicas que ocorrem constantemente nas células e é indispensável para a degradação e síntese de compostos químicos fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do organismo de animais ou vegetais (BLANCO; BLANCO, 2017). Essas reações podem ser simples ou altamente complexas, como a produção de alimento a partir da conversão de energia solar em energia química, a fotossíntese (MOREIRA, 2013).

A fotossíntese é uma reação realizada por todos os seres autotróficos. Durante a fotossíntese, as plantas utilizam a energia solar para oxidar a água, consequentemente liberando oxigênio, e para reduzir o dióxido de carbono, formando assim grandes compostos carbonados, sobretudo açúcares. A complexa série de reações, que culmina na redução do dióxido de carbono (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Graças à fotossíntese, as folhas sintetizam compostos orgânicos a partir de matéria prima inorgânica, na presença de luz solar. O processo químico consiste na conversão de dióxido de carbono em carboidratos (glucose, frutose, sacarose etc.) e oxigênio (DONG et al., 2019; RYU; BERRY; BALDOCCHI, 2019). Outros compostos catalisados durante a fotossíntese são a clorofila, ácidos carboxílicos do ciclo de Krebs, α-aminoácidos, hidratos de carbono, proteínas e ácidos nucléicos, todos envolvidos nos processos vitais da planta (HALL; RAO, 1980; WHATLEY; WHATLEY, 1982). Estes compostos são, portanto, classificados como pertencentes ao metabolismo primário das plantas.

Ao longo da história evolutiva das plantas, esses vegetais desenvolveram estratégias de defesa contra a extinção. Uma forma dos vegetais lidarem com essas situações de estresse foi através da produção de substâncias para preservar a espécie, por meio de reações entre compostos pertencentes ao metabolismo primário, esses compostos foram classificados posteriormente como os metabólitos secundários das plantas (GARCÍA; CARRIL, 2009).

Cada família, gênero e espécie vegetal produz uma variedade ampla de compostos químicos. Esses compostos são muito usados como marcadores taxonômicos na classificação botânica de plantas. Embora os metabólitos secundários não possuam um papel categórico para o crescimento, desenvolvimento e reprodução das células vivas, eles são fundamentais na defesa e proteção da planta frente a fatores exógenos. Deste modo, compostos pertencentes a este metabolismo são sintetizados pelas plantas de acordo com as suas necessidades específicas, que incluem as condições ambientais, as interações com outras plantas e a proteção contra predadores (SAVITHRAMMA et al., 2011).

Os metabólitos secundários desempenham importantes funções na interação entre planta e meio ambiente e são produzidos principalmente em resposta a condições externas adversas, como ataque de microrganismos, insetos e até mesmo outras plantas. Esses compostos são classificados em três classes principais: terpenos e terpenóides, compostos fenólicos e alcaloides nitrogenados (COSME et al., 2020; CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; GRANATO et al., 2016; SALLA et al., 2016).

Devido à sua origem e funcionalidade nas plantas, esses compostos apresentam ampla diversidade de propriedades, com aplicações biotecnológicas e na química fina (PERTUZATTI et al., 2015). Terpenos e terpenóides são a principal classe de compostos encontrada nos óleos essenciais, eles possuem atividades biológicas, tais como anticancerígenas, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antialérgicas (MASYITA et al., 2022). Os compostos fenólicos, que compreendem compostos como taninos, flavonoides, antocianinas e difenóis, são vastamente empregados em produtos alimentícios (GRANATO et al., 2016a) devido as suas propriedades antioxidantes e por apresentam propriedades terapêuticas de interesse na indústria de fármacos e de produtos de origem natural (COSME et al., 2020).

I.3.3 Óleos essenciais

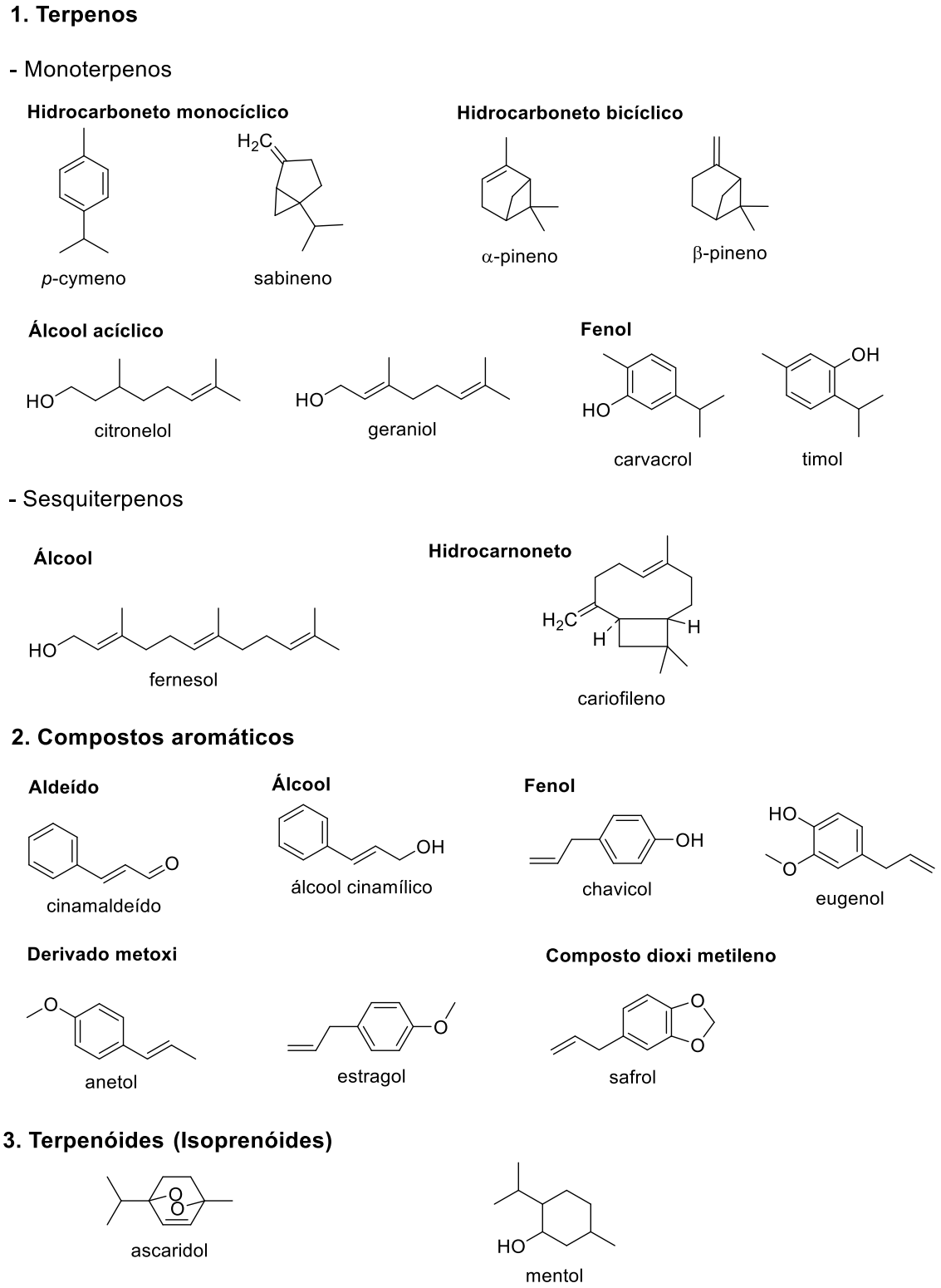
Os óleos essenciais constituem um dos mais importantes grupos de matérias-primas encontradas na natureza, com odor e sabor característicos e com aplicações já consolidadas em indústrias de cosméticos, alimentos e

farmacêutica (TOLBA et al., 2015). De acordo com Ahmadi et al. (2002), óleos essenciais são produtos de constituição variada e complexa obtidos de várias partes de plantas (flores, folhas, frutos, sementes, gramas, raízes, rizomas e caules).

Segundo Simões; Spitzer (1999), óleos essenciais são produzidos por organismos especializados da planta, como pelos glandulares, células de parênquima, canais oleíferos ou bolsas específicas, podendo se localizar em uma parte específica ou em toda planta. Por esta razão, tais compostos podem ser encontrados na parte aérea da planta (menta), nas flores (rosas e jasmim), nas folhas (eucaliptos e capim-limão), nos frutos (laranja e limão) na madeira (sândalo e pau-rosa), na casca do caule (canela), nas raízes (vetiver), rizomas (gengibre) e/ou sementes (noz moscada).

Os óleos essenciais são constituídos por moléculas orgânicas bioativas, principalmente mono, sesquiterpenos e fenilpropanoides, além de álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres e éteres em diferentes proporções (FIGURA 1) (AHMADI et al., 2002; BARBIERI; BORSOTTO, 2018). De acordo com Bakkali et al. (2008), existem aproximadamente 3000 óleos essenciais já conhecidos e, desses, 300 despertam grande interesse comercial.

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DE COMPOSTOS ISOLADOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS.



Fonte: Adaptado de Bakkali et al. (2008).

A origem biossintética dos óleos essenciais está relacionada ao metabolismo secundário, este metabolismo não é essencial para a manutenção

da vida das plantas, porém é responsável pela capacidade de adaptabilidade às condições do meio ambiente (VITTI; BRITO, 2003). Isso significa que na natureza, os óleos essenciais têm papel importante na proteção das plantas contra bactérias, fungos, vírus e inclusive contra herbívoros, reduzindo o apetite por essas plantas (GERSHENZON, 1994). Eles também podem atrair alguns insetos polinizadores ou repelir outros indesejáveis (BAKKALI et al., 2008), no entanto, Barbieri e Borsotto (2018) afirmaram que o mecanismo de ação dos óleos essenciais ainda não é totalmente compreendido.

O uso de produtos de origem natural, tais como os óleos essenciais, é de extrema importância para o desenvolvimento de fontes alternativas para moléculas bioativas. Existem diversas aplicações para os óleos essenciais e seus componentes isolados, tais como perfumes, cosméticos, produtos de limpeza, odontológicos, produtos agrícolas como biocidas, preservação de alimentos, aditivos e medicamentos fitoterápicos (HUERTA et al., 2019; JIANG et al., 2019; MORONE-FORTUNATO et al., 2010; VAFADAR-YENGEJE et al., 2019). Além disso, eles também podem ser empregados em aromaterapia e no tratamento de disfunções do sistema nervoso (EDRIS, 2007; SARMA et al., 2019).

Os óleos essenciais também são ricos em importantes atividades biológicas como, por exemplo, propriedades antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, antinociceptivas, antitumorais, antivirais, anti-inflamatórias e inseticidas já relatadas na literatura (FIALHO; PAPA, 2015; HAN; PARKER, 2017; SNENE et al., 2017). Essas propriedades são responsáveis pelo crescimento atual do setor de óleos essenciais, tanto no meio industrial para aplicações como no meio acadêmico em pesquisas em áreas diversas.

I.3.3.1 Mercado de óleos essenciais

A crescente demanda por óleos essenciais em diversas áreas para usos em medicamentos, alimentos, cosméticos e perfumes têm feito o mercado mundial de óleos essenciais crescer cada vez mais. O relatório da Grand View Research (2017) estimou que o mercado movimentará cerca de 13,94 bilhões de dólares até 2024. O consumidor está cada vez mais consciente sobre os

produtos orgânicos e vêm buscando alternativas, como os óleos essenciais, em substituição aos produtos sintéticos.

De acordo com Verlet (1993), estimar a produção mundial de óleos essenciais é uma tarefa difícil. Isso ocorre porque existem muitos pequenos produtores em muitos países, que não entram para as estatísticas mundiais devido ao baixo volume de produção ou porque sua produção e comercialização compreende um mercado restrito. Além disso, as estatísticas ignoram valores de consumo doméstico e com frequência, é baseada apenas na produção de uma pequena parcela de países (BARBIERI; BORSOTTO, 2018).

No entanto, os dados fornecidos pela Market Research Highlights (2018) podem chegar bem próximos à realidade. Em 2015, a produção de óleos essenciais no mundo foi estimada em 178,8 quilotoneladas, um equivalente a US$ 3,4 bilhões. A expectativa, de acordo com estimativas e análises econômicas, é de que em 2024 a produção exceda 370 quilotoneladas, um crescimento de 8,4%. Isso representa três vezes mais que o volume produzido em 1990 (45 toneladas), dos quais 50% ocorreram a partir de 2007 (BARBIERI; BORSOTTO, 2018).

O Brasil tem destaque na produção de óleo essencial de cítricos, principalmente de casca de laranja, sendo o segundo maior fornecedor deste produto, atrás apenas da China (BARBIERI; BORSOTTO, 2018). Outro produto de destaque é o óleo de *C. citriodora* (ULTRA INTERNATIONAL, 2019), utilizado principalmente na indústria de perfumaria. Avaliando-se separadamente cada espécie produtora de óleo essencial, o volume de produção da *C. citriodora* supera as demais espécies. No entanto, uma retrospectiva a respeito do histórico de comercialização de óleos essenciais no Brasil mostra que o mercado interno não é organizado e estável e a maior parte da produção vem de pequenos e médios produtores (VITTI; BRITO, 2003). A China possui o domínio da produção de óleo essencial de *C. citriodora*. Sua produção em 1991 foi de 1000 toneladas, enquanto a produção no Brasil foi de 500 toneladas (VITTI; BRITO, 2003). Os principais consumidores dos óleos essenciais produzidos no Brasil são os países da União Europeia (BIZZO; REZENDE, 2009).

Países como Índia e Austrália também possuem grande comercialização de óleos essenciais provenientes de espécies do gênero *Corymbia* e *Eucalyptus*, refletindo diretamente na taxa de pesquisas desenvolvidas nesses países, de

acordo com dados fornecidos pela plataforma Scopus. O Brasil é o detentor do maior número de pesquisas com a espécie *C. citriodora* e com óleo essencial desta espécie. Por outro lado, o termo “óleo essencial” é o mais citado em pesquisa dos EUA e China, o Brasil é o 5° país que mais possui pesquisas nesta área.

Durante a pandemia de COVID-19, a procura por produtos naturais com propriedades terapêuticas aumentou e o mercado de óleos essenciais se destaca nesse meio. O aumento da produção de óleos essenciais ao redor do mundo, para suprir as demandas de exportação, evidencia ainda mais a geração de subprodutos atrelados ao processo e que, muitas vezes, não são explorados na plenitude de seu potencial.

I.3.3.2 Métodos de extração

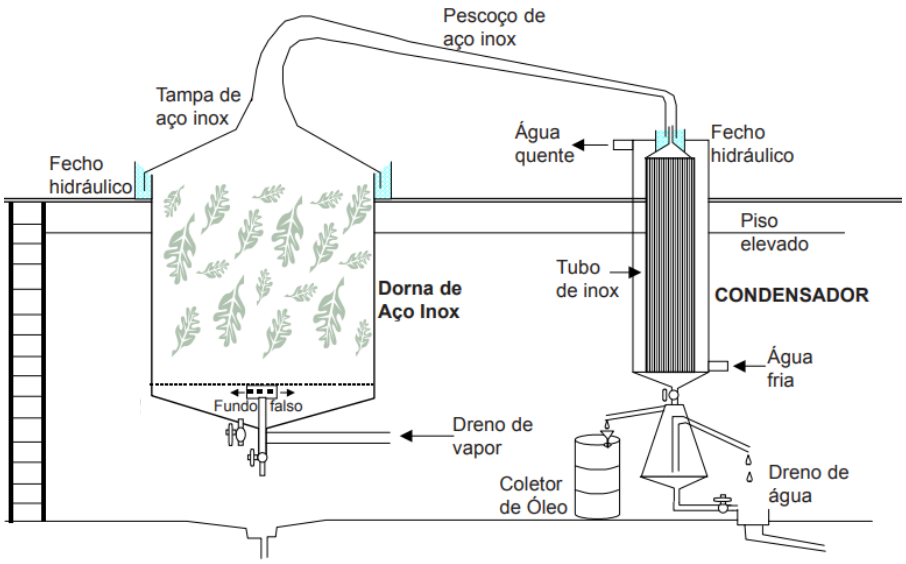
A extração de óleos essenciais pode ser realizada por diferentes métodos, conforme a localização do óleo na planta e a utilização final do produto. Esses métodos podem ser extração com solventes, extração com CO_2 supercrítico, prensagem a frio, *enfleurage* e arraste a vapor (AHMADI; MIRZA; SHAHMIR, 2002; BAKKALI et al., 2008; BARBIERI; BORSOTTO, 2018). Extrações com solventes geralmente resultam em óleos com maior contaminação, enquanto métodos como o de CO_2 supercríticos e prensagem requerem equipamento específico e de maior custo.

Já o método mais empregado para obtenção de compostos voláteis presentes nos vegetais, segundo Barbieri e Borsotto (2018), é a destilação por arraste a vapor. Este procedimento é eficaz, simples e barato para extração de óleos essenciais, o que justifica o grande interesse das indústrias e também de pequenos e médios produtores (DOGENSKI; FERREIRA; OLIVEIRA, 2016; FERHAT et al., 2006).

Este método consiste em aquecer a água até o ponto de ebulição (100 °C), estando esta água em contato com a biomassa da planta que se deseja realizar a extração. Esse aquecimento gera vapores de água, que são precipitados e arrastam os componentes mais voláteis até um condensador. O material coletado é uma mistura de água e óleo essencial que pode ser facilmente separada em um funil de decantação para obtenção do óleo essencial

purificado (BRUM, 2010) (FIGURA 2). A caldeira é responsável pelo fornecimento de vapor durante a destilação. Em geral, após a destilação, cerca de um terço das folhas extraídas são utilizadas como fonte de energia nas caldeiras (VITTI; BRITO, 2003).

FIGURA 2 – ESQUEMA DE UM CONJUNTO DE DESTILADOR INDUSTRIAL PARA ÓLEOS ESSENCIAIS.



Fonte: Vitti; Brito (2003).

A temperatura de 100 °C induz o rompimento das células odoríferas da planta aromática, devido à vaporização parcial do óleo em seu interior. O óleo essencial é transportado pelo vapor até o condensador, devido à diferença de pressão entre a entrada de vapor no vaso extrator e o bocal de saída do condensador. Nessa etapa pode-se distinguir dois produtos: o óleo essencial (que pode ser separado em um funil de decantação) e o hidrolato, que consiste em vapores de extração condensados, que mantêm uma parcela de óleo essencial emulsionado, e uma fração centesimal que é solúvel em água (CASSEL et al., 2009; CASSEL; VARGAS; JOSEPH, 2006).

Apesar de ser um método simples e de baixo custo para o setor industrial, a destilação por arraste a vapor apresenta um inconveniente marcante, como o grande volume de água utilizada durante a destilação. Esse subproduto não tem uma reutilização específica, e, por isso, representa um passivo ambiental a ser

melhorado (OLIVEIRA, 2015). Nesse contexto, estratégias de biorrefinaria e economia circular, que são conceitos que visam a utilização de produtos renováveis a partir de biomassa, buscando minimizar resíduos e maximizar a reutilização de recursos. Também há interesse em minimizar o consumo de energia, emissões atmosféricas, produção de resíduos sólidos e líquidos, promovendo o uso de tecnologias sustentáveis e mais baratas (SCOPEL et al., 2022). Esses conceitos vêm ao encontro dos objetivos desta pesquisa e por essa razão é tão relevante a busca de aplicações para esses subprodutos.

I.3.3.3 Subprodutos da hidrodestilação

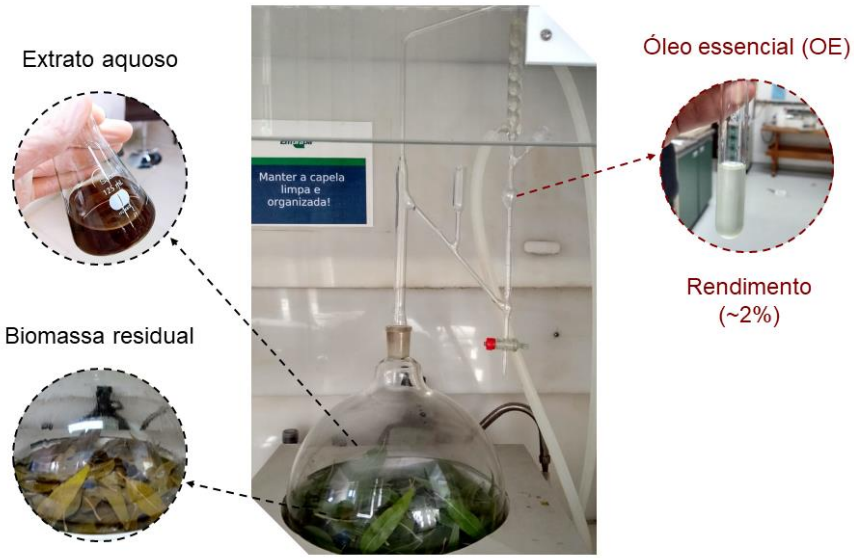
A gestão dos resíduos é indispensável para conservar a saúde e bem-estar dos seres vivos. Dessa forma, uma crescente conscientização das questões ambientais leva a uma exigência social de que os resíduos sejam gerenciados da maneira mais econômica e ecologicamente correta possível, visando minimizar seus efeitos no clima, biodiversidade e saúde humana (DA ROSA et al., 2015; LEE; TONG, 2018). Nesse sentido, é importante pensar em sistemas integrados em que o produto de um processo se torna matéria-prima para os seguintes e, assim, as indústrias promovem o reaproveitamento máximo daquilo que é gerado no processo produtivo (SCOPEL et al., 2022).

A preocupação da sociedade com a preservação do meio ambiente teve maior destaque nas últimas décadas (OLIVEIRA, 2015). Esse fato foi decorrente da conscientização mundial de que qualquer atividade humana leva à produção de resíduos e, por essa razão, a manutenção e melhoria das condições ambientais é necessária. Dentre os recursos, os hídricos são os que mais preocupam. Dessa forma, fica evidente a necessidade de reutilização dos recursos hídricos existentes ou a realização de pré-tratamentos (PRABAKAR et al., 2018). Em destilarias de óleos essenciais, por exemplo, há uma grande demanda de água para realização dos processos de destilação.

De acordo com Rossi (2009), no processo industrial de destilação de óleos essenciais de *C. citriodora*, em uma empresa situada na região sudoeste do Brasil, os efluentes gerados são utilizados na irrigação das florestas de eucalipto pertencentes à própria empresa, ou empregados como substrato no solo. Porém, apenas 1 a 1,6% das folhas dessa espécie é constituída por óleo

essencial (VITTI; BRITO, 2003), o restante é subproduto do processo (extrato aquoso e biomassa residual) e não possui aplicações de maior valor (FIGURA 3).

FIGURA 3 – ESQUEMA DA DESTILAÇÃO EM ESCALA LABORATORIAL E OS SUBPRODUTOS GERADOS.



Fonte: A autora (2023).

A biomassa residual do processo consiste nas folhas já destiladas, mas que ainda possuem extrativos e açúcares estruturais. De acordo com Scopel et al. (2022), essa biomassa apresenta potencial para aplicações semelhantes aos óleos essenciais e aos extratos das folhas. O mesmo ocorre com o extrato aquoso obtido ao final da destilação, que carrega consigo componentes da folha pertencentes ao metabolismo secundário da planta. Alguns exemplos de compostos solúveis em água presentes em materiais vegetais podem ser os compostos fenólicos, que abrangem os diversos tipos de flavonoides e taninos. Também estão presentes nesse extrato os mono e polissacarídeos, tais como glucose, frutose e sacarose.

I.3.1 O eucalipto

As espécies arbóreas de eucalipto (gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia*), família das *Mirtáceas*, são nativas da Oceania, principalmente da Austrália e fazem parte da paisagem florestal ao redor do mundo há mais de dois séculos (FIGURA 4). A literatura expõe que as plantas desse gênero possuem aplicações nos setores madeireiros e não madeireiros e isso se deve ao fato dessas espécies possuírem compostos bioativos com amplas propriedades antitumorais, antioxidantes e bactericidas (TRUEMAN; HUNG; WENDLING, 2018).

FIGURA 4 - FLORESTA DE EUCALIPTO NO BRASIL.

Fonte: Pinterest (2023).

As primeiras mudas de eucalipto foram plantadas no Brasil em 1824 no Jardim Botânico do Rio de Janeiro (BERTOLA, 2019; MARCHIORI, 2014) e os estudos relacionados ao gênero começaram em 1904 por Edmundo Navarro de Andrade (na Companhia Paulista de Estradas de Ferro), que introduziu várias espécies e origens do gênero no Jardim Jundiaí, São Paulo. Esse estudo desbravador objetivou estabelecer o uso do eucalipto para atender a demanda de madeira destinada à construção de ferrovias (CASTRO et al., 2016), em substituição às espécies amazônicas.

Já na década de 1960, o setor florestal passou a ser tratado com maior atenção e foi nesse período que ocorreu a criação do Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, IBDF (incorporado pelo atual Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, IBAMA). Ocorreu também a implementação de incentivos fiscais que tornaram o reflorestamento uma

operação de larga escala (ANTONANGELO; BACHA, 1998), o que contribuiu com o aumento da área plantada com espécies de eucalipto.

O crescente interesse por estudar espécies de eucalipto no Brasil ocorreu devido a sua fácil adaptação às diferentes condições ambientais existentes no país, latitude semelhante com a Austrália e devido às propriedades que lhe conferem várias possibilidades de uso madeireiro, além da grande produtividade em um curto espaço de tempo (CASTRO et al., 2016). As espécies de eucalipto são consideradas as mais importantes plantadas no país e em outras regiões tropicais e subtropicais do mundo (PEREIRA et al., 2021).

Atualmente, a área de florestas plantadas ocupa 1% do território nacional e corresponde a 91% de toda madeira produzida para fins industriais no Brasil (FURTADO et al., 2020). O Brasil conta com uma área total de 9 milhões de hectares de florestas plantadas e, desse total, 77% são contempladas por árvores de eucalipto. O setor alcança economicamente mais de 1000 municípios e possibilita uma receita bruta total de R$ 97,4 bilhões, totalizando 1,2% do PIB nacional (IBÁ, 2020). Mesmo com os problemas econômicos enfrentados pelo Brasil nos últimos anos devido às instabilidades políticas, a indústria de florestas plantadas do país é referência no *ranking* de produtividade, apresentando média de 35,3 m^3/ha/ano para plantios de eucalipto e é o principal fornecedor de produtos florestais para a China e Europa (IBÁ, 2019).

O eucalipto também possui uma ampla possibilidade de usos, fator motivador para o fomento de plantios. Desde a produção de celulose e papel, que é onde encontra-se a sua maior utilização, até a produção de toras para desdobro em madeira serrada (tábuas, vigas, treliças e moirões) ou produção de painéis de madeira reconstituída, carvão vegetal para produção de energia e utilização dos produtos não madeireiros, tais como cascas, galhos, folhas e flores para usos terapêuticos (FOELKEL, 2005; PEREIRA et al., 2021).

Foram dedicados longos anos de pesquisas direcionadas ao melhoramento genético dessas espécies, permitindo obter características favoráveis e melhor desempenho, reduzindo os impactos ambientais (GOLLE et al., 2009). Como um reflexo dessas pesquisas, em 2009 a área de florestas plantadas com eucalipto era de 4,5 milhões de hectares e, apenas 10 anos depois, em 2019, essa área aumentou para cerca de 7 milhões de hectares (ABRAF, 2013; IBÁ, 2019). Os plantios atuais tiveram um aumento de 40% na

produtividade de madeira se comparados a outras espécies/variedades exóticas implantadas no país. Devido a esse potencial silvicultural, o Brasil tem como meta implantar mais 12 milhões de hectares até 2030 (DE OLIVEIRA; JÚNIOR, 2021), visto que o cultivo das espécies desse gênero possui importância econômica e social e sua introdução no Brasil representa um marco histórico no cenário do país (ASSIS, 2011).

Existem mais de 700 espécies de eucalipto, mas apenas 27,4% são utilizadas para fins comerciais ao redor do mundo (FIGUEIREDO et al., 2013; REJMÁNEK; RICHARDSON, 2013). Dentre as espécies mais cultivadas, estão *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus viminalis*, *Eucalyptus benthamii* e híbridos de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus dunnii* (SANTAROSA; JÚNIOR; GOULART, 2014). Além disso, a vasta produtividade dessas espécies reflete não só na indústria madeireira, mas também no mercado de outros produtos de base florestal, que podem ser empregados na cadeia alimentícia, automobilística, de cosméticos e fármacos (IBÁ, 2019).

Nesse contexto, estudos envolvendo outras espécies de eucalipto são indispensáveis à composição de uma base técnica e científica que possibilite o fomento de plantios em escala comercial. Espécies como as do gênero *Corymbia* podem ser fontes alternativas à matriz de matérias-primas. Além disso, podem funcionar como opções múltiplas de genótipos interessantes à expansão das fronteiras florestais, por apresentarem características adaptativas importantes, tais como: tolerância a fatores bióticos e abióticos, adaptação a variações climáticas e, ainda, propriedades tecnológicas aptas a múltiplos usos (PEREIRA et al., 2021).

I.3.2 *Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson

Desde a década de 1970 que a caracterização e identificação de algumas espécies pertencentes ao gênero *Eucalyptus* é bastante discutida entre taxonomistas e estudiosos da área. Dessa forma, um estudo morfológico conduzido por Hill e Johnson em 1995 resultou em uma reclassificação do gênero, propondo a criação do gênero *Corymbia*. As novas nomenclaturas das espécies foram citadas primeiramente por HILL; JOHNSON (1995): *C. maculata*

(Hook) K. D. Hill & L.A.S. Johnson; *C. henryi* (S.T. Blake) K. D. Hill & L. A. S. Johnson; *C. citriodora* (Hook) K. D. Hill & L. A. S. Johnson e *C. variegata* (F. Muells) K. D. Hill & L. A. S. Johnson. Neste cenário, foram somadas 113 espécies, antes pertencentes ao gênero *Eucalyptus*, entre elas está a espécie *C. citriodora* (HILL; JOHNSON, 1995; NEVES et al., 2019).

A *C. citriodora* é uma espécie arbórea conhecida por diversos nomes comuns, tais como eucalipto-cidró, eucalipto-limão ou eucalipto-cheiroso. Segundo Bhuyan et al. (2017), a *C. citriodora* possui ocorrência natural na faixa leste da Austrália, principalmente no estado de Queensland. Sua distribuição percorre toda a faixa leste australiana, desde Mount Janet até Mackay, Queensland. A *C. citriodora* habita locais onde o clima é quente e úmido a subúmido (REIS et al., 2013).

As altitudes mais propensas para a ocorrência de *C. citriodora* são entre 30 m e 1100 m e as temperaturas médias nos locais variam de 29 ºC a 30 ºC nos meses mais quentes, e de 8 ºC a 9 ºC nos dias mais frios (VUONG et al., 2015). Em geral, as precipitações pluviométricas anuais variam de 600 mm a 2000 mm, com maiores concentrações no verão. Em alguns casos específicos, a espécie suporta áreas com geadas menos intensas, com temperaturas de até -3 °C mas, de maneira geral, são susceptíveis a geadas (MANI et al., 2021; REIS et al., 2013; VUONG et al., 2015).

I.3.2.1 C. citriodora no Brasil

Desde o cultivo de mudas até a utilização da madeira, a espécie de *C. citriodora* vem sendo amplamente estudada nas últimas duas décadas (PEREIRA et al., 2021). No Brasil, tem crescido o interesse pela espécie devido às suas características silviculturais e tecnológicas, que são reflexo da ótima adaptabilidade às diferentes regiões brasileiras, o que justifica a grande extensão de áreas com plantio dessas espécies (LUZ et al., 2018).

Algumas características como a adaptação fisiológica a diferentes regiões brasileiras e incremento volumétrico ornam o cultivo de *C. citriodora* bastante atraente no Brasil. Estima-se que o país apresente cerca de 85.000 ha de plantios da espécie, sendo os estados de São Paulo, Mato Grosso e Minas

Gerais os principais produtores (REIS et al., 2013). De maneira geral, o plantio brasileiro de *C. citriodora* está sob responsabilidade de pequenos e médios produtores rurais (PEREIRA et al., 2021).

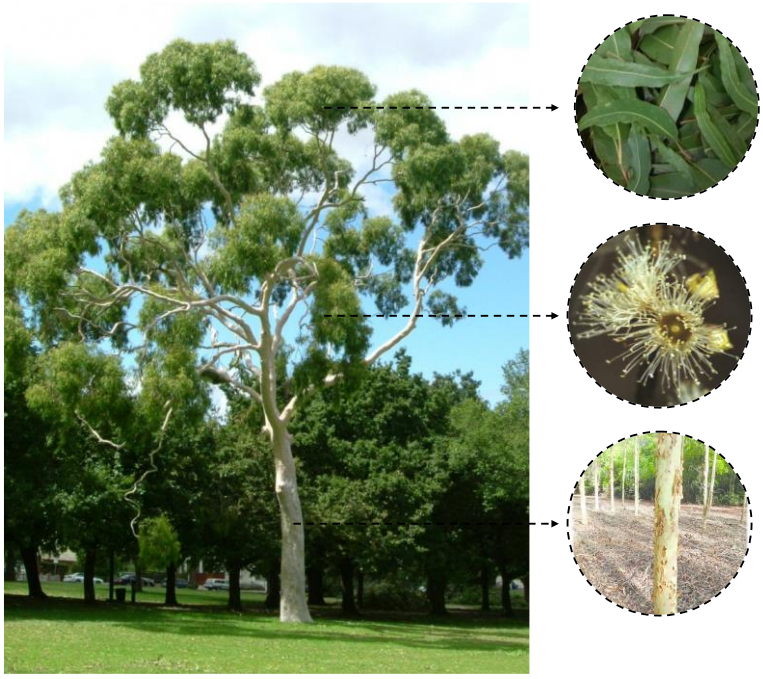
A *C. citriodora* é uma espécie de grande relevância dentre os eucaliptos, sendo cultivada em todo o mundo (REIS et al., 2013). No Brasil, seus plantios foram iniciados com vistas à adaptação fisiológica, crescimento e produção de madeira para produção de carvão vegetal. No decorrer do tempo, os objetivos dos plantios foram ampliados no intuito de produção de madeira para serraria, energia e exploração de folhas para extração de óleo essencial (BOSSOU et al., 2015; MANIKA et al., 2012; VITTI; BRITO, 2003). A *C. citriodora* não consiste em uma espécie prioritária de cultivo para grandes empresas do setor de florestas plantadas no Brasil e, consequentemente, há pouco investimento em pesquisas (REIS et al., 2013).

As principais razões para a sua utilização no Brasil são a boa adaptação às diferentes regiões edafoclimáticas, relativo incremento volumétrico de madeira, boa forma e capacidade de brotação (VITTI; BRITO, 2003). Ressalta-se que a espécie é recomendada para reflorestamento em quase todo o Brasil central, além de norte do Paraná, São Paulo, Minas Gerais e no litoral da Região Nordeste (IBÁ, 2020).

I.3.2.2 Características gerais da espécie

Segundo o Instituto de Pesquisas Tecnológicas, a *C. citriodora* possui altura de média até grande, podendo atingir ocasionalmente 50 m de altura e 1,2 m de DAP (diâmetro a altura do peito) e sua folhagem é rala (IPT, 2022). A espécie possui, de maneira geral, tronco reto e casca lisa, com coloração que oscila do creme, rosa a acobreado (BRISOLA; DEMARCO, 2011; MOURA; FRANZENER, 2014). O percentual de casca na madeira da *C. citriodora* é elevado e pode chegar a 30% do volume do tronco, sua ramagem é longa, o que permite a formação de uma copa aberta. As folhas da *C. citriodora* são caracterizadas por forte aroma de citronelal, que é o principal constituinte químico do seu óleo essencial (BOSSOU et al., 2015a; DOGENSKI; FERREIRA; OLIVEIRA, 2016b; FATHI; SEFIDKON; ABRAVESH, 2009; MANIKA et al., 2012a) (FIGURA 5).

FIGURA 5 - ASPECTO DA *C. citriodora*, FOLHAS, FLORES E TRONCO.



Fonte: Adaptado de Reis et al. (2013).

A madeira da *C. citriodora* possui propriedades de interesse para o setor madeireiro. Sua textura varia de fina a média, com coloração bem definida, cerne em tons mais escuros e o alburno em tons mais claros (MATTOS et al., 2014), não havendo presença de brilho. A região do cerne é considerada de difícil trabalhabilidade, devido à baixa permeabilidade, enquanto o alburno possui características permeáveis (BRISOLA; DEMARCO, 2011; MATTOS et al., 2014; MEDEIROS et al., 2016). A densidade básica é em média 0,57 $g.cm^{-3}$, para essa espécie, considerada de densidade média (MEDEIROS et al., 2016). É considerada uma matéria prima de excelência para aplicação comercial em serrarias devido a características satisfatórias de aplainamento, lixamento, furação e acabamento (PEREIRA et al., 2021). Por outro lado, apresenta suscetibilidade a rachaduras durante o processo de secagem, resultado do seu elevado grau de hisgroscopicidade, sendo necessária a aplicação de programas de secagem com temperaturas amenas, a fim de evitar danos ao material (PAULA et al., 2014). Devido a essas propriedades, a madeira de *C. citriodora* pode ser utilizada para produção de carvão vegetal, cabos de ferramentas,

cercas, cruzetas, dormentes, lenha, mourões, pontaletes, postes, serraria (vigas, caibros e móveis), dentre outros usos (PEREIRA et al., 2021; REIS et al., 2013).

A *C. citridora* possui 28 % de lignina, 9 % de extrativos e 63 % de holocelulose em sua composição química majoritária (MEDEIROS et al., 2016), dados similares aos encontrados para o gênero de forma geral (PEREIRA et al., 2021). É considerada uma madeira suscetível a organismos xilófagos, devido à baixa permeabilidade, sendo necessária a aplicação de produtos químicos (MATTOS et al., 2014). A madeira *in natura* apresenta um poder calorífico em torno de 4.700 $kcal.kg^{-1}$, enquanto após o processo de carbonização, o carvão vegetal produzido de *C. citrotora* duplica o poder seu calorífico (MEDEIROS et al., 2016). Essas características evidenciam a potencialidade de aplicação para usos múltiplos para essa espécie, podendo ser empregada em diversos setores do comércio florestal (PEREIRA et al., 2021).

A espécie é também utilizada na arborização de parques e avenidas, pois possui uma copa vistosa (REIS et al., 2013). Além de seu uso tradicional em monocultivos, a inclusão dessa espécie em sistemas integrados, visando a diversificação da produção, pode se tornar uma importante alternativa de renda aos pequenos e médios produtores rurais. Esse aspecto torna-se ainda mais evidente ao se considerar o potencial da espécie para usos diversos (PEREIRA et al., 2021; REIS et al., 2013).

I.3.2.3 Óleo essencial da C. citriodora

A exploração da espécie *C. citriodora* para produção de óleos essenciais começou no Brasil após a II Guerra Mundial, juntamente com outras espécies nativas, para suprir a demanda por óleos essenciais específicos que não estavam mais sendo oferecidos pelo mercado exterior (COPPEN; HONE, 1992). A produção do óleo essencial de eucalipto aumentou na década de 1960, após a lei de incentivos fiscais que estimulou os agricultores a plantarem mudas de eucalipto por diversas regiões do país, como forma de diminuir o desmatamento de espécies amazônicas (ANTONANGELO; BACHA, 1998). Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de óleo essencial de *C. citriodora*, atrás apenas da China, que detém cerca de 70% da produção mundial deste óleo (ULTRA INTERNATIONAL, 2019).

O óleo essencial da *C. citriodora* é extraído das folhas, flores e galhos da planta, mas principalmente de suas folhas. Eles são produzidos nas cavidades globulares, as glândulas (MOURA; FRANZENER, 2014; VITTI; BRITO, 2003). As glândulas se distribuem pelo parênquima foliar nas espécies de eucalipto e apresentam coloração translúcida quando visualizadas contra a luz natural ou de microscópio para algumas espécies de eucalipto (MEDEIROS et al., 2016).

Os óleos essenciais fazem parte do metabolismo secundário da *C. citriodora*, o qual não é responsável pela sua sobrevivência, mas é importante para que a planta apresente respostas mais rápidas às diversas condições do ambiente em que habita (DORAN et al., 1995). No caso de espécies de eucalipto, os óleos essenciais estão associados à proteção das plantas contra insetos, resistência ao frio em estágios de germinação, efeito alelopático e à redução da perda de água (VITTI; BRITO, 2003). A literatura indica que os óleos essenciais de *C. citriodora* são importantes agentes contra insetos (JAENSON; GARBOUI; PÅLSSON, 2006), o que ocorre devido à sua constituição química.

Cada componente presente no óleo essencial tem um perfil característico e cada aroma e sabor é uma combinação dos perfis de seus constituintes (DE ANDRADE; GOMES, 2000). De acordo com a espécie analisada, há predominância de compostos diferentes, por exemplo, do citronelal para a *C. citriodora*. Esse composto constitui de 65 a 88% do óleo essencial da espécie e é responsável pelo aroma e pela maioria das propriedades apresentadas pela espécie. O citronelol e o isopulegol são componentes importantes na constituição de seu óleo essencial (TABELA 1).

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA *C. citriodora*.

Substância	**Índice de Retenção**	**Quantidade (%)**	
		mín	máx

Hidrocarbonetos Monoterpenos			
α-pineno	929	0,08	1,00
β-pineno	973	0,42	0,43
Linalol	1029	0,25	6,40
Monoterpenos Oxigenados			
1,8 cineol	1035	0,14	0,52
Óxido cis-Rose	1112	0,27	0,27
Óxido trans-Rose	1128	0,13	0,13
Isopulegol	1152	4,66	10,33
Citronelal	1167	65,45	87,4
NeoIsoisopulegol	1176	0,24	7,8
α-terpineol	1199	0,3	0,33
Citronelol	1242	10,63	13,05
Geraniol	1262	0,32	0,9
Acetato de Isopulegol	1276	0,16	0,3
p-mentano-3,8-diol	1350	1,2	2,76
Acetato de Citronelil	1355	2,05	2,16
Jasmine (Z)	1398	0,23	0,23
Hidrocarbonetos Sesquiterpenos			
β-cariofileno	1415	0,2	1,34
α-humuleno	1450	0,1	0,1
Biciclogermacreno	1493	0,07	0,07
Sesquiterpenos oxigenados	1574	0,07	0,07
Espatulenol	1574	0,07	0,07
Óxido de cariofileno	1583	0,1	0,22
Outros componentes			
2,6-dimetil-5-heptenal	1055	0,91	0,91

Em que: A composição do óleo essencial é dada em % da massa total de óleo essencial (~2 %).
Fonte: BOSSOU et al., 2015; KOUDORO et al., 2014; MANIKA et al., 2012; TOLBA et al., 2015.

O rendimento em óleo essencial está relacionado com as condições do solo, clima, época da colheita, idade da planta, teor de umidade da folha, método de destilação, tempo de destilação, pressão de vapor, procedência da planta e outros fatores (DE ANDRADE; GOMES, 2000; VITTI; BRITO, 2003). A época de colheita das folhas também é um fator que influencia a quantidade e composição do óleo essencial da *C. citriodora*. Ao longo do ano o percentual de óleo essencial pode variar de 1% até 1,6% em relação à massa úmida de folhas (VITTI; BRITO, 2003), mas esse percentual pode chegar a 4% se avaliado o percentual de óleo essencial com relação à massa seca de biomassa. De acordo com Manika et al., 2012, a concentração de óleo essencial para a espécie é maior nos meses mais secos do ano e, nesse período, o percentual médio de citronelal é de 79,5%. A colheita das folhas pode ser iniciada a partir do primeiro

ano do povoamento florestal, desramando-se as folhas dos galhos laterais e mantendo-se as folhas no ápice da copa (PEREIRA; FILHO; MOURA, 2012).

Devido ao seu aroma, o óleo essencial extraído da *C. citriodora* é amplamente utilizado na indústria de perfumes e fragrâncias (CLEMENTE et al., 2010; OLIVO et al., 2013). Eles também têm sido usados em aromaterapia, cosméticos, agentes de tratamento de feridas, detergentes, como medicamento nas culturas aborígenes, bem como repelentes de insetos (GOODINE; OELGEMÖLLER, 2020; JAENSON; GARBOUI; PÅLSSON, 2006). No Brasil, óleos essenciais provenientes da espécie estão em segundo lugar no *ranking* de exportações, atrás apenas dos óleos essenciais de cítricos (ULTRA INTERNATIONAL, 2019). Os principais importadores de óleos essenciais da *Corymbia citriodora* são a Inglaterra e países da União Europeia, tais como França e Alemanha (BARBIERI; BORSOTTO, 2018).

O potencial e aplicações do óleo essencial da *C. citriodora* são reflexo de suas propriedades. Eles foram elucidados como potenciais repelentes de insetos (BOSSOU et al., 2015; COSTA et al., 2015; JAENSON; GARBOUI; PÅLSSON, 2006) e pragas como o carrapato (OLIVO et al., 2013), além apresentarem propriedades fungicidas (TOLBA et al., 2015) e antimicrobianas (KOUDORO et al., 2014). Devido ao efeito antioxidante do óleo essencial da *Corymbia citriodora* (KOUDORO et al., 2014; MANI et al., 2021), que é um resultado da sinergia entre os seus constituintes, estudos já revelaram suas propriedades antitumorais (BHAGAT; SAXENA, 2012; VUONG et al., 2015) em testes com cultivo de células humanas *in vitro* (BHUYAN et al., 2017). Recentemente, durante a pandemia do SARS-CoV-2, esses óleos se mostraram promissores inibidores naturais da enzima protease (Mpro), principal responsável pela replicação em massa do novo coronavírus (PANIKAR et al., 2021), o que pode torná-lo um importante instrumento terapêutico na busca por medicamentos mais eficazes para combater o SARS-CoV-2.

I.3.5 Ácido lático

O ácido lático ou ácido 2-hidroxipropiônico ($C_3H_6O_3$, FIGURA 6) é um ácido orgânico de grande ocorrência na natureza, descoberto e isolado no século XVIII a partir do leite (OJO; DE SMIDT, 2023). O ácido lático foi o primeiro ácido

orgânico a ser produzido comercialmente por fermentação, estando presente em muitos alimentos de forma natural ou como produto da fermentação microbiana. Esse ácido é um metabólito intermediário chave na via metabólica da glicólise, que é uma das principais vias metabólicas para a produção de energia em organismos vivos, incluindo procariontes anaeróbios (KOMESU et al., 2017; KUMAR et al., 2020).

FIGURA 6 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO LÁTICO E SEU MODELO MOLECULAR, RESPECTIVAMENTE.

Fonte: A autora (2023).

O ácido lático é um sólido branco cristalino que possui baixo ponto de fusão (53 °C), é inodoro e solúvel em água, aparecendo geralmente como uma solução aquosa de baixa concentração (85%). Portanto, trata-se de um ácido orgânico com um carbono β assimétrico que possui dois enantiômeros: L(+), D(-) e um DL racêmico que pode ser obtido através de síntese química ou via fermentação láctea (GHAFFAR et al., 2014).

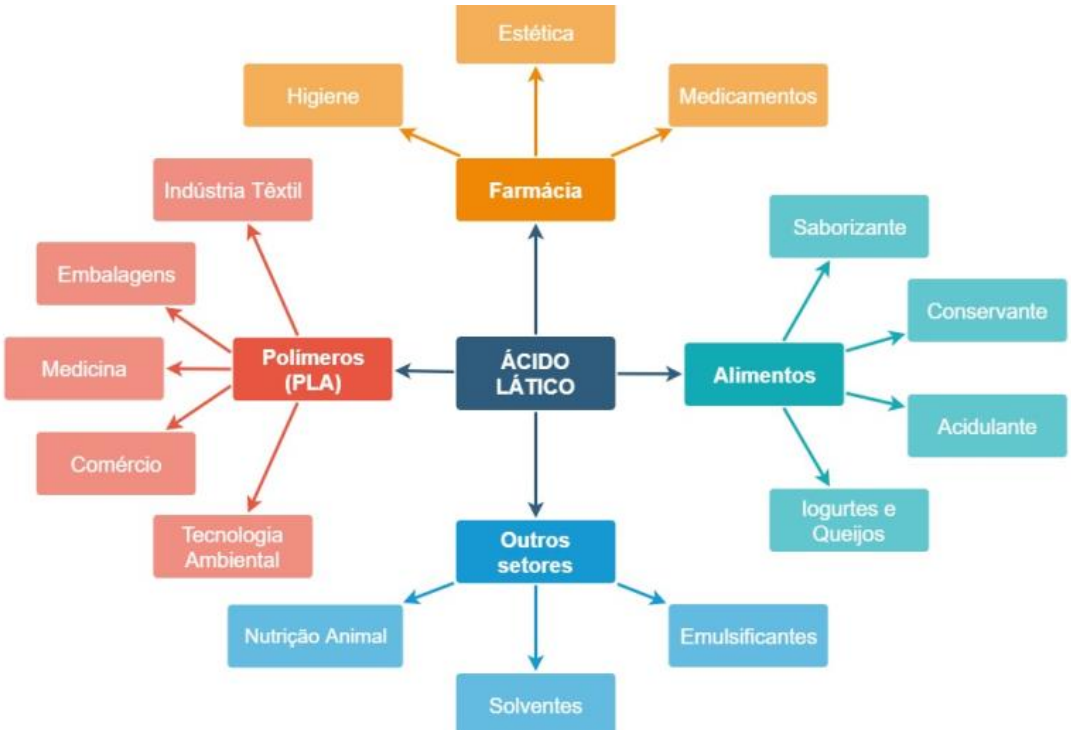
A produção de ácido lático por fermentação microbiana é responsável por mais de 50% de sua produção mundial (STATISTA, 2023). Nesse sentido, a fermentação microbiana é a principal rota de produção comercial de ácido lático e é geralmente realizada por bactérias láticas, como *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp (KUMAR et al., 2019; KUMAR et al., 2020). Essas bactérias são capazes de fermentar uma variedade de subprodutos da indústria de alimentos ou resíduos agroindustriais, tais como soro de leite, resíduo da fabricação do queijo, melaço, glicose, amido de milho, lactose, sacarose, milho, mandioca, batata e cevada (ABDEL-RAHMAN et al., 2011; WANG et al., 2015).

Embora exista diversas fontes de carboidratos para produção do ácido lático, o custo dos substratos de carboidratos e o limite de disponibilidade de alimentos ao redor do mundo, os materiais lignocelulósicos são uma alternativa promissora (SINGHVI; GOKHALE, 2013). A biomassa lignocelulósica é uma das matérias-primas renováveis mais abundantes e por essa razão, pode superar

diversos problemas ambientais e fornecer uma matéria-prima econômica para produção de ácido lático, sem competir com a grande indústria de produtos alimentícios (FUKUSHIMA et al., 2004; HU et al., 2016).

O ácido lático é um produto reconhecido como seguro pela *Food and Drug Administration* (FDA) e por isso possui uma vasta gama de aplicações (FIGURA 7) em indústrias químicas, de alimentos, cosméticos, têxtil e de polímeros (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013). De acordo com Teixeira et al. (2014), o ácido lático pode ser utilizado na indústria alimentícia como conservante natural; é uma importante matéria-prima de muitos fármacos para tratamento de acne e psoríase, além de ser utilizado para neutralização de pH em formulações de implantes, pílulas e sistemas de liberação de fármacos. Além disso, o ácido lático é um composto comumente observado em formulações de cremes e pomadas devido ao caráter hidratante, anti-microbiano, esfoliante e rejuvenescedor, assim como também em produtos de higiene pessoal como cremes dentais (KOMESU et al., 2017).

FIGURA 7 - DIAGRAMA DAS APLICAÇÕES DO ÁCIDO LÁTICO.



Fonte: Dornelles (2021).

No setor de materiais, este ácido também é uma alternativa mais sustentável para a produção de polímeros, pois pode ser obtido a partir de fontes renováveis (HONG et al., 2012; LI et al., 2021), dentre os quais o principal deles é o ácido polilático (PLA) (SWETHA et al., 2023). O PLA é biopolímero termoplástico empregado em aplicações terapêuticas e farmacêuticas, como sistemas de liberação de fármacos, encapsulamento, desenvolvimento de microesferas e hidrogéis. A aplicação biomédica do PLA foi estendida à engenharia de tecidos, incluindo materiais de suporte, bem como a materiais biocompatíveis para suturas e próteses (MASUTANI; KIMURA, 2014a).

A síntese do PLA começa pela produção do ácido lático (ácido 2-hidroxipropiônico, $C_3H_6O_3$) e termina com a sua polimerização, tendo como processo intermediário a formação da lactida (MASUTANI; KIMURA, 2014; SINGHVI; GOKHALE, 2013). Essa síntese tem sido realizada usando catalisadores inorgânicos tóxicos (DECHY-CABARET et al., 2004), mas pode ser realizada alternativamente pelo uso de biocatalisadores enzimáticos, sem utilização de metais tóxicos que possam aumentar suas aplicações, especialmente na área biomédica (CHANFREAU et al., 2010).

Nesse contexto, parece promissora a ideia de reutilizar subprodutos industriais, tais como o extrato aquoso proveniente da hidrodestilação de óleos essenciais na produção deste polímero natural (PLA), uma vez que o extrato contém açúcares que podem ser fermentados em ácido lático para posterior síntese do PLA. O PLA é um polímero sustentável e uma alternativa aos materiais convencionais que causam poluição ambiental advindos de petroquímicos.

CAPÍTULO II

ESTUDO SOBRE O APROVEITAMENTO DO EXTRATO PROVENIENTE DA HIDRODESTILAÇÃO DE FOLHAS DE *C. citriodora* POR EXTRAÇÃO SEQUENCIAL

SOARES, A. K.; LIMA, G. G.; MATOS, M.; HANSEL, F. A.; CADEMARTORI, P. H. G.; MAGALHÃES, W. L. E. Wastewater from hydrodistillation can be reused for various sequential extractions, a study using Corymbia citriodora leaves. ***Industrial Crops And Products*** *(F.I. 6.449), 2023.*

II.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, existe interesse crescente em produtos naturais devido aos seus potenciais efeitos farmacológicos. Nas indústrias de alimentos, medicamentos e na química fina, os compostos ou derivados naturais já têm sua relevância reconhecida. Dentre os compostos com atividade biológica, pode-se destacar os componentes de óleos essenciais (SCOPEL et al., 2022). Estes constituem um dos mais importantes grupos de matérias-primas encontradas na natureza, com aplicações já consolidadas em indústrias de cosméticos, alimentos e farmacêutica (TOLBA et al., 2015), que apresentam odor e sabor característicos.

Para extração desses compostos, o método mais empregado é a destilação por arraste a vapor. Este procedimento é eficaz, simples e barato para extração de óleos essenciais, o que justifica o grande uso industrial (DOGENSKI et al., 2016; FERHAT et al., 2006). A destilação por arraste a vapor é realizada a partir do aquecimento de folhas juntamente com água até a ebulição, os vapores de água gerados carregam consigo os componentes voláteis presentes nas folhas (CASSEL et al., 2006). No entanto, atrelado ao processo de destilação de óleos essenciais, há formação de subprodutos como a biomassa residual e o extrato aquoso. Esses subprodutos contêm compostos bioativos que podem ser úteis em indústrias de outros segmentos, tais como polifenóis em resíduos do processo de destilação de óleos essenciais de palminha (*Tanacetum vulgare* L.) (BARANAUSKIENE et al., 2014).

Nesse contexto, existe uma necessidade iminente de promover a aplicação dos conceitos de biorrefinaria nos processos de hidrodestilação de óleos essenciais, bem como destacar as possibilidades da exploração integral dos subprodutos, particularmente aqueles ricos em fitoquímicos valiosos (VENSKUTONIS; JONUŠAITE, 2016). A literatura relata a utilização dos subprodutos da hidrodestilação, tais como para a família *Lamiaceae* (hortelã) (NAPOLI et al., 2022), rosa *Narcea* e flores de *R. damascena* (BOSO et al., 2022; SABAHI et al., 2020) e resíduos de moinho de azeitona (SAID et al., 2022), para obtenção de extratos enriquecidos em polifenóis.

Este estudo traz um modelo de implementação de uma biorrefinaria no contexto de uma indústria de hidrodestilação de óleos essenciais de *C. citriodora*,

espécie amplamente utilizada no mercado brasileiro. O modelo propõe a utilização dos subprodutos líquidos em novas extrações a fim de reduzir o consumo de água e aumentar a concentração de compostos bioativos de relevância para outras indústrias. Nesse processo de extrações sequenciais, é importante avaliar alguns compostos majoritários desse subproduto líquido, como os flavonoides, que se degradam na água em temperaturas a partir de 100 °C (BIESAGA, 2011).

Embora trabalhos anteriores tentem contornar esse problema reduzindo o tempo de destilação e posterior extração para reduzir os efeitos drásticos de um aquecimento mais prolongado e recuperar qualquer óleo residual (BABU; KAUL, 2005; RAO et al., 2016), nossa pesquisa propõe o uso de extrações sequenciais, a qual expõe os compostos a um tempo mais prolongado nessas temperaturas drásticas. Embora um maior número de grupos hidroxila promova a degradação dos flavonoides, a presença de açúcar os protege da degradação térmica durante a extração (DE ELGUEA-CULEBRAS et al., 2022). Além disso, o reaproveitamento desse efluente nas extrações sequenciais do óleo essencial reduz os danos ecotóxicos e diminui a geração de resíduos, ideia já mencionada por Rao et al. (2016).

Considerando que a extração sequencial por hidrodestilação da *C. citriodora* pode aumentar os polifenóis na água residual e sua não degradação pode ser protegida pela presença de açúcares, tais como frutose e glucose, além de compreender como ocorre o incremento desses compostos. Este capítulo visa demonstrar que o uso do extrato aquoso proveniente de hidrodestilações pode ser promissor para obtenção de produtos de alto valor comercial.

II.2 MATERIAL E MÉTODOS

II.2.1 Obtenção e preparo do material

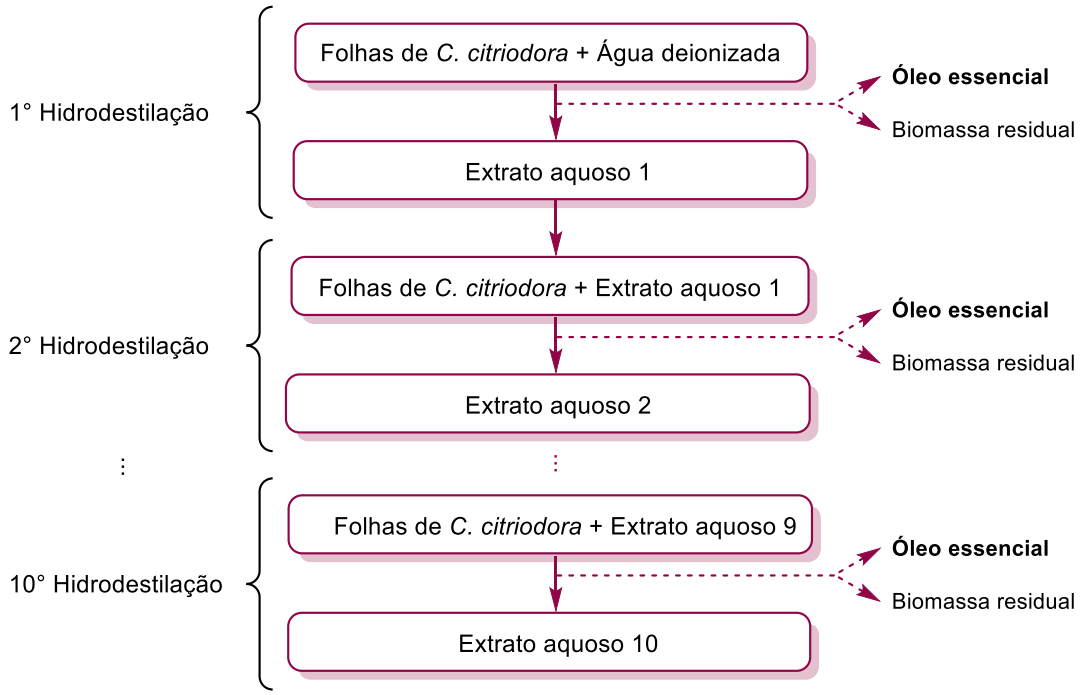
As folhas de *C. citriodora* (umidade 53%) empregadas no estudo foram obtidas de plantios experimentais pertencentes à Embrapa Florestas, localizados em Colombo, Paraná. O período de colheita ocorreu entre os meses de novembro a fevereiro (primavera e verão), período em que ocorre a rebrota das

plantas após o período de geadas. Estas folhas foram armazenadas em geladeira a 5 °C por um período máximo de duas semanas.

II.2.2 Extração sequencial

Para a extração, 100 g de folhas de *C. citriodora* foram submetidas a hidrodestilação por arraste a vapor em um extrator do tipo Clevenger durante 4 horas na temperatura de ebulição da água. A proporção de folhas para água destilada foi de 1:10 (m/v). O extrato aquoso contendo os compostos solúveis em água a 100°C foi coletado e utilizado em uma nova extração com folhas frescas, o volume do extrato foi completado com água deionizada (~100 ml) para manter a proporção de 1:10 entre folhas e água. Foram realizadas 10 extrações com reaproveitamento de extrato aquoso (FIGURA 8).

FIGURA 8 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS REALIZADAS.



Fonte: A autora (2023).

II.2.3 Rendimento do óleo essencial

O rendimento de óleo essencial em base seca foi calculado para cada extração sequencial. A comparação dos óleos essenciais foi realizada por meio

de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM, Focus GC, PolarisQ, Thermo), a fim de caracterizar os componentes presentes no óleo essencial de *C. citriodora* na primeira e na última extração. Para isso, amostras (5 µL de óleo em 1 mL de éter etílico) foram introduzidas via injetor split/splitless (1 µL, split 1:100, 230 °C), e o forno do CG foi equipado com uma coluna capilar DB5ms (30 × 0,25 mm, 0,25 µm de espessura do filme). O forno do CG foi programado de 50 a 300 °C a 3 °C min^{-1}. Hélio a uma taxa de fluxo constante (1,0 mL min^{-1}) foi utilizado como gás de arraste. A interface CG-EM e a fonte de íons foram 300 °C e 200 °C, respectivamente. O espectrômetro de massa com armadilha de íons foi operado no modo de ionização de elétrons a 70 eV, varredura m/z 50–650 (0,58 tempo total de varredura) e corrente de emissão de 250 mA. Os índices de retenção de Kovats (RI) foram calculados por injeção de uma série homóloga de n-alcanos saturados padrão (C7–C30) e as identificações estruturais foram realizadas por comparação dos espectros de massa e RI correspondentes, como relatado em (ADAMS, 2017).

II.2.4 Caracterização do extrato aquoso

II.2.4.1 Sólidos totais

O teor de sólidos totais no extrato aquoso foi calculado para cada extração a fim de verificar até onde ocorre aumento significativo de sólidos, o que torna justificável a reutilização do extrato. Para tal, 1 mL de amostra foi pesada em balança analítica e seca em estufa durante 24 h a 100 °C (TAPPI T650 OM-15, 2015).

II.2.4.2 Teor de fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada utilizando o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). Para isso, o extrato aquoso foi primeiramente diluído para as leituras em absorbância no espectrofotômetro UV-Vis. Então, 0,1 mL das amostras diluídas, 5 mL de água deionizada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu foram adicionados em um balão volumétrico de 10mL e agitado em vórtex por 1 min. Depois, foram adicionados

2 mL de Na_2CO_3 (15 %) e agitado por 30 s em vórtex. O balão foi avolumado e após 2 h, a absorbância das amostras foi medida a 750 nm em espectrofotômetro Shimadzu (Modelo UV-Mini 1240) utilizando cubetas de quartzo, tendo como "branco" todos os reagentes, menos o extrato. O teor de fenólicos totais foi determinado por meio de interpolação da absorbância das amostras e uma curva de calibração ($y=0,1172x+0,072$; $r^2=0,9988$) construída com padrões de ácido gálico (10 a 250 µg mL^{-1}) e expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

II.2.4.3 Teor de flavonoides

O método utilizando cloreto de alumínio foi utilizado para quantificação do teor de flavonoides equivalentes em quercetina (ZHISHEN et al., 1999). Para isso, foi feita solução de 10 mg de quercetina em 100 mL de etanol 80% para construção da curva de calibração ($y=0.003x-0.0144$; $r^2=0.9979$) de 10 a 100 µg mL^{-1}. Para cada ponto da curva de calibração, foi utilizado 0,5 mL da solução de quercetina diluída, 1,5 mL de etanol 95%, 100 µl de clorito de alumínio 10%, 100 µl de acetato de potássio 1M e 2,8 mL de água deionizada. Depois de um repouso de 30 min no escuro, a absorbância foi medida a 415 nm em um espectrofotômetro Shimadzu (Modelo UV-Mini 1240) utilizando cubetas de quartzo, tendo como branco todos os reagentes, menos a solução de quercetina. Similarmente, para análise das amostras, foram utilizados 0,5 mL dos extratos previamente diluídos. Nesse ensaio, foram selecionados extratos com concentrações intermediárias: 1, 4, 7 e 10 e estes foram diluídos nas seguintes proporções 1:10, 1:20, 1:60 e 1:60 (v/v), respectivamente.

II.2.4.4 Teor de taninos

O conteúdo de taninos condensados foi avaliado de acordo com o ensaio de vanilina Maciel et al. (2020), com algumas modificações. Em um tubo de ensaio, foram adicionados 300 µL do extrato de aquoso, 1800 µL de uma solução de vanilina a 4% (m/v) em metanol e 900 µL de uma solução de H_2SO_4 32% em metanol. A reação ocorreu no escuro a 25 °C por 15 min. A absorbância foi

medida em 500 nm em espectrofotômetro Shimadzu (Modelo UV-Mini 1240) utilizando cubetas de quartzo, tendo como branco todos os reagentes, menos o extrato. Os extratos selecionados para o ensaio foram o extrato 1, 4, 7 e 10 diluídos em 1:10, 1:20, 1:60 e 1:60, respectivamente. O conteúdo de taninos condensados foi determinado a partir de uma curva de calibração ($y=0.002x+0.0107$; $r^2=0.9974$) de catequina de 25 a 250 μl mL^{-1} e os resultados foram expressos em mg equivalente a catequina.

II.2.4.5 Teor de açúcares

A quantificação de mono e dissacarídeos (frutose, glucose, sacarose) presentes no extrato aquoso foi realizada por meio de Cromatografia de Troca Iônica. A separação dos compostos foi realizada em uma coluna CarboPac PA 20 (4 mm x 250 mm, 5 μl e temperatura de 30 °C com NaOH 300 mM como eluente, numa vazão de 0,5 mL min^{-1}), mediante uma curva de calibração construída com frutose (1,0 mg L^{-1} a 20 mg L^{-1}, r^2: 0,9962), glucose (0,5 mg L^{-1} a 15 mg L^{-1}, r^2: 0,9997) e sacarose (0,5 mg L^{-1} a 10 mg L^{-1}, r^2: 0,9998).

II.2.4.6 Cromatografia a gás com espectrometria de massas

Em 10 mg dos extratos secos (1 e 7), 30 µL de ^{13}C-sorbitol (0,2 µg $µL^{-1}$) foram adicionados para a avaliação semiquantitativa de compostos, essa solução foi seca sob vácuo (8 h, 30 °C), depois metoxilada (20 mg mL^{-1} de cloridrato de metoxiamina em piridina, 50 µL, 90 min, 40 °C) e sililanizada (MSTFA, 50 µL, 90 min, 40°C). A fração contendo os compostos hidrofílicos foi analisada por cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massa de íons de armadilha no modo split (1:25). Os compostos foram separados com uma coluna DB-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) com temperatura do injetor a 230 °C, linha de transferência a 250 °C, com hélio a 1,5 mL min^{-1} como gás carreador. O forno do CG foi ajustado a 70 °C, 1 min de isoterma, aquecendo a 320 °C a uma taxa de 8 °C min^{-1}, com isoterma final de 5 min. O espectrômetro de massa foi operado em modo positivo com ionização por impacto de elétrons a 70 eV e temperatura da fonte de íons a 200 °C.

II.2.5 Influência do tempo de extração

O teste de influência do tempo de extração foi conduzido a partir de uma extração por arraste a vapor em equipamento Clevenger com 100 g de folhas de *C. citriodora* e 1000 mL de água deionizada, durante 4 h. O óleo essencial e as folhas residuais foram coletados ao final da extração. Somente o extrato aquoso (avolumado para 1000 mL) permaneceu em aquecimento com refluxo (nas mesmas condições da extração no Clevenger) durante 28 h, a fim de completar o ciclo de 7 extrações sequenciais (tempo verificado ser o ideal para concentração dos compostos). Alíquotas de 2 mL foram retiradas a cada 4 h para avaliar a composição do extrato durante esse tempo. Assim, foi possível mensurar as modificações químicas ocorridas no extrato durante esse período. No final do teste, o extrato restante foi filtrado e análises foram conduzidas com o material filtrado e o retido no filtro. Salienta-se que o extrato proveniente das primeiras 4 h de extração não foi filtrado pois não havia presença de material precipitado. As alíquotas do extrato aquoso coletadas a cada 4 h foram caracterizadas quanto ao teor de polifenóis equivalentes em ácido gálico (método de Folin-Ciocalteu) e com relação à concentração de açúcares (frutose, glucose, sacarose), por meio de Cromatografia de Troca Iônica (IC).

II.2.6 Espectroscopia no infravermelho médio

Espectroscopia no infravermelho médio com transformada de *Fourier* (FTIR) foi realizada nos extratos obtidos em 4 h e 28 h (filtrado e retido no filtro) no teste de influência do tempo de extração e para os extratos obtidos nas extrações sequenciais (1, 7 e 10), a fim de investigar os principais grupos funcionais existentes em cada amostra. Para isso, foram preparadas pastilhas utilizando 100 mg de brometo de potássio (KBr) e 0,5 mg do material (seco em estufa à vácuo por 24 h a 40 °C). Um espectrofotômetro modelo Nicolet iS50 da Thermo Scientific foi configurado para a realização de 64 varreduras, resolução 2 cm^{-1} e leituras entre 4000 e 600 cm^{-1} no modo transmitância.

II.2.7 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) foi utilizada como ferramenta de apoio na investigação dos componentes do extrato aquoso obtido nas extrações sequenciais (1, 7 e 10), para analisar a estabilidade térmica e inferir sobre a presença de compostos. Amostras de 4 h e 28 h (filtrado e retido no filtro) obtidas no teste de influência do tempo de extração também foram analisadas. A curva termogravimétrica (TGA) e a derivada (DTG) foram obtidas utilizando-se um equipamento Q600 TA Instruments. A atmosfera empregada foi de nitrogênio com fluxo de gás de 20 mL min^{-1}, intervalo de temperatura entre 25 e 800 °C e taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1}.

II.2.8 Cromatografia de exclusão de tamanho

A Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC) foi realizada para avaliar a faixa de peso molecular dos compostos presentes nas amostras selecionadas. A análise foi realizada em cromatógrafo AKTA Pure (GE, EUA), utilizando coluna Superdex Peptide 10/300 GL, o líquido eluente empregado foi a acetonitrila, fluxo de 0,5 mL min^{-1}. A detecção dos compostos foi realizada por absorção de UV a 280 nm. Uma varredura foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu (Modelo UV-Mini 1240) na faixa de 200 a 300 nm para verificar o comprimento de onda ideal a ser utilizado. Rutina (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizada como padrão de peso molecular (610.517 g mol^{-1}, ponto de ebulição: 983 °C). As amostras analisadas foram do extrato 4 h de degradação e 28 h de degradação (filtrado e retido no filtro).

II.2.9 Pirólise simultânea e trimetilsililação em conjunto com cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

A pirólise (SpyT-GC-MS) dos extratos secos obtidos em 4 h e 28 h (filtrados e retidos no filtro) foi realizada usando um pirolisador de filamento aquecido (Pyroprobe 5200, CDS). Os materiais sólidos (250 µg) foram sililados em linha com 15 µl de MSTFA:Piridina (20:1). Os produtos da pirólise foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa ion trap (Focus GC, PolarisQ, Thermo). Um injetor split/splitless de 5 mm de diâmetro foi usado (230°C) com uma razão de split de 1:50. Os produtos da

pirólise foram separados usando uma coluna DB-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). O forno do GC foi ajustado para 70 °C, 1 min de isoterma, aquecendo até 320 °C a uma taxa de 8 °C min^{-1}, com isoterma final de 5 min. Os parâmetros extras de GC-MS foram descritos anteriormente. Os compostos foram identificados a partir dos espectros de massa deconvoluídos (AMDIS) por comparação do índice de retenção e dados publicados de MS (MATTONAI; RIBECHINI, 2018; MELO et al., 2018; MELO et al., 2017; MEDEIROS; SIMONEIT, 2007).

II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.3.1 Considerações gerais

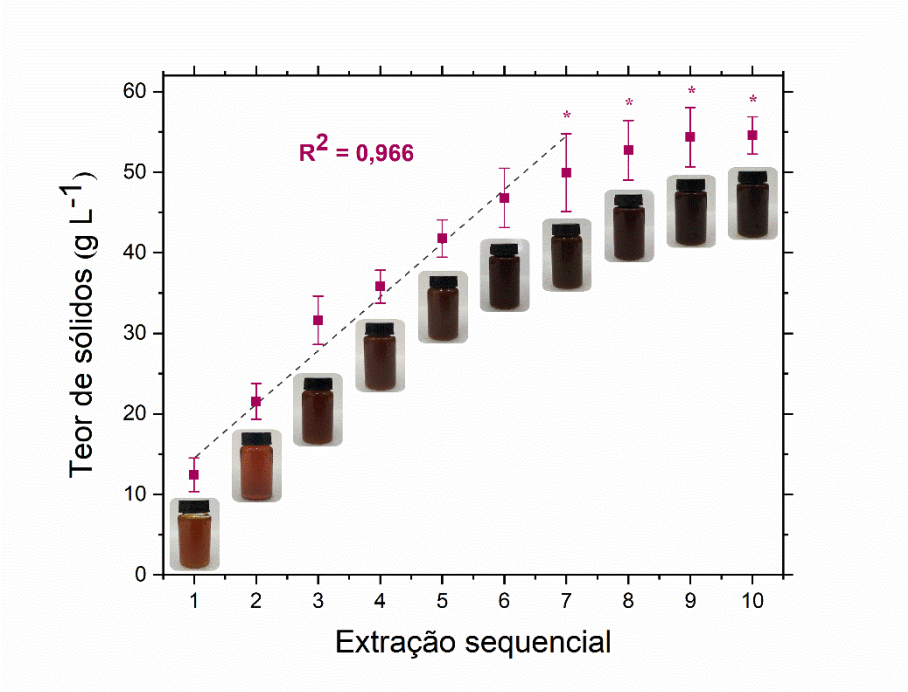
A possibilidade de realizar extrações sequenciais de hidrodestilação promoveu a recuperação do extrato aquoso. Para indicar que a reutilização desse extrato não foi prejudicial para o rendimento e qualidade do óleo essencial, medimos a qualidade média do óleo essencial em cada extração sequencial. Não houve mudanças estatísticas na maioria dos compostos, tais como o componente principal, *Citronellal*, que se manteve estatisticamente estável durante as extrações sequenciais (APÊNDICE II.1). É importante ressaltar que o teor de óleo essencial permaneceu estatisticamente igual durante as etapas de hidrodestilação (3,5 ± 0,4%) (APÊNDICE II.2).

Um dos pressupostos lógicos para a realização de extrações sequenciais é que ocorra a manutenção da qualidade e quantidade de óleo essencial. Desse modo, foi verificado que o extrato aquoso pode ser reciclado em novas extrações, gerando economia no consumo de água pelas indústrias e mitigando a biopoluição do solo.

O teor de sólidos de cada extrato obtido a partir das extrações sequenciais foi monitorado para determinar o máximo potencial de reaproveitamento do extrato aquoso. Um aumento linear inicial (R^2 = 0,966) ocorreu até a sétima extração, de 12 g L^{-1} para 48 g L^{-1}. A partir da oitava extração sequencial, o teor de sólidos manteve-se estatisticamente igual ($P<0,05$), na décima extração obteve-se 54,57 g L^{-1} de sólidos (FIGURA 9). Considerando que quanto mais extrações são realizadas com reaproveitamento do extrato, o efeito da saturação se torna mais evidente no rendimento. Isso está

diretamente relacionado à quantidade de açúcar produzida, o teor de sacarose diminui pois ocorrem modificações químicas de condensação e degradação ou sendo convertida em glicose e frutose (NOLASCO; DE MASSAGUER, 2006).

FIGURA 9 - TEOR DE SÓLIDOS PARA OS EXTRATOS OBTIDOS AO LONGO DAS DEZ EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS.

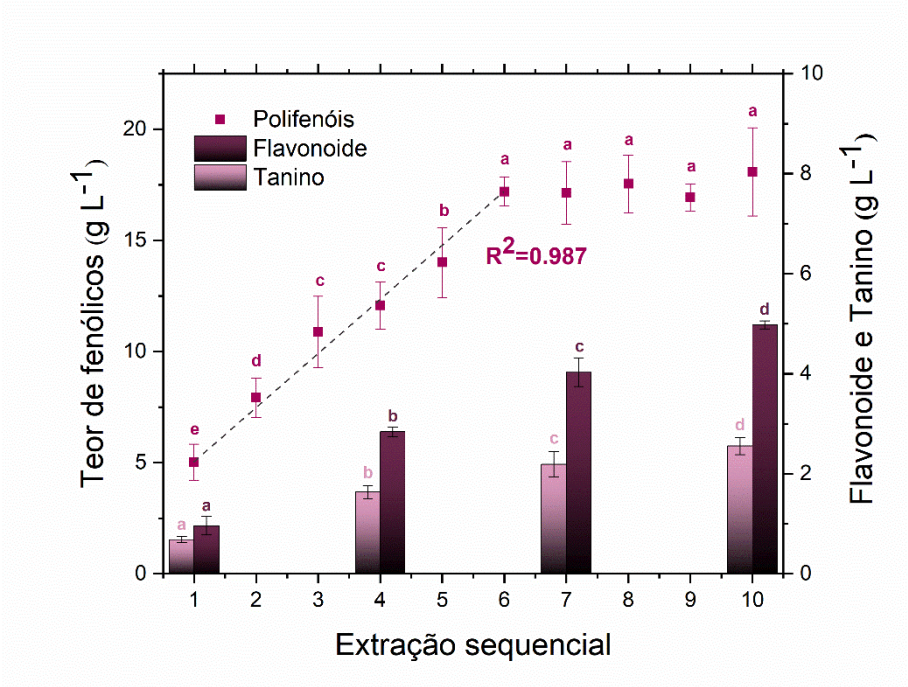


Em que: Valores acompanhados de * indicam que não há diferença estatística significativa, de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$).

O incremento na coloração dos extratos visualizado para os extratos de cada extração sequencial está relacionado ao aumento de compostos extraídos, conforme medido a partir das análises de fenólicos, taninos e flavonoides. Trabalhos anteriores analisando o tempo de extração e a temperatura das plantas apresentam uma tendência semelhante ao obtido neste estudo (DHOUIBI et al., 2021; GHARRED et al., 2021).

Os compostos fenólicos totais apresentam tendência semelhante à observada para o teor de sólidos, com aumento linear (R^2 = 0,987) até a sexta extração (17,19 g L^{-1}), nas etapas posteriores não foi observado aumento significativo ($P<0,05$). No entanto, taninos e flavonoides aumentaram estatisticamente em cada etapa estudada (tanino de 0,68 g L^{-1} para 2,55 g L^{-1}, enquanto flavonoides de 0,96 g L^{-1} para 4,98 g L^{-1}) (FIGURA 10).

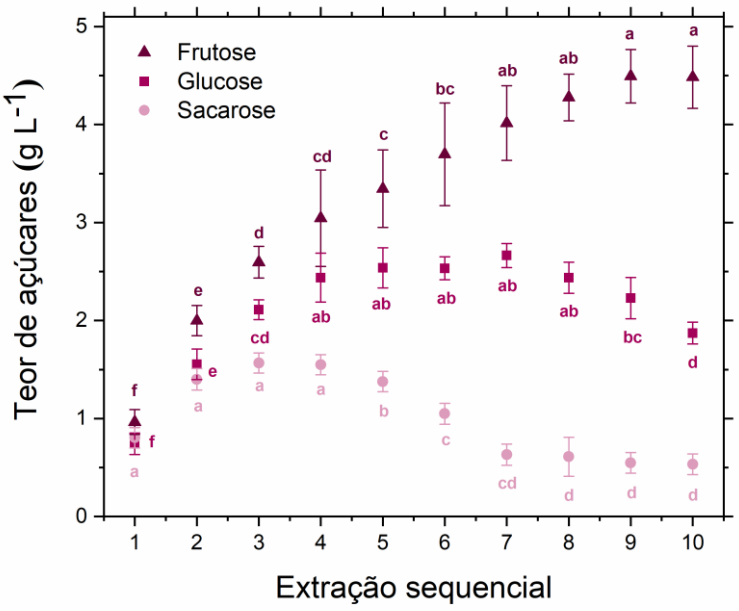
FIGURA 10 - TEOR DE POLIFENÓIS, FLAVONOIDES E TANINOS AO LONGO DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS.



Em que: Letras diferentes indicam que há diferença estatística significativa, de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

A metodologia de extração em etapas sequenciais pode introduzir a formação de novas ligações entre compostos já extraídos nas etapas anteriores e pode estar relacionada ao seu teor de sacarose, por exemplo (FIGURA 11). De forma diferente ao ocorrido para os resultados anteriores de sólidos e polifenois, a frutose aumenta de forma não linear, atingindo uma capacidade limite na 7ª extração. A glicose atinge seu limite de extração na 4ª extração, enquanto a sacarose apresentou o maior valor já na 3ª etapa, diminuindo em seguida e atingindo um limite inferior, ficando então estatisticamente semelhante na 8ª extração para a sacarose e 10ª extração para a glicose.

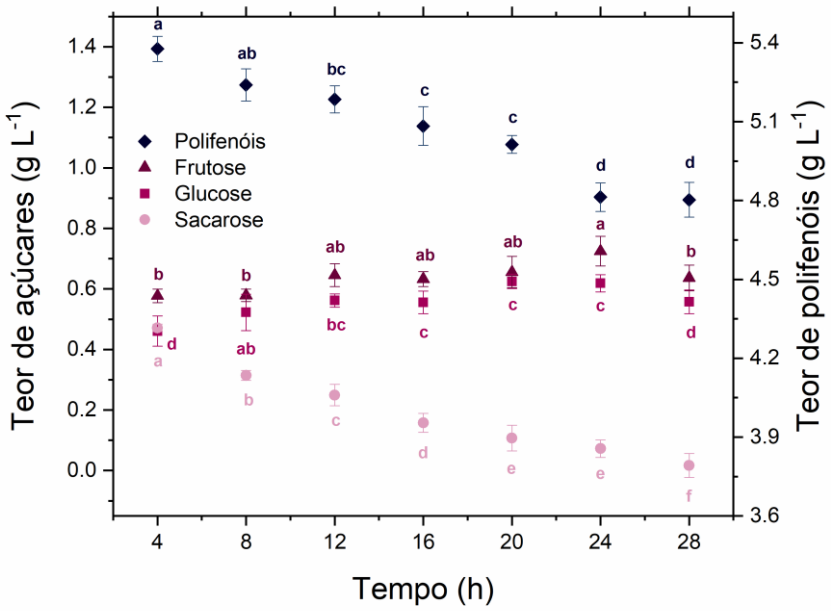
FIGURA 11 – CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES PRESENTE NOS EXTRATOS OBTIDOS NAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS.



Em que: Letras diferentes indicam que há diferença estatística significativa, de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$).

Para verificar a ocorrência de degradação de compostos para o extrato em função do tempo em temperatura fixa, foi realizado um teste com o extrato sem adição de folhas novas. Após um período de 28 h, a 100 °C sob refluxo, observou-se a formação de 525 mg de material precipitado, que foi filtrado para análises de composição química. Ocorreu uma redução de 0,49 g L^{-1} de polifenóis ao final de 28 h de extração, correspondendo a aproximadamente 10% da degradação dos compostos. A sacarose foi reduzida nas extrações sequenciais, pois ocorreram conversões químicas para aumentar a frutose e a glicose (FIGURA 12).

FIGURA 12 - CINÉTICA DOS AÇÚCARES E POLIFENÓIS DO EXTRATO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO.



Em que: Letras diferentes indicam que há diferença estatística significativa, de acordo com o teste de Tukey ($p<0,05$).

Devido à sua estrutura química, muitos compostos fenólicos apresentam menor estabilidade térmica (COSME et al., 2020; GRANATO et al., 2016). Alguns compostos da classe dos açúcares apresentam degradação, tal como a sacarose que diminui de 0,47 g L^{-1} nas primeiras 4 h, para 0,02 g L^{-1} após 28 h de extração, a sua degradando foi de 96%. No entanto, frutose e glicose foram relativamente estáveis ao longo do tempo de exposição à temperatura, ocorreram pequenas diferenças em seus teores durante 28 h de aquecimento, a concentração de frutose foi de 0,58 g L^{-1} (4 h) a 0,60 g L^{-1} (28 h) e a concentração de glicose foi de 0,46 g L^{-1} (4 h) a 0,56 g L^{-1} (28 h) (FIGURA 12).

O teor de açúcar dos extratos no teste ao longo do tempo é muito diferente em comparação com as etapas sequenciais. As etapas sequenciais com cada novo lote de folhas frescas podem apresentar um efeito de sinergismo, relacionado a uma proteção para os compostos fenólicos e condensação de açúcar em uma conversão de ruptura maior devido ao aumento da quantidade. Isso é ainda mais evidente com base no aumento do teor de flavonoides após as extrações sequenciais (FIGURA 10), que são degradados nas temperaturas

estudadas aqui. Portanto, os açúcares tendem a proteger esses compostos por serem um agente primário de combustão no aquecimento, resultado também relatado anteriormente (DE ELGUEA-CULEBRAS et al., 2022).

II.3.2 Cromatografia a gás acoplada espectrometria de massas

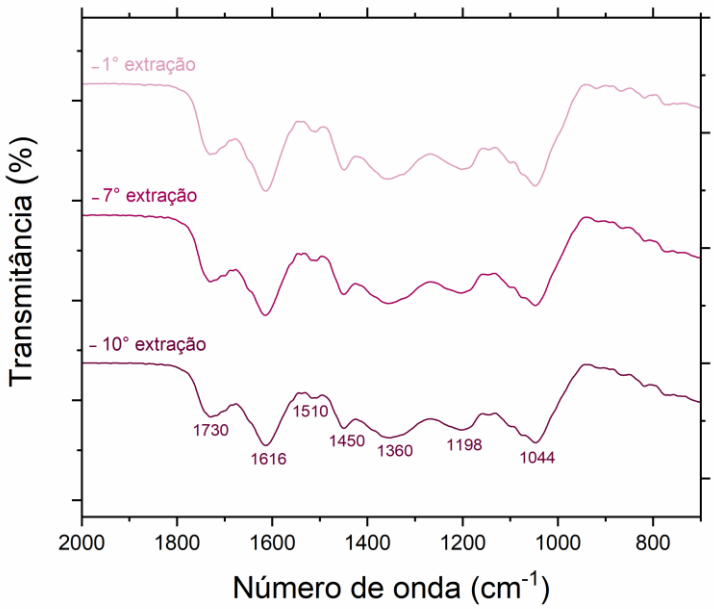
A qualidade dos extratos secos de efluentes foi avaliada por análise GC-MS, os extratos de *C. citriodora* da primeira e a sétima extrações sequenciais mostraram a presença de açúcares, aminas, aminoácidos, aromáticos, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, furanos, ciclitol, ácidos de açúcares e álcoois, fosfatos, óleos essenciais e (APÊNDICE II.3). Comparando as diferenças dos compostos estudados entre a primeira e a sétima etapas sequenciais, poucos apresentaram diferenças significativas embora alguns em maiores diferenças como ácido quínico, glicose, mio-inositol e sacarose. Alguns açúcares tendem a se degradar com o tempo, mesmo em temperaturas de 100 °C, como é o caso da sacarose, que tem redução drástica de extrato na 7ª etapa. No entanto, a glicose aumenta até 30% com o número de extrações, devido ao incremento de compostos a cada extração. Observou-se comportamento diferente para o mio-inositol, pertencente à classe dos ciclitol, que teve redução de concentração após a 7ª extração de extração sequencial. Em resumo, a composição qualitativa de ambos os extratos em relação aos compostos semivoláteis foi muito semelhante.

A degradação térmica e a conversão química dos açúcares concordam com o CG-EM das extrações sequenciais. Foi observada a presença de ramnose, derivada da glicose e encontrada nas paredes celulares das plantas, que pode ter aumentado devido ao processo de hidrodestilação (LIU et al., 2022). O ácido quínico sofreu grande redução após sete extrações sequenciais, o que pode estar relacionado com a sua degradação devido ao tempo prolongado. Além disso, a glicose aumenta devido à degradação dos compostos de carboidratos. Também visto para sacarose e mio-inositol. No entanto, a diminuição do ácido ferúlico e da catequina pode ser em parte devido à condensação/polimerização.

II.3.3 Espectroscopia no infravermelho médio

O FTIR indicou uma grande redução na banda mais intensa do espectro, que está localizada em 3367 cm^{-1} atribuída ao estiramento O-H de hidroxilas livres. Outras bandas importantes são 2938 cm^{-1} (estiramento -C-H em alcanos), 1616 cm^{-1} (estiramento C=C em alcenos), 1510 cm^{-1} (dobra grupo N-H), 1450 cm^{-1} (curvatura C-H em alcanos), 1366 cm^{-1} (esteiramento $-CH_2$ no grupo alquil), 1200 cm^{-1} (C-O de fenóis), 1031–1051 cm^{-1} (C-O estiramento de éteres, ésteres, ácido carboxílico, principalmente relacionado à classe de açúcar) (FIGURA 13, FIGURA 14, APÊNDICE II.4 e APÊNDICE II.5). No geral, o perfil FTIR das amostras submetidas às etapas subsequentes apresenta bandas semelhantes com ausência de deslocamento e, portanto, o extrato aquoso permaneceu semelhante em termos de equilíbrio químico (FIGURA 13).

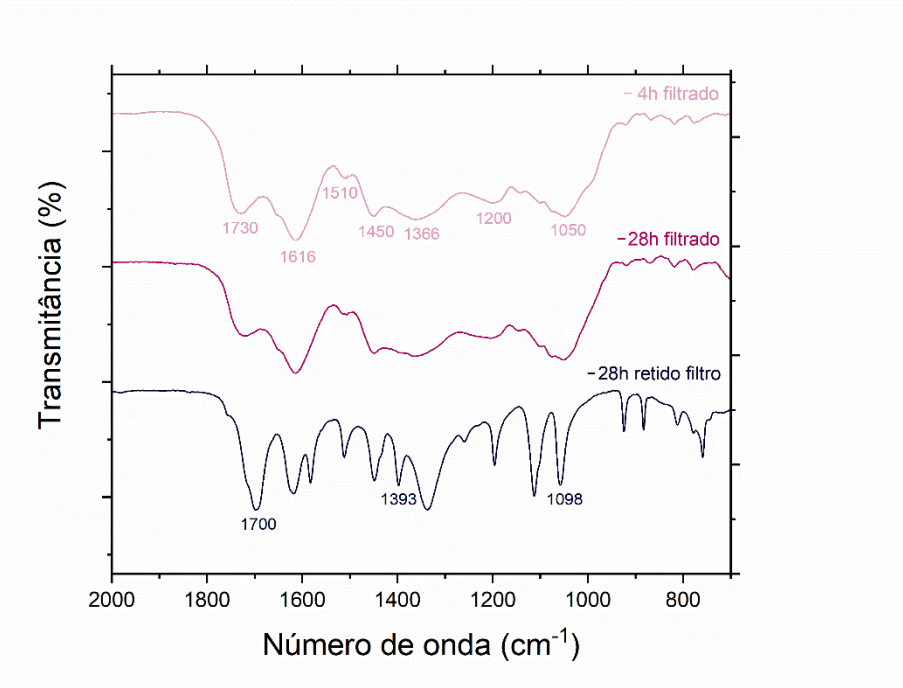
FIGURA 13 - ESPECTROS FTIR DOS EXTRATOS OBTIDOS NA EXTRAÇÃO SEQUENCIAL.



Em termos de influência do tempo (FIGURA 14), o extrato filtrado obtido da extração de 4 h e 28 h foram idênticos ao da primeira extração sequencial. No entanto, a banda em 1730 cm^{-1}, referente ao estiramento da ligação C=O em ésteres, presente na maioria dos extratos, foi deslocada para 1700 cm^{-1} na amostra de 28 h retida no filtro (FIGURA 14). De acordo com a literatura, uma

dupla ligação conjugada a uma carbonila pode mover a absorção do infravermelho para uma frequência de até 30 cm^{-1} menor (SILVERSTEIN et al., 2006).

FIGURA 14 - ESPECTROS FTIR DO EXTRATO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO.



Além disso, houve o surgimento de uma banda em 1098 cm^{-1} no material retido no filtro após 28 h de extração a 100 °C, que foi atribuída às vibrações de estiramento do C-O do éster relacionadas à glicose ou frutose. Em 1393 cm^{-1}, também houve o surgimento de outra banda atribuída ao dobramento de ligações O-H e estiramento C-O de compostos fenólicos. Essas evidências corroboram a premissa de que ocorreu polimerização entre açúcares e polifenóis no material precipitado.

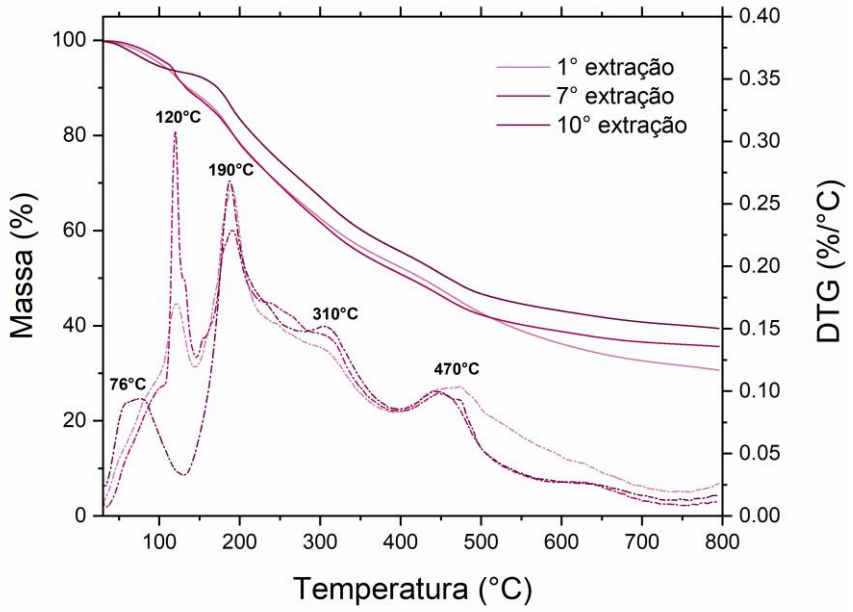
II.3.4 Análise termogravimétrica

As análises térmicas foram avaliadas para as amostras submetidas à extração sequencial e à extração única com tempo prolongado. Ao todo, três eventos térmicos principais podem ser observados (FIGURA 15) para a extração sequencial. O primeiro evento térmico, que ocorre em um pico DTG de 120 °C, está relacionado à degradação de açúcares (NOLASCO; DE MASSAGUER,

2006). No entanto, este evento térmico não ocorreu para o extrato na décima extração.

O segundo evento térmico, na temperatura de 190 °C, é referente a degradação absoluta dos açúcares presentes no extrato, enquanto o último evento térmico, na temperatura de 470 °C, está relacionado ao padrão de degradação dos taninos (LISPERGUER et al., 2016; XIA et al., 2015). Além disso, com o aumento da etapa sequencial, ocorre uma diminuição da intensidade em 310 °C, na qual parece deslocar-se para 250 °C, região também atribuída ao tanino (LISPERGUER et al., 2016). Ao todo, 30,62% são compostos inorgânicos que não se degradam até 800 °C para a 1° extração enquanto 35,6% são compostos inorgânicos na 7ª extração e na 10ª extração, o teor de cinzas foi de 39,4%.

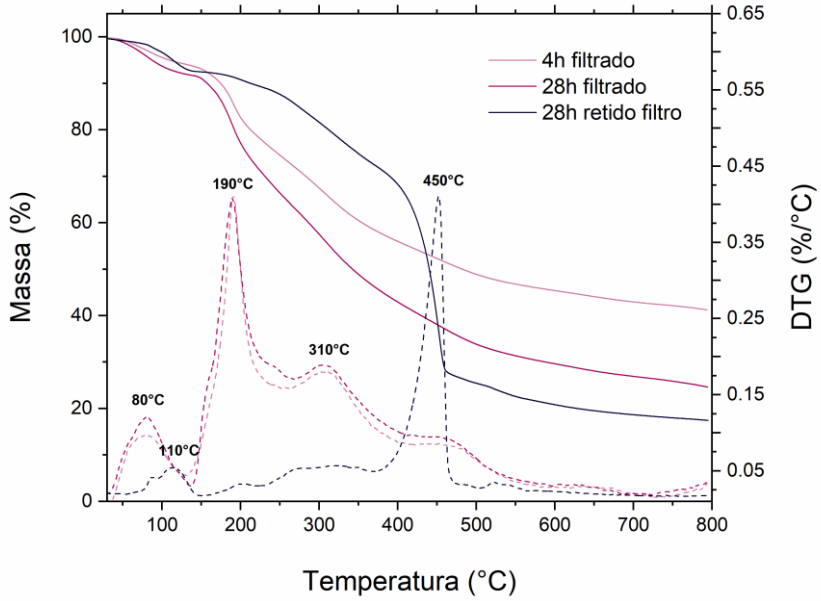
FIGURA 15 - TERMOGRAMAS DE MASSA E DTG OBTIDOS NA EXTRAÇÃO SEQUENCIAL.



As análises térmicas realizadas nas amostras submetidas ao teste de influência do tempo e da temperatura (FIGURA 16) indicam que os extratos filtrados de 4 h e 28 h apresentam termogramas semelhantes aos obtidos das amostras de extrações sequenciais, com pico de degradação mais pronunciado a 300ºC. A porcentagem de material residual para o extrato de 4 h foi de 37,4 % e 37,5 % para o extrato após 28 h de exposição à temperatura. Ao contrário, a

amostra retida no filtro às 28 h possui um termograma com um evento térmico em 110 °C e após, o pico máximo de perda de massa foi em 450 °C.

FIGURA 16 - TERMOGRAMAS e DTG EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO.



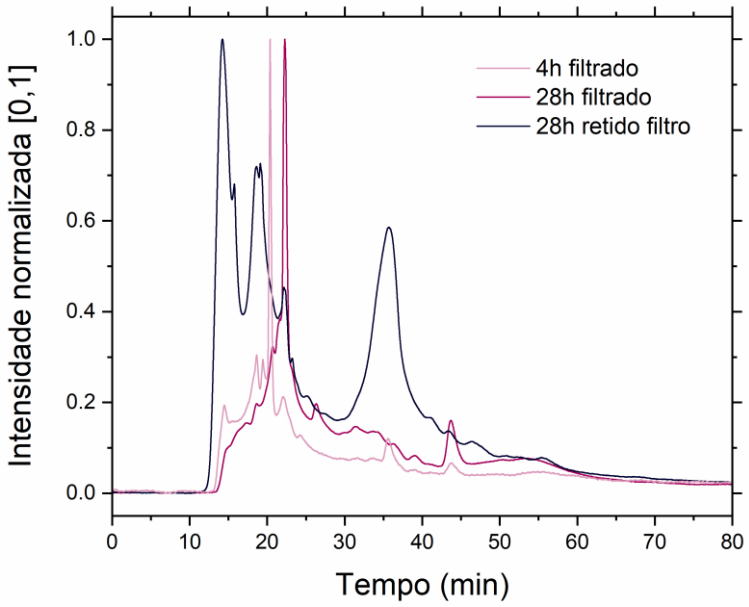
Ao analisar os termogramas, verifica-se que na 10ª extração, a sacarose está presente em baixas concentrações com um pico de degradação ausente, uma diminuição também é percebida para os ácidos orgânicos (120 °C), mas é possível que um composto conjugado tenha ocorrido devido ao perfil DTG mais amplo e pico diminuído (76 °C), assim como observado com os espectros de FTIR (FIGURA 14). No entanto, o estudo da influência do tempo mostra o pico de ácido orgânico (118 °C) apenas no material retido, que pode ser referente ao tanino hidrolisável.

Uma vez que novos picos foram vistos apenas neste material formado, é uma forte evidência de ocorrência de uma reação de condensação/ polimerização. Existe um equilíbrio entre a quantidade de tanino e açúcar na amostra quando estudada por TGA conforme detalhado por (ZHAO; UMEMURA, 2015), formando dois picos em torno de 200-400 °C quando há equilíbrio entre esses dois compostos. A distribuição de tamanho molecular também mostrou que o material retido no filtro possui moléculas maiores (FIGURA 17).

II.3.5 Distribuição do tamanho molecular

A distribuição do tamanho molecular foi realizada nas amostras submetidas ao teste de influência do tempo de extração (FIGURA 17). Os extratos filtrados têm características semelhantes, mas em tempo prolongado de extração (28 h), o tempo de retenção foi 2,5 min menor que no extrato de 4 h. Existem moléculas de tamanho molecular menor que a rutina (610.517 g mol^{-1}, ponto de ebulição: 983 °C) com tempo de retenção de 40 min no extrato com 4 h de exposição à temperatura, o que não foi verificado na amostra após 28 h deste teste.

FIGURA 17 – CROMATOGRAMAS DE DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO MOLECULAR.



A amostra de 28h retida no filtro apresentou predominância de moléculas maiores. A amostra retida no filtro após 28 h do experimento além de apresentar moléculas maiores e em maior quantidade, apresenta presença de moléculas com tempo de retenção de 14 min, 18 min e depois 35 min. Esses picos em 35 min não são observados no extrato filtrado.

II.3.6 Pirólise simultânea e trimetilsililação em conjunto com cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

O SPyT dos extratos (4 e 28 h) exibe compostos produzidos por pirólise semelhantes com alta distribuição de 1,2,3-tryhydroxaybenzene, ácido quínico, α e β-frutofuranose, α-glucopiranose e ácido gálico, este último foi o principal composto produzido por pirólise (APÊNDICE II.6). Os compostos produzidos por pirólise, como ácido quínico, α-frutofuranose, β-frutofuranose e α-glucopiranose, podem refletir os compostos presentes em alta abundância em extratos hidrofílicos, sendo a frutosfuranose e glicopiranose os produtos SPyT de frutose e glicose, respectivamente (KATO et al., 1969; MEDEIROS; SIMONEIT, 2007; NOLASCO; DE MASSAGUER, 2006). A alta abundância de ácido gálico pode refletir o ácido gálico presente nos extratos hidrofílicos, mas o mais provável é que ele ocorra em alta abundância devido a ser o produto da pirólise de taninos hidrolisáveis (MATTONAI; RIBECHINI, 2018; MEDEIROS; SIMONEIT, 2007; NIEROP et al., 2005). No entanto, no extrato retido no filtro de 28 h, foi detectado um aumento na abundância dos compostos produzidos pela pirólise, principalmente 1,2,3-trihidroxibenzeno, 1,3,5-trihidroxibenzeno, ácido gálico e derivados do ácido gálico, que podem ser responsáveis pela formação de taninos hidrolisáveis e condensados insolúveis no extrato. O 1,2,3-trimetoxibenzeno foi previamente identificado como um marcador SPyT de polissacarídeos (MELO et al., 2018), que junto com 1,2,4-trihidroxibenzeno e levoglucosan pode ser um indicativo de coprecipitação de polissacarídeos.

Para entender o efeito da condensação/polimerização, o SPyT-GC-MS forneceu os melhores resultados. Ocorreu condensação/polimerização de polissacarídeos (levoglucosan, 1,2,4-trihidroxibenzeno) e taninos hidrolisáveis (alta quantidade do produto de pirólise ácido gálico) com menor quantidade de tanino condensado devido ao aumento da quantidade de 1,3,5-trihidroxibenzeno de um produto de pirólise do anel de catequinas e 1,2,3-trihidroxibenzeno de um anel da estrutura da galocatequina (NIEROP et al., 2005). Tal condensação/polimerização parece ocorrer em grande extensão após um longo período de aquecimento.

II.4 CONCLUSÕES

Foi possível, a partir de extrações sequenciais, concentrar os sólidos no extrato aquoso de *C. citriodora* proveniente da hidrodestilação por arraste a

vapor de óleos essenciais em até sete vezes. A reutilização do extrato aquoso não interferiu no rendimento e na qualidade do óleo essencial destilado. No entanto, observou-se que o reaproveitamento desse extrato aquoso diminuiu a capacidade de extrair compostos bioativos das folhas e a concentração máxima de compostos foi obtida com a sétima extração. Avaliando-se a composição individual dos extratos em função do teor de sólidos, por meio de CG-EM, observou-se que alguns compostos diminuíram, como compostos da classe aromática, fenólica e ciclitol. A sacarose é um açúcar que também tem sua concentração reduzida no extrato durante as extrações sequenciais. O tempo de extração e a temperatura foram fatores que influenciaram na decomposição dos compostos presentes no extrato. O aumento do tempo em que os compostos permaneceram sob aquecimento (100 °C) promoveu o aparecimento de precipitados, que foram relacionados a uma mistura de taninos hidrolisáveis, polissacarídeos e uma menor quantidade de tanino condensado. Assim, as extrações sequenciais por hidrodestilação de *C. citriodora* pode aumentar os polifenóis do efluente, como taninos, e possivelmente dos flavonoides. A não degradação dos flavonoides pode ser atribuída aos açúcares, pois ocorre diminuição na quantidade de sacarose e aumento da frutose e da glicose. Esta pesquisa demonstra que o reaproveitamento de efluentes pode ser promissor não apenas para obtenção de produtos com potencial interesse comercial, mas também para a obtenção de óleo essencial de forma mais sustentável, uma vez que promoveu a reutilização da água.

CAPÍTULO III

SEPARAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS A PARTIR DOS EXTRATOS DE *C. citriodora* PROVENIENTES DA HIDRODESTILAÇÃO DAS FOLHAS

III.1 INTRODUÇÃO

Extratos naturais são produtos valiosos em compostos bioativos, tais como polifenóis, aminoácidos, açúcares e derivados (LIANG et al., 2023). Nos extratos aquosos provenientes da hidrodestilação de óleos essenciais de *C. citriodora* existe uma variedade de compostos de valor tais como os polifenóis, flavonoides, taninos, açúcares, açúcares álcoois, e ácidos orgânicos (GOODINE; OELGEMÖLLER, 2020; IRAM et al., 2015), que possuem aplicações distintas na química fina, em alimentos e em materiais (GUO et al., 2021; MELO et al., 2023).

Os açúcares podem ser uma matéria-prima direta para uso como precursor na fermentação (SINGHVI; GOKHALE, 2013), embora a presença de polifenóis possa prejudicar esses processos fermentativos (MIERA et al., 2022). Inibidores típicos incluem ácidos orgânicos e compostos de natureza fenólica precursores da lignina. Estes últimos são relatados como mais tóxicos para os microorganismos responsáveis pela fermentação, pois afetam não só o processo fermentativo, mas também o crescimento microbiano (ABDEL-RAHMAN et al., 2011; STANFORD et al., 2018).

Para que os compostos presentes nos extratos da *C. citriodora* sejam utilizados de forma mais eficiente, é essencial que métodos de separação e purificação sejam validados (FADEL et al., 2018). Existem vários tipos de adsorventes que podem ser empregados na remoção de polifenóis e análogos durante o tratamento de águas residuais, incluindo resinas poliméricas, biomateriais, carvão ativado e sílica (DAMJANOVIĆ et al., 2010; LEE et al., 2011). Nesta pesquisa, foram estudados adsorventes a base de sílica, que são os adsorventes mais utilizados na cromatografia e adsorventes a base de resina polimérica, que apresentam vantagens de custo e uso em larga escala (STANFORD et al., 2018).

Considerando-se um modelo de biorrefinaria integrado a uma indústria de hidrodestilação de óleos essenciais da *C. citriodora*, é possível vislumbrar o aproveitamento dos extratos aquosos por meio de extrações sequenciais com o reuso da água, para assim concentrar os compostos bioativos e, posteriormente, separá-los em frações com maior concentração de açúcares e outra com maior quantidade de polifenóis. Nesse contexto, este capítulo aborda a separação de biomoléculas a partir de extratos de *C. citriodora* obtidos por hidrodestilação das

folhas, utilizando colunas de sílica e polimérica a fim de separar duas principais classes de compostos: açúcares e polifenóis.

III.2 MATERIAL E MÉTODOS

III.2.1 Obtenção dos materiais das colunas

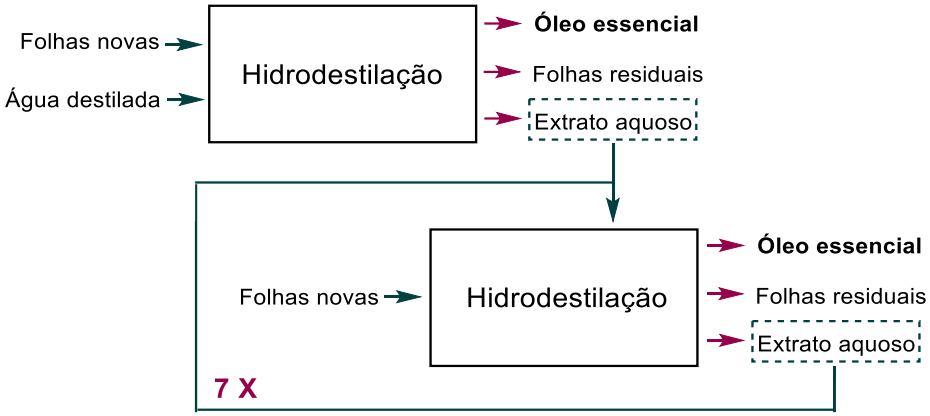
Os materiais adsorventes utilizados como colunas nesse estudo foram sílica funcionalizada e resina polidivinilbenzeno. Sílica funcionalizada a um hidrocarboneto octadecil (C18) foi utilizada como coluna nesse estudo (Angela Tecnologies, Tianjin, China). O diâmetro das partículas da C18 é de 60 Å, sua carga de carbono é de 19% e a área superficial é de 480 m^2 g^{-1}. Já a resina de polidivinilbenzeno (K29) foi empregada nesse estudo em colunas de troca iônica (Filadélfia, EUA). A K29 possui diâmetro do poro de 220 Å, volume de poro de 1,9 mL g^{-1} e área superficial de 850 m^2 g^{-1}.

III.2.2 Obtenção e preparo do extrato

Folhas de *C. citriodora* (umidade de 55%) foram utilizadas neste estudo, provenientes de plantio experimental da Embrapa Florestas, localizada em Colombo-PR, Brasil (25,3217° S, 49,1596° W). As folhas foram coletadas de forma aleatória de 50 árvores com um ano de idade, durante os meses de dezembro de 2021 a fevereiro de 2022. A região de colheita possui predominância de clima tropical, com temperaturas variando entre 20 e 30°C. O extrato foi produzido a partir de extrações sequenciais, para tal, 100 g de folhas de *C. citriodora* foram submetidas a hidrodestilação por arraste a vapor em um extrator do tipo Clevenger durante 4 h na temperatura de ebulição da água (100 °C). A proporção de folhas para água destilada foi de 1:10 m/v. O extrato aquoso contendo os compostos solúveis em água na temperatura de 100 °C foi coletado e utilizado em uma nova extração com folhas frescas. Foram realizadas 7 extrações com reaproveitamento de extrato aquoso, onde o volume do extrato foi ajustado com água deionizada para manter a proporção 1:10 entre folhas e água (FIGURA 18).

,

FIGURA 18 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA EXTRAÇÃO SEQUENCIAL.



Fonte: A autora (2023).

III.2.3 Cinética de adsorção

A cinética de adsorção de polifenóis pela resina K29 e pela sílica C18 foi realizada para verificar o tempo de interação necessário entre os materiais das colunas e o extrato de *C. citriodora* a fim de obter a máxima adsorção. Para isso, 100 mL do extrato com concentração de polifenóis conhecida (17 g L^{-1}) foram adicionados a um frasco, juntamente de 100 mg dos materiais adsorventes (C18 e K29). Os frascos foram incubados sob agitação de 100 rpm à temperatura ambiente. A concentração de polifenóis foi determinada após tempos pré-determinados (1, 5, 10, 15, 20 e 30 min).

II.2.4 Isoterma de adsorção de polifenóis

As isotermas de adsorção dos polifenóis pela resina K29 e pela sílica C18 foram obtidas utilizando o extrato aquoso de *C. citriodora*, com concentração inicial de polifenóis de 17 g L^{-1}. A concentração de adsorventes em função da adsorção dos polifenóis foi testada (10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 mg L^{-1}) em Erlenmeyer. Para garantir o equilíbrio dinâmico da adsorção, a solução contendo o adsorvente foi mantida em agitação (100 rpm) e sob temperatura constante de 25 °C durante 20 min, tempo determinado a partir da cinética de adsorção. Após esse tempo, a solução foi filtrada e a concentração de polifenóis

residual foi determinada pelo método de Folin Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965).

II.2.5 Reutilização do adsorvente

A reutilização é um parâmetro vital para determinar se a utilização do adsorvente é viável em processos industriais. Para avaliar a possibilidade de reutilização da resina K29, cinco ciclos de adsorção-dessorção foram realizados. A sílica C18 não foi testada pois ela não é reutilizável. Nesse estudo, foram adicionados 200 mg dos adsorventes (K29 e C18) em solução aquosa contendo 17 g L^{-1} de polifenóis, os quais foram incubados por 20 min sob agitação de 100 rpm à 25 °C. Após adsorção, a solução foi filtrada e o filtrado líquido foi armazenado para posterior análise do teor de polifenóis. O sólido retido (K29 ou C18) foi recuperado e dessorvido utilizando álcool etílico 99% (20 mL). A dessorção foi realizada similarmente ao processo de adsorção, mantendo-se a suspensão em incubadora (25 °C, 20 min, 100 rpm). Essa etapa foi repetida até que o álcool estivesse translúcido. Ao final do tempo de dessorção, cada solução foi filtrada e o filtrado líquido foi armazenado para posterior análise do teor de polifenóis. O ciclo de adsorção-dessorção foi repetido cinco vezes, avaliando-se a remoção dos polifenóis em cada ciclo.

III.2.6 Separação dos compostos

Extratos de *C. citriodora* submetidos a 7 extrações sequenciais foram preparados para a separação nas colunas C18 (MAGALHÃES et al., 2021) e K29 a uma razão de 0,5 g ml^{-1} de massa da fase estacionária por volume do eluente. Essa razão foi previamente testada e os resultados podem ser visualizados no no apêndice (APÊNDICE III.7, APÊNDICE III.8, APÊNDICE III.9). Para tal, as colunas foram condicionadas em álcool etílico (99,8 %, Sigma Aldrich) e água deionizada. Após condicionamento, o extrato foi separado nas colunas por meio do contato com o material adsorvente. Água deionizada (1:3, extrato:água) foi utilizada para remover todo o açúcar contido na coluna, e a fração aquosa (F.A.C e F.A.K) foi coletada para posterior caracterização. Os compostos adsorvidos

pelas colunas foram dessorvidos utilizando álcool etílico 99,8% (1:2, extrato:etanol), para a obtenção da fração etanoica (F.E.C e F.E.K).

III.2.7 Teor de fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais foi realizada utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). Para isso, 0,1 mL das amostras, 5 mL de água deionizada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu foram adicionados em um balão volumétrico de 10mL e agitado em vórtex por 1 min. Depois, foram adicionados 2 mL de Na_2CO_3 (15 %) e agitado por 30 s em vórtex. O balão foi avolumado e após 2h, a absorbância das amostras foi medida a 750 nm em espectrofotômetro Shimadzu (Modelo UV-Mini 1240) utilizando-se cubetas de quartzo, e tendo como “branco” todos os reagentes, menos o extrato. O teor de fenólicos totais foi determinado por meio de interpolação da absorbância das amostras e uma curva de calibração ($y=0,1172x+0,072$; $r^2=0,9988$) construída com padrões de ácido gálico (10 a 250 µg mL^{-1}) e expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

III.2.8 Teor de açúcares

A quantificação dos açúcares (frutose, glucose, sacarose) presentes nas frações foi realizada por meio de Cromatografia de Troca Iônica. A separação dos compostos foi realizada em uma coluna CarboPac PA 20 (4 mm x 250 mm, 5 µl e temperatura de 30 °C com NaOH 300 mM como eluente, numa vazão de 0,5 mL min^{-1}), mediante uma curva de calibração construída com frutose (1,0 mg L^{-1} a 20 mg L^{-1}, r^2: 0,9962), glucose (0,5 mg L^{-1} a 15 mg L^{-1}, r^2: 0,9997) e sacarose (0,5 mg L^{-1} a 10 mg L^{-1}, r^2: 0,9998).

III.2.9 Cromatografia a gás com espectrometria de massas

Em 50 µL do extrato e das frações secos, 30 µL de ^{13}C-sorbitol (0,2 µg μL^{-1}) foram adicionados para a avaliação semiquantitativa de compostos, essa solução foi seca sob vácuo (8 h, 30 °C), depois metoxilada (20 mg mL^{-1} de

cloridrato de metoxiamina em piridina, 50 µL, 90 min, 40 °C) e sililanizada (MSTFA, 50 µL, 90 min, 40°C). A fração contendo os compostos hidrofílicos foi analisada por cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massa (CG-EM) de íons de armadilha no modo split (1:25). Os compostos foram separados com uma coluna DB-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) com temperatura do injetor a 230 °C, linha de transferência a 250 °C, com hélio a 1,5 mL min^{-1} como gás carreador. O forno do CG foi ajustado a 70 °C, 1 min de isoterma, aquecendo a 320 °C a uma taxa de 8 °C min^{-1}, com isoterma final de 5 min. O espectrômetro de massa foi operado em modo positivo com ionização por impacto de elétrons a 70 eV e temperatura da fonte de íons a 200 °C.

III.2.10 Pirólise simultânea e trimetilsililação em conjunto com cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

A pirólise (SpyT-GC-MS) dos extratos secos obtidos em 4h e 28h (filtrados e retidos no filtro) foi realizada usando um pirolisador de filamento aquecido (Pyroprobe 5200, CDS). Os materiais sólidos (250 µg) foram sililados em linha com 15 µl de MSTFA:Piridina (20:1). Os produtos da pirólise foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa ion trap (Focus GC, PolarisQ, Thermo). Um injetor split/splitless de 5 mm de diâmetro foi usado (230°C) com uma razão de split de 1:50. Os produtos da pirólise foram separados usando uma coluna DB-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). O forno do GC foi ajustado para 70 °C, 1 min de isoterma, aquecendo até 320 °C a uma taxa de 8 °C min^{-1}, com isoterma final de 5 min. Os parâmetros extras de CG-EM foram descritos anteriormente. Os compostos foram identificados a partir dos espectros de massa deconvoluídos (AMDIS) por comparação do índice de retenção e dados publicados de MS (MATTONAI; RIBECHINI, MELO et al., 2018; MELO et al., 2017; MEDEIROS e SIMONEIT, 2007).

III.2.11 Espectroscopia no infravermelho médio

Espectroscopia no infravermelho médio por reflectância total atenuada (ATR-IR) foi realizada para as frações aquosa (F.A.K) e etanoica (F.E.K) da coluna K29, a fim de investigar os principais grupos funcionais existentes em

cada amostra. Para isso, foram utilizadas 10 mg de amostras secas à vácuo por 24 h a 30 °C, as quais foram depositadas sobre cristal de ZnSe para aquisição dos espectros. Um espectrofotômetro modelo Nicolet iS50 da Thermo Scientific foi configurado para a realização de 64 varreduras, resolução 2 cm^{-1} e leituras entre 4000 e 600 cm^{-1}, no modo transmitância.

III.2.12 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) foi utilizada como ferramenta de apoio na investigação dos componentes das frações (F.A.K e F.E.K), para analisar a estabilidade térmica e inferir sobre a presença dos compostos. As curvas termogravimétricas (TG) e as derivadas (dTG) foram obtidas utilizando-se um equipamento Q600 (TA Instruments). A atmosfera empregada foi de nitrogênio (N_2) com fluxo de gás de 50 mL min^{-1}, intervalo de temperatura entre 25 e 800 °C, e taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1}.

III.2.13 Capacidade antioxidante das frações

A eliminação de radicais livres através do ensaio DPPH foi determinada de acordo com (BRAND-WILLIAMS et al., 1995), com pequenas modificações. Resumidamente, 100 μL de extrato e das frações (F.A.K e F.E.K) foram adicionados a 3,9 mL de solução de 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) em metanol (0,06 mmol L^{-1}). A mistura permaneceu no escuro por 30 min e posteriormente a sua absorbância foi medida em um espectrofotômetro Shimadzu (Modelo UV-Mini 1240) a 515 nm. Os resultados foram expressos em equivalente Trolox, contra uma curva de calibração (R^2 = 0.9916, y = -0.0006x + 0.6236).

A eliminação de radicais livres pelo radical de 2,2'-azino-Bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) foi determinada de acordo com Re et al., (1999). Um volume de 88 μL de persulfato de potássio (140 mmol L^{-1}) foi adicionado a 5 mL de ABTS (7 mmol L^{-1}). A mistura foi armazenada no escuro e em temperatura ambiente por 16 h. A absorbância da solução ABTS foi ajustada, com metanol, para 0,70±0,05 a λ=734 nm. Em seguida, 30 μL de extrato e das

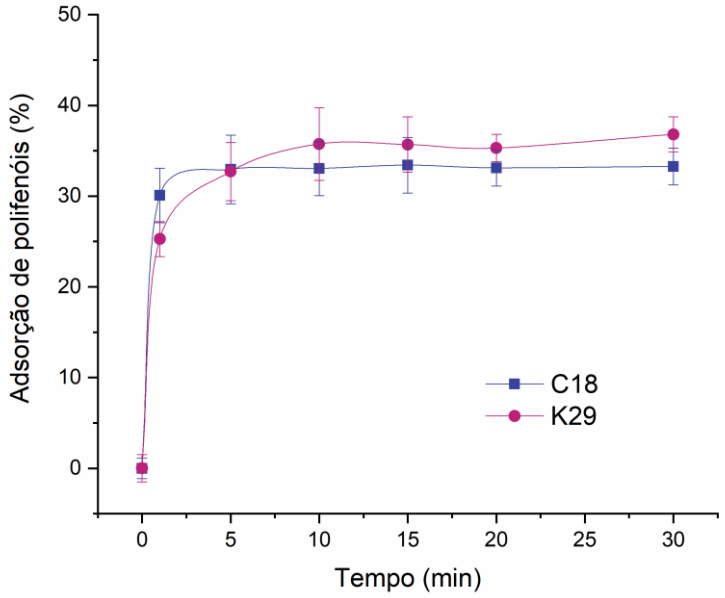
frações (F.A.7.P e F.E.7.P) foram adicionados a 3 mL da solução ABTS. A mistura permaneceu no escuro por 2 h (R^2 = 0.9938, y = -0.0003x + 0.6851).

III.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.3.1 Características dos materiais adsorventes

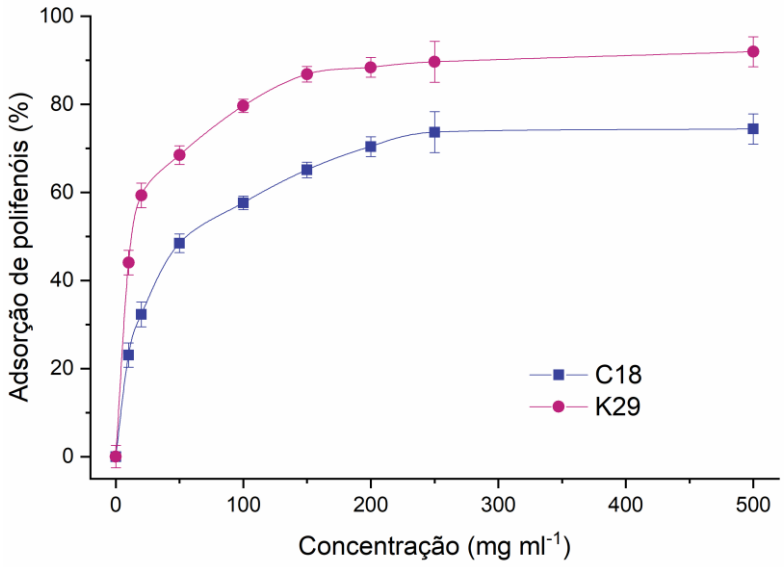
A partir da cinética de adsorção de polifenóis pelos materiais adsorventes, foi observado que o tempo de contato com o adsorvente C18 foi constante a partir de 5 min. Por outro lado, para o adsorvente K29 o tempo de contato foi maior, aos 10 min, onde obteve-se a máxima adsorção de polifenóis (FIGURA 19). Com isso, foi possível indicar a vazão necessária quando os adsorventes forem utilizados em colunas. A vazão para K29 foi menor, pois o tempo de contato com o extrato foi maior para obter-se a máxima adsorção. Isso ocorreu devido ao tamanho de partículas do adsorvente K29 ser maior que em comparação à C18. O tempo de contato entre adsorventes e colunas foi uma medida importante na análise de fases estacionárias de colunas (SIMOES-CARDOSO et al., 2019), para análise dos tempos de processo em sistemas industriais.

FIGURA 19 - CINÉTICA DE ADSORÇÃO DE POLIFENÓIS PARA OS ADSORVENTES.



As isotermas de adsorção obtidas pelos ensaios realizados com variação de concentração dos adsorventes foram importantes para inferir sobre a proporção ideal entre adsorvente e extrato (FIGURA 20). Foi observado que a partir de 250 mg mL^{-1}, a adsorção foi constante para ambos os materiais, embora a capacidade de adsorção foi maior para o adsorvente K29 (90%), em comparação com o adsorvente C18 (75%).

FIGURA 20 – ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE POLIFENÓIS PARA OS ADSORVENTES.



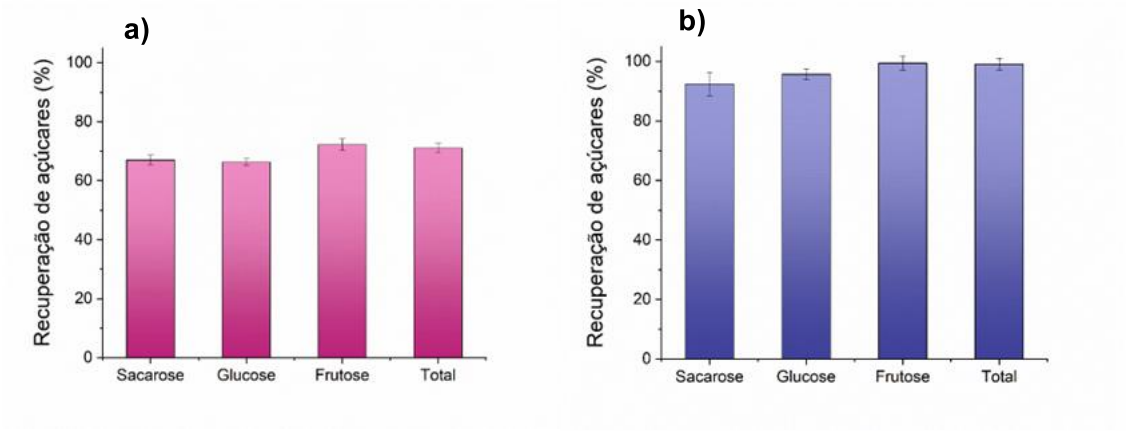
Isotermas de adsorção são importantes parâmetros para inferir sobre os materiais adsorventes, de acordo com os compostos que se deseja separar nas colunas (HOU; ZHANG, 2021), embora sejam necessárias análises adicionais para garantir a escolha do melhor adsorvente, baseado em modelos experimentais (ARANTES, 2022).

III.3.2 Recuperação dos compostos

Depois dos testes cinéticos e de isoterma para verificar o comportamento dos materiais adsorventes, foi possível finalmente separar o extrato de *C. citriodora* oriundo de sete hidrodestilações sequenciais, no qual a recuperação

de açúcares totais utilizando-se a coluna K29 foi de 71% (FIGURA 21a) e para a coluna C18 foi de 99% (FIGURA 21b). A maior remoção para ambas as colunas foi para a frutose, seguida da glucose e da sacarose. A menor interação do adsorvente com a frutose e glucose, se deve ao tamanho molecular da sacarose, que é um dissacarídeo, e por isso não é recuperada nas mesmas proporções (FERRO et al., 2019; WOODBURY et al., 2023). As colunas de contato atuam por meio de forças de van der Waals de dipolo-dipolo (AMORIM, 2019), em que as moléculas são atraídas por cargas opostas (ISRAELACHVILI, 2011). Dessa forma, as moléculas dos polifenóis, que possuem abundância de grupos hidroxila em suas extremidades (GRANATO et al., 2016), foram adsorvidas pelas colunas de matriz polimérica e de sílica devido às diferentes cargas superficiais e os açúcares não ficam adsorvidos, por isso ocorre a separação.

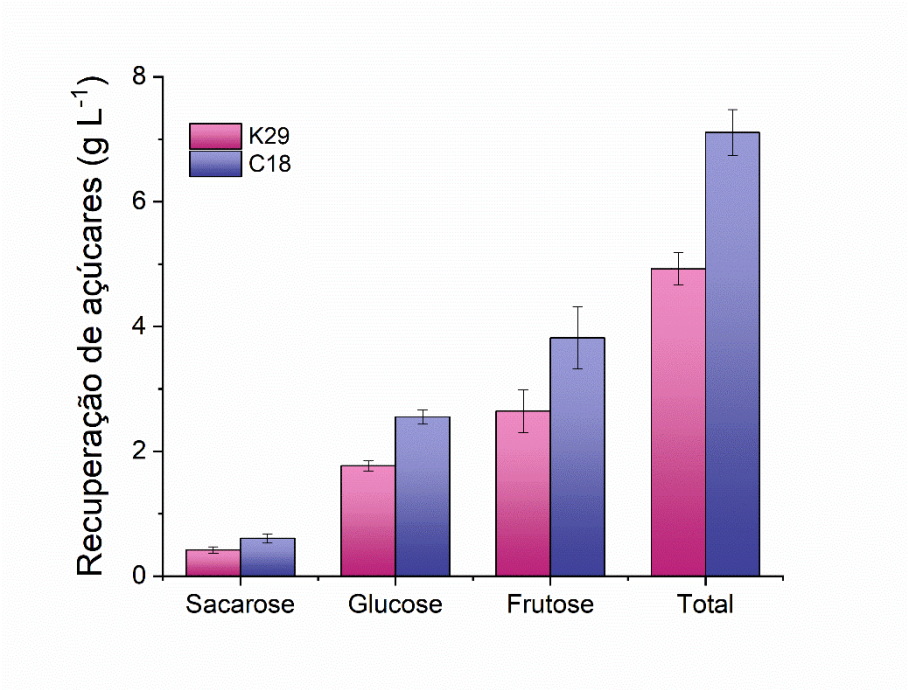
FIGURA 21 – CAPACIDADE DE RECUPERAÇÃO DE AÇÚCARES NA FRAÇÃO AQUOSA a) F.A.K E b) F.A.K (%) UTILIZANDO COLUNAS DE CONTATO.



Avaliando-se a recuperação individual de cada composto, foi possível verificar que a coluna C18 foi mais eficiente na separação dos açúcares. Enquanto com a coluna K29 foi possível a recuperação de 4,9 g L^{-1} de açúcares totais do extrato de *C. citriodora*, com a coluna C18 foi possível a remoção de 7,1 g L^{-1} de açúcares totais da fase estacionária (FIGURA 22). No entanto, embora esta coluna apresente eficiência na recuperação de açúcares da fase estacionária e possua aplicações em diversos segmentos (alimentos, fármacos, ambiental), esse material ainda não é empregado em escala industrial devido aos custos na produção da sílica octadecil funcionalizada (ZHANG et al., 2017),

questões ambientais ligadas ao uso e descarte de sílica também são questões a serem levadas em consideração.

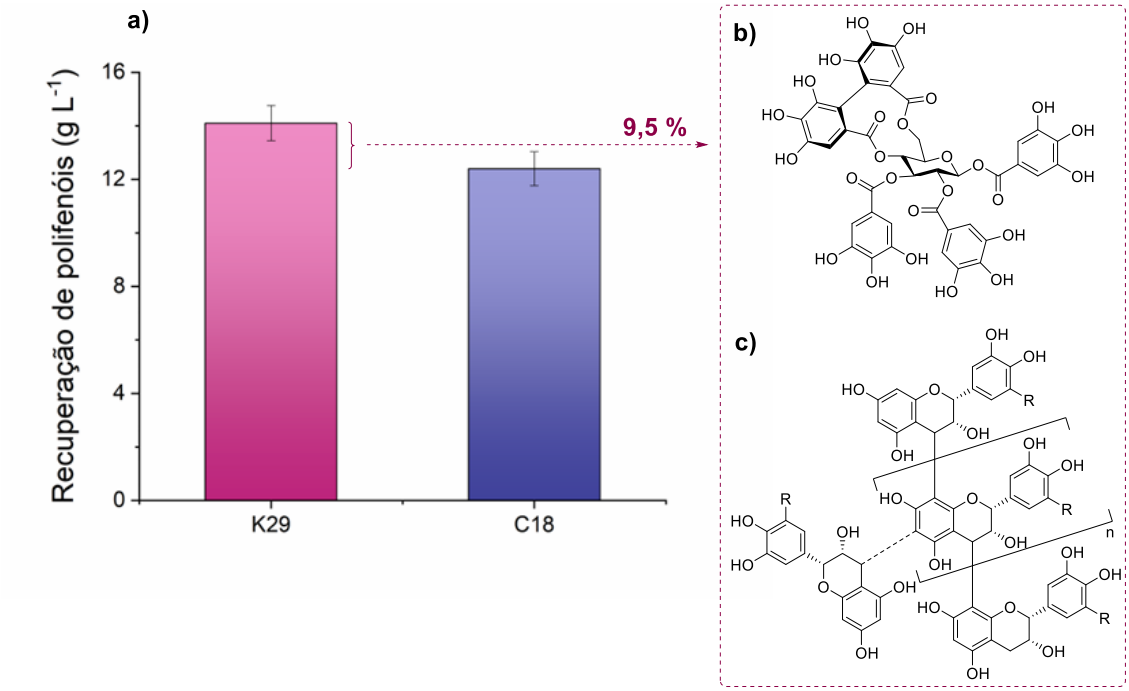
FIGURA 22 - RECUPERAÇÃO MÉDIA DE AÇÚCARES (g L^{-1}) PARA AS COLUNAS K29 E C18 NAS FRAÇÕES AQUOSAS.



Por outro lado, as colunas de polidivinilbenzeno (K29) possuem aplicações mais robustas e já são empregadas industrialmente, como indicado por Padilha et al. (2019), que estudaram o uso de colunas de Amberlite-XAD (estireno-divinilbenzeno) como biossorvente de compostos fenólicos para fabricar produtos de valor agregado a partir de materiais lignocelulósicos. Quando se avalia a capacidade de recuperação dos polifenóis adsorvidos nas colunas, é verificado que uma maior quantidade de polifenóis foi recuperada a partir da coluna K29 (82%, 14,1 g L^{-1}) em comparação com a coluna C18 (72,5%, 12,4 g L^{-1}) (FIGURA 23).

Esses dados corroboram com o que foi observado com as isotermas (FIGURA 20), em que é possível visualizar que todos os polifenóis adsorvidos pelas fases estacionárias foram recuperados nas frações etanoica e aquosa de cada coluna. Ademais, observa-se que houve uma recuperação 9,5% maior de polifenóis na coluna K29 em relação à coluna C18 (FIGURA 23a).

FIGURA 23 – a) RECUPERAÇÃO DE POLIFENÓIS (g L^{-1}) PARA AS COLUNAS K29 E C18 NAS FRAÇÕES ETANOICAS, b) TANINO HIDROLISÁVEL E c) TANINO CONDENSÁVEL.



Muitos fatores estão envolvidos nas interações entre as fases estacionárias e os materiais a serem separados, como o tamanho das partículas e características das moléculas (HOU; ZHANG, 2021). Foi observado que quando separamos os extratos de *C. citriodora*, é maior presença de taninos hidrolisáveis foi maior (FIGURA 23b) (que já haviam sido detectados através da pirólise dos extratos, APÊNDICE II.6), e uma menor quantidade de taninos condensados (FIGURA 10, FIGURA 23c). Adicionalmente, a maior quantidade de polifenóis para os extratos separados na K29 (F.E.K) foi relacionada à maior quantidade de taninos nessas frações.

Especificamente, os taninos podem ficar retidos em colunas de sílica, como foi observado neste estudo, devido ao tamanho molecular (SIMOES-CARDOSO et al., 2019). Os taninos são moléculas grandes, poliméricas e geralmente hidrofílicas, e por isso têm baixa afinidade com a fase estacionária de uma coluna (VERA et al., 2023).

Nesse sentido, parece mais promissor o uso das colunas poliméricas, visando a utilização dos taninos para outras aplicações, aliado aos custos relacionados a cada material (APÊNDICE III.11). Além disso, a fase estacionária K29 tem a possibilidade de ser reutilizada sem perder eficiência, diferentemente

da coluna C18 (APÊNDICE III.10), o que a torna mais sustentável e com melhor custo-benefício a longo prazo.

III.3.3 Pirólise simultânea e trimetilsililação em conjunto com cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

O SPyT-GC-MS das frações etanoicas exibe compostos produzidos por pirólise semelhantes com alta distribuição de 1,2,3-trihidroxibenzeno, 1,2,5-trihidroxibenzeno, 4 - (hidroxivinil) - 1,2 - dihidroxibenzeno (cis) e (trans), 4 - (hidroxivinil) - 1,2,3 - dihidroxibenzeno (cis) e (trans) e ácido gálico, este último foi o principal composto produzido por pirólise (APÊNDICE III.12). A alta abundância de ácido gálico pode refletir o ácido gálico presente nos extratos e separado nas colunas, mas o mais provável é que ele ocorra em alta abundância devido a ser o produto da pirólise de taninos hidrolisáveis (MATTONAI; RIBECHINI, 2018; MEDEIROS; SIMONEIT, 2007; NIEROP et al., 2005).

A análise (SPyT-GC-MS) foi conduzida apenas para as frações etanoicas para investigar a presença dos taninos, já que os açúcares foram caracterizados por GC-MS. Os dados ajudam a compreender a maior recuperação de polifenóis pela coluna polimérica (K29), que foi 9,5% maior em relação às colunas de sílica (C18) (FIGURA 23). Os taninos hidrolisáveis foram formados por meio de condensação/polimerização ao longo das extrações sequenciais realizadas até a 7° etapa, (alta quantidade do produto de pirólise ácido gálico), ocorrendo também uma menor quantidade de tanino condensado devido à presença de 1,3,5-trihidroxibenzeno de um produto de pirólise do anel de catequinas e 1,2,3-trihidroxibenzeno de um anel da estrutura da galocatequina (NIEROP et al., 2005) (CAPÍTULO II, APÊNDICE II.6).

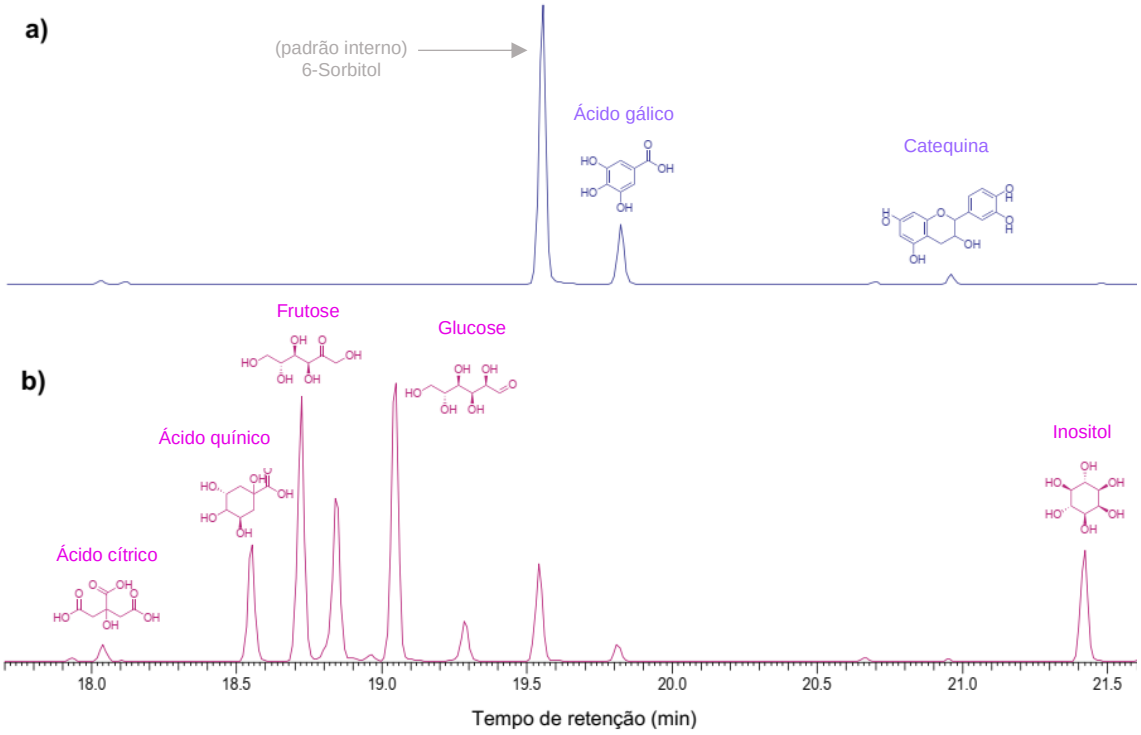
A presença de taninos em altas concentrações após as extrações sequenciais é um importante parâmetro para elucidar aplicações às frações etanoicas dos extratos. Essas biomoléculas possuem anéis fenólicos altamente reativos devido ao número e ao grau de polimerização de seus grupos hidroxila. Essas características estão associadas aos benefícios à saúde, tais como potencial anti-inflamatório, antienvelhecimento e antiproliferativos. Os taninos também podem reduzir o risco de câncer e doenças neurodegenerativas, como doenças cardiovasculares e Alzheimer, respectivamente (MELO et al., 2023).

Além disso, os taninos podem ser utilizados como alimentos nutracêuticos ou em materiais de embalagens e possuem ampla gama de aplicações industriais, como o fornecimento de durabilidade ao couro, propriedades anticorrosivas para metais e substratos para impressão 3D e na fabricação de espumas (VERA et al., 2023).

III.3.4 Cromatografia a gás com espectrometria de massas

A caracterização das frações separadas nas colunas C18 e K29 foi avaliada por análise GC-MS. As frações etanoicas F.E.C e F.E.K indicaram a presença de ácido gálico, resquícios de óleos essenciais, ácidos orgânicos e fenólicos de cadeia curta (catequina e epigalocatequina) (FIGURA 24a). Como foi analisado no item anterior (III.3.3), as frações etanoicas apresentaram majoritariamente compostos como taninos (hidrolisados e condensados). Foi possível verificar a presença de pequenas quantidades de ácido gálico nas frações aquosas. Isso indica que as colunas não são 100% eficientes nessa separação. As frações aquosas F.A.C e F.A.K provenientes do extrato de *C. citriodora* da sétima extração sequencial indicaram a presença de açúcares (frutose, glucose e sacarose), ciclitol (mio-inositol e ácido quínico) e ácidos orgânicos tal como o ácido cítrico (FIGURA 24b).

FIGURA 24 - CROMATOGRAMAS DAS FRAÇÕES a) ETANOICA E b) AQUOSA PROVENIENTES DOS EXTRATO DE *C. citriodora* SEPARADOS A PARTIR DE COLUNAS POLIMÉRICA (K29) E DE SÍLICA (C18).



A composição das frações pode indicar potenciais aplicações dessas frações, como já mencionado para os taninos presentes nesse extrato. Na fração etanoica, a maior concentração de ácido gálico é um indicativo de que essa fração possui alto poder antioxidante, com aplicações em diversos fármacos e na produção de reagentes/padrões laboratoriais (GUO et al., 2021). A catequina, presente em baixa quantidade nas frações, é um potencial fenólico a ser explorado devido ao seu alto valor comercial, pois possui propriedades farmacológicas e pode ser utilizado como um anti-inflamatório eficaz em cosméticos (DEL OLMO et al., 2021).

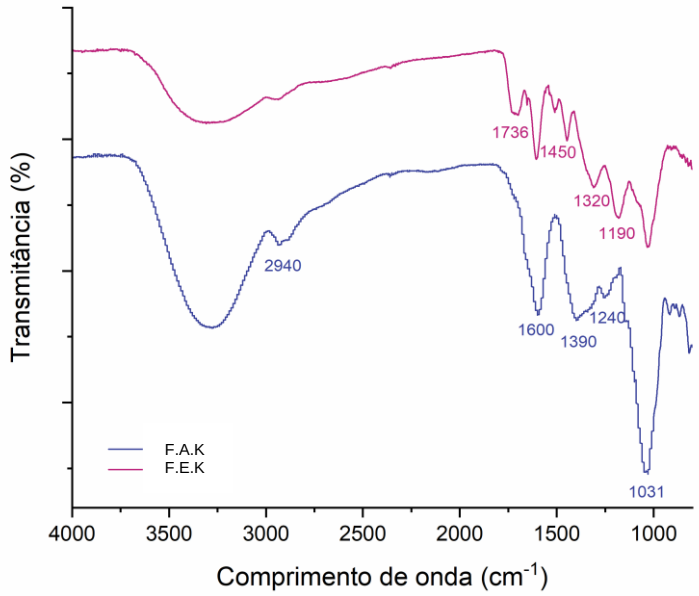
Já as frações aquosas são constituídas majoritariamente por açúcares, que possuem potencial aplicação para produção de ácido lático a partir de processos fermentativos (KOMESU et al., 2017; KUMAR et al., 2019), embora existam compostos atrelados a esses açúcares no extrato que podem ser potenciais inibidores da fermentação (KUMAR et al., 2020). Por outro lado, o ácido quínico e o ácido cítrico podem ser utilizados como mediadores em reações de síntese (MAYCOCK et al., 1992; SHABAN et al., 2022).

Por fim, a presença de inositol nas frações aquosas é promissora, pois destaca potencial em aplicações farmacológicas para esta fração, uma vez que o Inositol possui conhecidas propriedades de regulação hormonal (STRINGARO et al., 2023) e apresentou aumento das atividades cerebrais em testes *in vitro*, se tornando alvo de estudos como um potencial tratamento contra a doença de Alzheimer (LIANG et al., 2012).

III.3.5 Caracterização química e térmica das frações

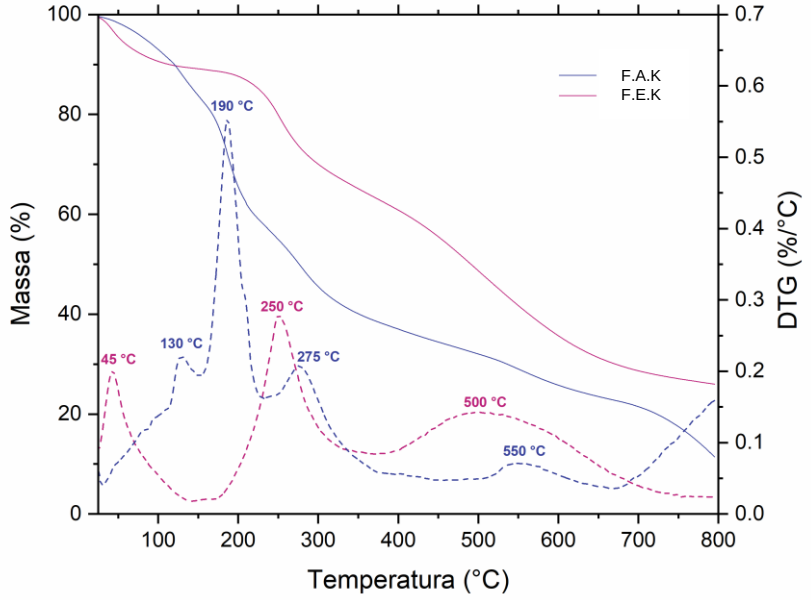
As frações separadas a partir das colunas K29 mostraram-se eficientes na separação de açúcares e polifenóis e as análises de ATR-IR ajudaram a corroborar essa conclusão (FIGURA 25). Em F.A.7.P, as bandas em 1736 cm^{-1} (estiramento C=O), 1450 cm^{-1} (curvatura C-H em alcanos), 1320 cm^{-1} (estiramento -C=O em carboidratos) e 1190 cm^{-1} (vibrações nas ligações C-OH) foram atribuídas às ligações presentes principalmente nos monossacarídeos desta fração, açúcar álcool (Inositol) e ácido quínico (BODÎRLĂU, 2009; SALIM et al., 2021). Já as bandas em 1600 cm^{-1} (estiramento C=C em alcenos), 1390 cm^{-1} (ligações CH e CH_2) e 1240 cm^{-1} (estiramento em C-O) foram atribuídas aos polifenóis desta fração (PAVIA et al., 2001; SILVERSTEIN et al., 2006).

FIGURA 25 – ESPECTROS FTIR DAS FRAÇÕES AQUOSA (F.A.7.P) E ETANOICA (F.E.7.P).



O comportamento de degradação térmica (FIGURA 26) foi distinto para as frações contendo açúcares e polifenóis, o que corrobora com o que foi explorado no Capítulo II, onde as degradações iniciais foram atribuídas aos açúcares e as finais foram relacionadas aos taninos. Em F.A.K ocorreram picos de degradação térmica em 130 °C, referente à fusão da frutose e 190 °C referente à degradação absoluta da sacarose (VERMA et al., 2020). O pico de degradação térmica em 275 °C pode ser relacionado à degradação de açúcares álcoois presentes nessa fração, e em 550 °C pode estar ocorrendo a decomposição dos compostos fenólicos e ácidos orgânicos que ficaram aderidos à fração aquosa do extrato.

FIGURA 26 – TERMOGRAMAS DE MASSA E dTG DAS FRAÇÕES AQUOSA (F.A.K) E ETANOICA (F.E.K).



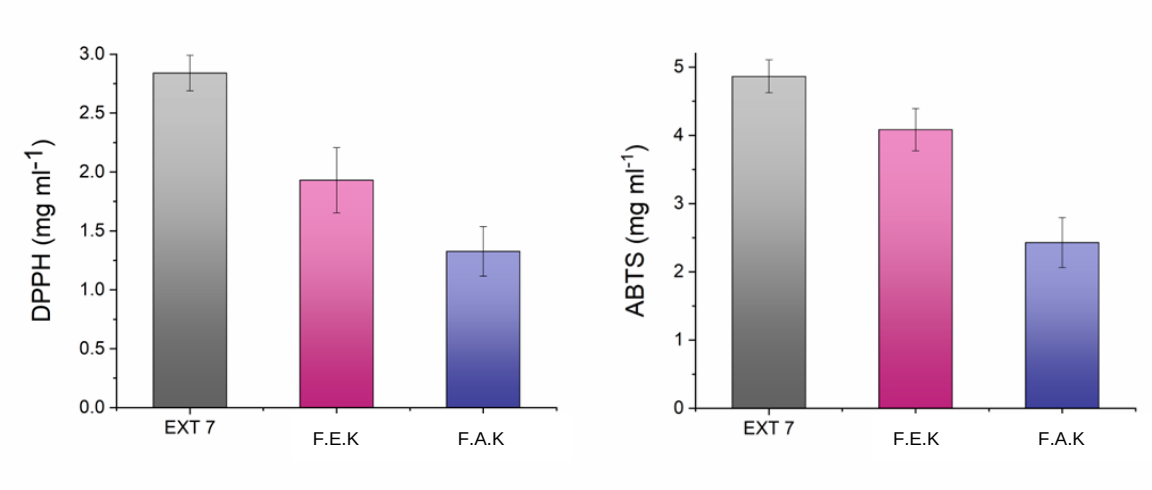
Em contraste, a F.E.K teve um pico de degradação térmica em 45 °C, que pode estar associada aos compostos fenólicos mais sensíveis à temperatura como alguns flavonoides, tais como a antocianina (GRANATO et al., 2016). O segundo evento térmico que ocorreu na F.E.K foi em 250 °C, onde ocorre a degradação total do ácido gálico (DORNIANI et al., 2012) e o último evento térmico ocorrido em 500 °C pode estar relacionado à degradação dos taninos, que foram detectados nas análises de pirólise acoplada ao cromatógrafo a gás

(SpyT-GC-MS, item III.3.3). A partir das análises térmicas foi possível destacar um perfil de degradação referente majoritariamente aos açúcares e aos polifenóis, que não pôde ser visualizado no TGA dos extratos brutos (Capítulo II, FIGURA 15), em que os picos de degradação final nos termogramas podem ser relacionados aos taninos.

III.3.6 Capacidade antioxidante das frações

As análises de atividade antioxidante indicaram que a atividade antioxidante da F.A.K é menor em comparação com o extrato 7 (FIGURA 27). A redução do radical livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) equivalente em Trolox ocorre devido à transferência de átomos de hidrogênio. Essa reação ocorre quando um composto antioxidante doa um átomo de hidrogênio para o radical livre DPPH, convertendo-o em um composto estável não reativo (APAK et al., 2016) e é um indicativo do quanto um extrato é capaz de neutralizar radicais livres danosos às células. Para esse radical livre (DPPH), foi mensurada uma atividade antioxidante 2,8 mg ml^{-1} no extrato da *C. citriodora*, enquanto às frações apresentaram capacidade antioxidante de 1,9 mg ml^{-1} (F.E.K) e 1,3 mg ml^{-1} (F.A.K), indicando que a fração com maior concentração de polifenóis é mais eficiente em neutralizar os radicais livres. Polifenóis são conhecidos como compostos antioxidantes (GRANATO et al., 2016).

FIGURA 27 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FRAÇÕES FRENTE AOS RADICAIS LIVRES DPPH E ABTS.



A atividade antioxidante frente à capacidade de captura dos radicais livres do ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) foi maior para o extrato 7 antes de fracionado (4,7 mg ml^{-1}) em relação à F.E.K (4,1 mg ml^{-1}) e em relação à F.E.K (2,4 mg ml^{-1}). ABTS é um composto que é oxidado pelo radical ABTS+ para formar um cátion radical ABTS+•, que é então reduzido por um agente redutor, como um antioxidante, para formar ABTS e o agente redutor oxidado). Da mesma maneira que o DPPH, o ABTS é um indicativo de quanto o extrato é capaz de neutralizar radicais livres e, nesse sentido, a fração contendo maior concentração de polifenóis (F.E.K) teve maior capacidade antioxidante que a fração rica em açúcares (F.A.K), isso porque os grupos hidroxila dos polifenóis agem como redutor de radicais livres (COSME et al., 2020), embora a fração aquosa tenha apresentado capacidade de reduzir radicais livres também, isso em grande parte devido ao ácido cítrico (SHABAN et al., 2022) e ao Inositol (STRINGARO et al., 2023), possibilitando que ambas frações tenham potencial para aplicações farmacológicas.

III.4 CONCLUSÕES

Este capítulo investigou a separação de compostos de natureza fenólica dos açúcares por meio do uso de colunas de sílica (C18) e polimérica (K29) para os extratos com maior concentração de compostos (extrato 7). A coluna de sílica foi mais eficiente na recuperação de açúcares (99%, 4,9 g L^{-1} de açúcares totais) do que para os polifenóis (72,5%, 12,4 g L^{-1} de polifenóis). Por outro lado, a coluna polimérica foi mais eficiente para recuperar polifenóis (82%, 14,1 g L^{-1} de polifenóis) em comparação com a recuperação de açúcares (71%, 7,1 g L^{-1}).

Embora a recuperação de açúcares seja maior para a coluna de sílica, as colunas poliméricas são mais vantajosas em termos de custo e uso escalonável para a indústria. Além disso, foi observado que utilizando colunas com a fase estacionária polimérica, recupera-se maior quantidade de taninos hidrolisáveis, que são compostos com alto poder antioxidante.

A separação dos compostos foi confirmada por meio de análises de CG-EM e as análises de pirólise (SpyT-GC-MS) indicaram a presença de maior quantidade de ácido gálico, que é produto da pirólise dos taninos hidrolisáveis nos extratos etanoicos ricos em polifenóis obtidos utilizando colunas contendo a

fase estacionária polimérica. Ácido gálico em sua forma livre e catecol também estão presentes na fase etanoica obtida dos extratos. Por outro lado, as frações aquosas possuem predominantemente açúcares, mas também foi observada a presença de Inositol, ácido quínico e ácido cítrico.

A atividade antioxidante da fração com maior concentração de polifenóis (F.E.K) foi maior em comparação com as frações contendo açúcares, devido ao conhecido poder antioxidante dos polifenóis. Nesse contexto, baseado em uma plataforma de biorrefinaria para as indústrias de óleo essencial, foi possível ratificar o potencial dos extratos após a separação por colunas, colaborando para um direcionamento de aplicação industrial de acordo com seus constituintes alvos, açucares ou polifenóis.

CAPÍTULO IV

PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE HIDRODESTILAÇÃO DAS FOLHAS DE *C. citriodora*

IV.1 INTRODUÇÃO

O ácido lático (ácido 2-hidroxipropanóico, CH3–CH(OH)–COOH) é um ácido orgânico amplamente utilizado industrialmente devido às suas propriedades multifuncionais (KOMESU et al., 2017). Esse produto possui uma longa história de uso nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, para a produção de químicos, reguladores de crescimento vegetal e intermediários químicos especiais (ABDEL-RAHMAN et al., 2011).

Uma das aplicações mais ampla do ácido lático é na indústria de polímeros, como uma alternativa mais sustentável para manufatura de produtos à base de petroquímicos, onde é polimerizado em ácido polilático (PLA). O PLA pode ser utilizado em suturas cirúrgicas, implantes ortopédicos, sistemas de administração de medicamentos e produtos de consumo descartáveis (MASUTANI; KIMURA, 2014; SINGHVI; GOKHALE, 2013).

O ácido láctico pode ser produzido via síntese química ou por fermentação microbiana. A fermentação microbiana do ácido lático oferece uma vantagem em termos de utilização de biomassa renovável de carboidratos, baixa temperatura de produção e baixo consumo de energia (ZHANG et al., 2019). A maior parte do ácido lático produzido globalmente é fabricado por rotas de fermentação, a partir de bactérias das espécies de *Lactobacillus* ssp. e *Streptococcus* spp. (FUKUSHIMA et al., 2004).

A demanda por ácido lático aumentou consideravelmente devido a sua ampla gama de aplicações; no entanto, o alto custo das matérias-primas, como amido e açúcares refinados, que representam a maior parcela do custo de produção, representa um dos mais sérios obstáculos para a produção fermentativa de ácido láctico competir com a síntese química (HU et al., 2016). Matérias-primas baratas são essenciais para a viabilidade da produção do ácido lático e a biomassa lignocelulósica é uma alternativa barata e renovável para a fermentação em larga escala do ácido lático devido à sua abundância, baixo preço, alto teor de polissacarídeos a (SINGHVI; GOKHALE, 2013).

A indústria de hidrodestilação de óleos essenciais proveniente de folhas de *C. citriodora* produz grande quantidade de subprodutos que podem ser utilizados para produção de ácido lático, esses subprodutos correspondem a aproximadamente 98% da planta extraída (BOSO et al., 2022). A alta

concentração de açúcares presente nesse subproduto o torna uma potencial matéria-prima para produção de ácido lático. Nesse sentido, este capítulo visa a produção de ácido lático utilizando o extrato aquoso do processo de hidrodestilação de folhas da *C. citriodora*, a fim de se produzir polímeros.

IV.2 MATERIAL E MÉTODOS

IV.2.1 Matéria prima

Folhas de *C. citriodora* com umidade de 55% foram utilizadas neste estudo, provenientes de plantio experimental da Embrapa Florestas, localizada em Colombo-PR, Brasil (25,3217° S, 49,1596° W). As folhas foram coletadas de forma aleatória a partir de 50 árvores com um ano de idade, durante os meses de dezembro a fevereiro. A região de colheita possui predominância de clima tropical, com temperaturas variando entre 20 e 30°C.

IV.2.2 Extrações sequenciais

Extrações sequenciais foram realizadas utilizando-se 100 g de folhas de *C. citriodora*, as quais foram submetidas a hidrodestilação por arraste a vapor em um extrator do tipo Clevenger durante 4 h na temperatura de ebulição da água (100°C). A proporção de folhas para água destilada foi de 1:10 m/v. O extrato aquoso contendo os compostos solúveis em água quente foi coletado e utilizado em uma nova extração com folhas frescas. Foram realizadas 7 extrações com reaproveitamento de extrato aquoso, onde o volume do extrato foi ajustado com água deionizada para manter a proporção 1:10 entre folhas e água. O extrato final obtido na 7° extração foi utilizado para produção do ácido lático.

IV.2.3 Purificação do extrato aquoso

O extrato aquoso (40 mL) proveniente de sete extrações sequenciais foi carregado em coluna de polidivinilbenzeno (2,5 x 20 cm) (K29, Filadélfia, PA, EUA). A fase estacionária foi lavada com 200 mL de água ultrapura, a fim de

remover os monossacarídeos, numa vazão de 0,1 mL min^{-1}. Na fase estacionária ficaram adsorvidos os compostos de natureza fenólica, os quais foram dessorvidos utilizando-se 100 mL de álcool etílico 99%, para posterior reutilização da resina K29. Por fim, a fração aquosa (F.A.K) purificada do extrato foi concentrada utilizando um evaporador rotativo (60 °C, 100 rpm).

IV.2.4 Fermentação dos açúcares

IV.2.4.1 Fermentação

A fermentação foi realizada em um frasco de 100 mL, onde 20 mL de células imobilizadas de *Lactobacillus bulgaricus* (YF-L812, Chr. Hansen, Dinamarca) foram acondicionadas nele e agitados em equipamento do tipo shaker (100 rpm). A fração aquosa do extrato aquoso (F.A.K) contendo majoritariamente açúcares, concentrada em evaporador rotativo (50 g L^{-1}) foi usada como fonte de carbono, ao invés de glicose pura, para a produção de ácido lático, de acordo com método proposto por Shen; Xia (2006). A fermentação foi mantida a pH 4,5 e 50°C até concentração constante, alíquotas foram periodicamente amostradas (8, 24 e 72 h) para quantificação.

IV.2.4.2 Quantificação do ácido lático

Em 20 μL do fermentado retirado a cada tempo pré-determinado, 30 μL de ^{13}C-sorbitol (0,2 μg μL^{-1}) foram adicionados para a avaliação para avaliação do teor de ácido lático obtido, essa solução foi seca sob vácuo (8 h, 30 °C), depois metoxilada (20 mg mL^{-1} de cloridrato de metoxiamina em piridina, 50 μL, 90 min, 40 °C) e sililanizada (MSTFA, 50 μL, 90 min, 40°C). A fração contendo os compostos hidrofílicos foi analisada por cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massa de íons de armadilha no modo split (1:25). Os compostos foram separados com uma coluna DB-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) com temperatura do injetor a 230 °C, linha de transferência a 250 °C, com hélio a 1,5 mL min^{-1} como gás carreador. O forno do CG foi ajustado a 70 °C, 1 min de isoterma, aquecendo a 320 °C a uma taxa de 8 °C min^{-1}, com isoterma final de 5 min. O espectrômetro de massa foi operado em modo positivo com

ionização por impacto de elétrons a 70 eV e temperatura da fonte de íons a 200 °C.

IV.2.5 Produção de lactida

IV.2.5.1 Síntese

A síntese da lactida foi conduzida em dois experimentos usando 100 g de ácido lático comercial (85 %, Sigma Aldrich) para explorar o ambiente de reação ideal. Uma dispersão de nanopartículas de óxido de zinco (120 nm, 30% w/w) foi empregada como catalisador (1,0 w/w). O grupo controle foi conduzido na ausência de catalisador. Todas as reações foram realizadas em duplicata. Para cada conjunto, ácido lático e catalisador foram misturados sob agitação magnética em um balão de fundo redondo (500 mL) a 80 °C e 60 kPa para remover o conteúdo de água. Após 2 h, a temperatura foi lentamente ajustada para 150 °C e mantida constantemente por 3 h para produzir o oligômero PLA. A pressão foi reduzida passo a passo neste processo para 10 kPa. Por fim, lactida foi produzida por despolimerização, que foi realizada a 170 °C e 10 kPa por 30 min e depois continuou a 220 °C, 3 kPa, por 2,5 h para permitir o isolamento simultâneo da lactida do sistema de reação por destilação até não sair mais produto (HU et al., 2017). Após a parametrização da produção de lactida a partir de ácido lático convencional, 20 g do material fermentado de F.A.7.P foi submetido a mesma síntese.

IV.2.5.2 Purificação

Lactida bruta foi dissolvida em acetato de etila (1:1,5 p/v) por agitação a 85 °C por 10 min. A solução quente foi filtrada para remover as impurezas não dissolvidas e o filtrado foi resfriado até a temperatura ambiente antes do armazenamento a 4 °C, para recristalização. A lactida recristalizada foi então isolada do acetato de etila por filtração com vácuo e posteriormente seca a 40 °C por 12 h e seu rendimento foi quantificado (HU et al., 2017).

IV.2.6 Espectroscopia no infravermelho médio

Espectroscopia no infravermelho médio por reflectância total atenuada (ATR-IR) foi realizada a fim de investigar os principais grupos funcionais existentes em cada amostra. Para isso, foram utilizadas 10 mg de amostra seca à vácuo por 24 h a 30 °C, as quais foram depositadas sobre cristal de ZnSe para aquisição dos espectros. Um espectrofotômetro modelo Nicolet iS50 da Thermo Scientific foi configurado para a realização de 64 varreduras, resolução 2 cm^{-1} e leituras entre 4000 e 600 cm^{-1}, no modo transmitância.

IV.2.8 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) foi utilizada como ferramenta de apoio na caracterização dos produtos, para analisar a estabilidade térmica e inferir sobre a presença dos compostos. As curvas termogravimétricas (TG) e as derivadas (dTG) foram obtidas utilizando-se um equipamento Q600 (TA Instruments). A atmosfera empregada foi de nitrogênio (N_2) com fluxo de gás de 50 mL min^{-1}, intervalo de temperatura entre 25 e 800 °C, e taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1}.

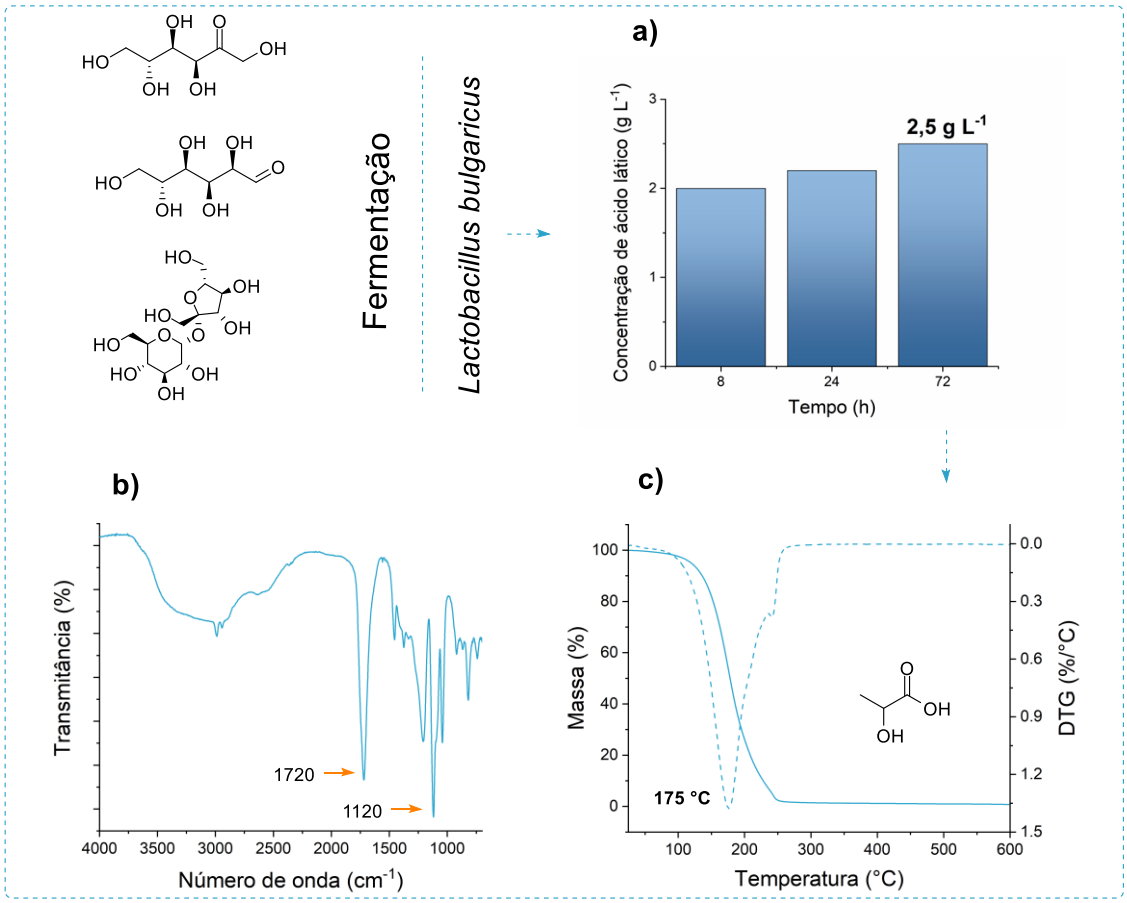
IV.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.3.1 Fermentação dos açúcares

O extrato aquoso é uma promissora matéria-prima para produção de ácido lático de forma limpa e a partir de um subproduto de indústrias de hidrodestilação de óleos essenciais. O rendimento de ácido lático depois de período de 72 h de fermentação em temperatura e ambiente apropriados foi de 2,5 g L^{-1}. Os espectros de FTIR (FIGURA 28b) e os termogramas (TG) (FIGURA 28c) confirmam a presença do ácido lático. Em 8h de tempo de fermentação foram obtidos 2 g L^{-1} de ácido lático.

FIGURA 28 – ILUSTRAÇÃO DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO VIA FERMENTAÇÃO BACTERIANA A PARTIR DE SOLUÇÃO CONCENTRADA DE AÇÚCARES DO EXTRATO DA *C. citriodora* a) RENDIMENTO DE ÁCIDO LÁTICO EM FUNÇÃO DO

TEMPO DE FERMENTAÇÃO b) ESPECTRO FTIR DO ÁCIDO LÁTICO PRODUZIDO (72h) E c) PERFIL DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DO PRODUTO (72h).



O rendimento produtivo do ácido lático em relação a quantidade de açúcares presentes na fração aquosa (F.A.K), 4,9 g L^{-1} (frutose, glucose e sacarose) foi de 51 %. Assim, o subproduto da hidrodestilação foi promissor na aplicação de sistemas biotecnológicos de produção do ácido lático, visando a implantação de sistemas integrados de reaproveitamento de resíduos, embora estudos mais detalhados sejam requeridos sobre o tipo de biomassa empregada (TSAPEKOS et al., 2020), as formas de conversão dos açúcares em ácido lático (FUKUSHIMA et al., 2004), quais compostos são tóxicos às bactérias responsáveis pela fermentação (ABDEL-RAHMAN et al., 2011; STANFORD et al., 2018) e os custos do processo.

Estudos realizados por Shen; Xia (2006), indicam que a cinética de conversão dos açúcares pode ter influência da espécie de micro-organismo utilizada e do tempo de fermentação. O estudo realizado pelos autores indicou que em 54h houve a conversão máxima de glucose em ácido lático. Além disso,

existem outros fatores que também influenciam negativamente no rendimento produtivo do ácido lático, a presença de polifenóis (MIERA et al., 2022) no meio reacional e alguns ácidos orgânicos podem diminuir o rendimento dos processos fermentativos (ABDEL-RAHMAN et al., 2011; QIN et al., 2016; MIERA et al., 2022; STANFORD et al., 2018).

De acordo com os resultados obtidos anteriormente (Capílulo III, item III.3.4), a fração aquosa que foi utilizada na fermentação com *L. bulgaricus* possui solubilizado juntamente com os açúcares compostos da classe dos ciclitóis (inositol e ácido quínico) e ácido cítrico e ácido gálico, esse último como um resquício que não foi efetivamente separado pela coluna K29. Esses compostos podem alterar o pH do meio reacional e reduzir a conversão dos açúcares em ácido lático (WANG et al., 2015). Nessa pesquisa, foi verificado que ocorreu alteração do pH inicial (4,5) para o pH no último estágio de fermentação (72h, 5,2).

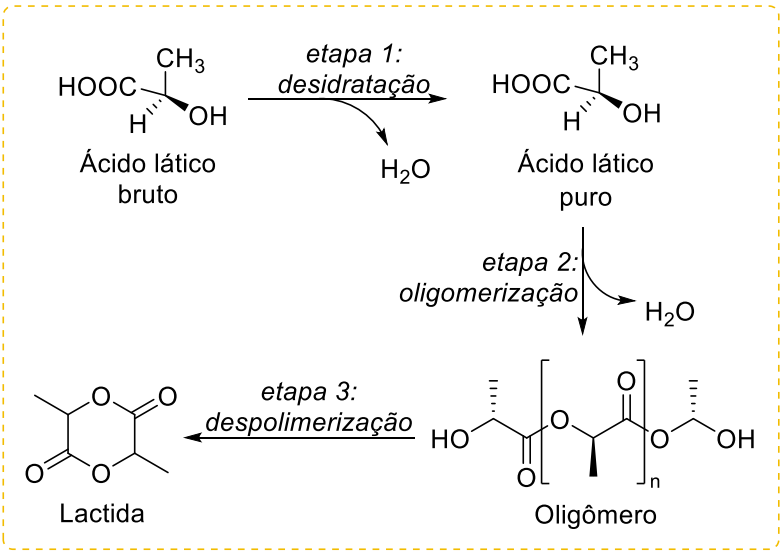
O uso de subprodutos industriais apresenta-se como um substrato viável para a produção de ácido lático. No entanto, Nwamba et al. (2021) afirmam que existem vários desafios decorrentes da complexidade dos açúcares poliméricos para utilização de materiais lignocelulósicos, pois é necessário o uso de técnicas de purificação que retirem principalmente os compostos na natureza fenólica, pois são conhecidos por serem antibacterianos e por isso inibem o crescimento o processo de fermentação (STANFORD et al., 2018). Além disso, ainda não são completamente conhecidas as rotas de conversão dos açúcares em ácido lático, podendo ocorrer distinções para cada molécula (NAGARAJAN et al., 2022).

Por essas razões, em estudos futuros propõe-se o monitoramento do teor dos açúcares ao longo do processo fermentativo para que seja possível influir quais açúcares presentes no extrato da *C. citriodora* são mais promissores nos processos fermentativos. A construção de conhecimento acerca da utilização dos subprodutos da hidrodestilação é imprescindível no estabelecimento de abordagens inovadoras de sustentabilidade para a bioeconomia circular, devido ao volume de produção e ao tamanho deste setor industrial (BOSO et al. 2022; RAO et al. 2016).

IV.3.2 Síntese da lactida

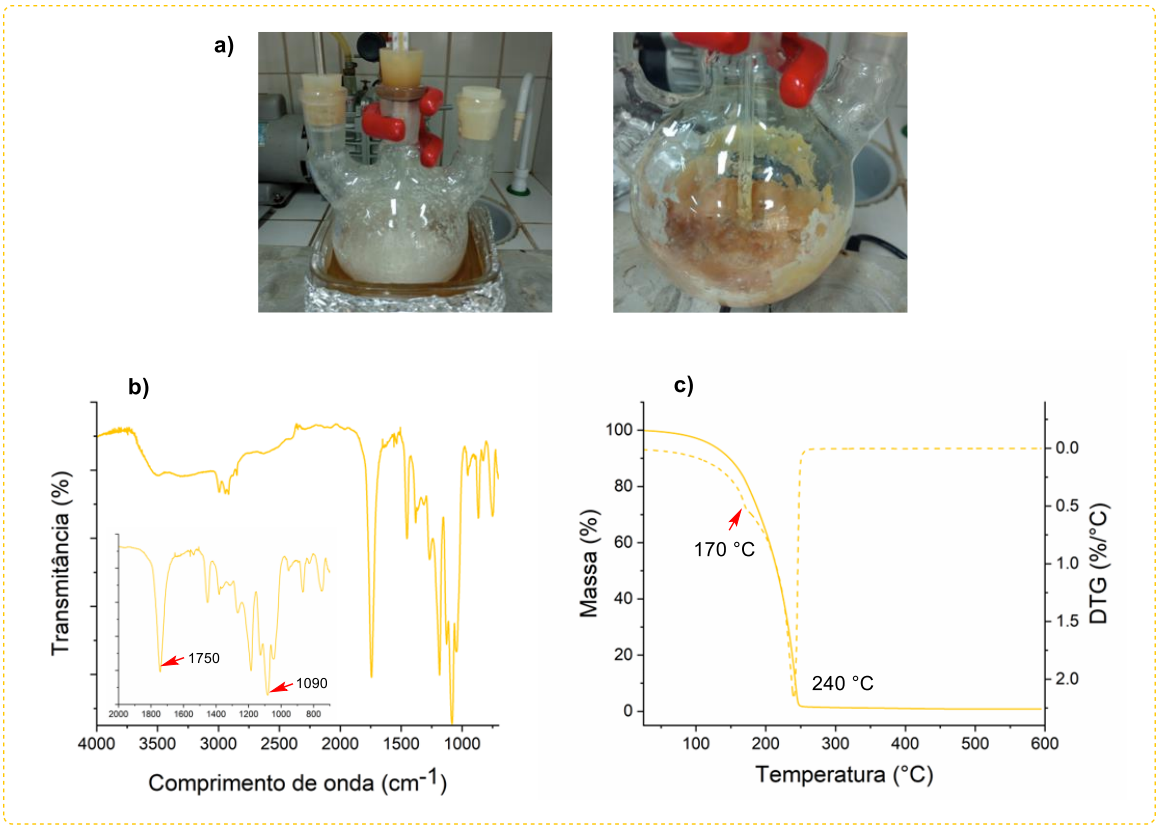
A produção da lactida, etapa intermediária para produção do ácido poli (lático) foi avaliada inicialmente para o ácido lático comercial. O rendimento foi de 34,7 % de produto da síntese em relação à massa seca do precursor. As etapas de síntese ocorreram conforme metodologia adaptada de HU et al. (2017), em que o ácido lático é desidratado e posteriormente a oligomerização ocorre como etapa intermediária da produção da lactida (FIGURA 29). Ao avaliarmos o rendimento da síntese realizada a partir do ácido lático produzido, utilizando subprodutos da indústria de hidrodestilação de óleos essenciais, foi estimado um rendimento de 0,62 g L^{-1} de produto de síntese por litro de extrato inicial (FIGURA 30).

FIGURA 29 – ETAPAS DA SÍNTESE DO ÁCIDO LÁTICO EM LACTIDA.



Fonte: Adaptado de Hu et al. (2017).

FIGURA 30 – a) REAÇÃO DE SÍNTESE DA LACTIDA; b) ESPECTRO FTIR DO PRODUTO DA SÍNTESE E c) TERMOGRAMA DO PRODUTO DA SÍNTESE.



Analisando o espectro de FTIR (FIGURA 30b) e o termograma (FIGURA 30c) do produto formado na síntese, é possível influir que ocorreu produção de poli (D,L lactida), que é o polímero intermediário na formação da lactida, esses resultados corroboram com a literatura acerca deste material (CHUENSANGJUN et al., 2019; NIKOLIC et al., 2010). A banda em 1750 cm^{-1}, que indica vibrações C=O em anéis de lactatos e a banda em 1190 cm^{-1} que confirma as ligações C-O-C em anéis de lactatos são indícios da formação deste polímero intermediário (FIGURA 30a). Na análise termogravimétrica (FIGURA 30b), foi observado um ombro de degradação em 170 °C, que não é observado em lactida pura e pode auxiliar na identificação do polímero formado (CHUENSANGJUN et al., 2019). A partir do ácido lático oriundo dos extratos da hidrodestilação da *C. citriodora*, foi possível produzir poli (D,L lactida) com rendimentos em torno de 0,62 g L^{-1}.

Os resultados indicam que é promissor o uso de subprodutos da hidrodestilação de óleos essenciais em produtos de maior valor comercial, como a produção de ácido lático, que é matéria prima da fabricação de diversos fármacos (KOMESU et al., 2017), ou para futuras aplicações como um polímero

biodegradável (DECHY-CABARET et al., 2004; HONG et al., 2012), isso porque as quantidades de resíduos gerados por essas indústrias são alarmantes. As quantidades de subprodutos chegam a 98% (BOSO et al., 2022), e poderiam ser maiores se utilizadas plantas com menor rendimento de óleo essencial.

IV.4 CONCLUSÕES

Neste capítulo, foi avaliada produção de ácido lático a partir de subprodutos da indústria de hidrodestilação das folhas de *C. citriodora*. Os testes iniciais indicaram que foi possível obter 2,5 g L^{-1} de ácido lático a partir da fração contendo açúcares do extrato. Ao avaliar o rendimento do ácido lático em relação à massa seca de açúcares do extrato, foi observado rendimento de 51%. Isso indica que 49% de açúcares não foram convertidos em ácido lático. Um estudo com maiores tempos poderia ser conduzido para obtenção de conversão total dos açúcares em ácido lático.

Uma das aplicações biotecnológicas mais interessantes do ácido lático é na produção de ácido poli (lático), para isso um experimento foi conduzido na busca de sintetizar o ácido lático em um precursor do PLA, a lactida. Para tal, foi obtido um rendimento de 34,7% de produto da síntese que, de acordo com análises de FTIR e TGA, é um polímero intermediário na formação da lactida, a poli (D,L lactida). Para o subproduto da hidrodestilação o rendimento foi estimado em aproximadamente de 0,62 g L^{-1}. O estudo mostrou que esse subproduto é uma importante fonte de açúcares que poderão ser utilizados futuramente na produção de polímeros biodegradáveis.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das extrações sequenciais foi possível concentrar os sólidos no extrato aquoso de *C. citriodora* proveniente da hidrodestilação por arraste a vapor de óleos essenciais em até sete vezes sem redução no teor de óleo essencial e em sua qualidade. A composição majoritária destes extratos é de compostos da classe aromática, fenólica e açúcares. Foi observado que o tempo de extração na temperatura de ebulição foi um fator que influenciou na decomposição dos compostos presentes no extrato. O aumento do tempo em que os compostos permaneceram sob aquecimento (100 °C) promoveu o aparecimento de precipitados, que foram relacionados a uma mistura de taninos hidrolisáveis, polissacarídeos e taninos condensados. Assim, as extrações sequenciais por hidrodestilação de *C. citriodora* podem aumentar os polifenóis do efluente líquido (extrato aquoso), como os taninos. Foi demonstrado que o reaproveitamento de efluentes pode ser promissor não apenas para obtenção de produtos com potencial interesse comercial, mas também para a obtenção de óleo essencial de forma mais sustentável.

O uso de colunas de fase estacionária polimérica mostrou-se eficiente em termos de custo e de recuperação de polifenóis, recuperando 9,5% mais compostos fenólicos que a coluna de sílica. Isso foi atribuído à maior retirada de taninos presentes no extrato. A presença de ácido gálico na pirólise das frações ricas em polifenóis confirmou essa maior quantidade de taninos nos extratos recuperados da coluna de fase estacionária polimérica. As frações com maior concentração de polifenóis foi maior em comparação com as frações contendo açúcares, devido ao conhecido poder antioxidante dos polifenóis.

Os testes iniciais indicaram que foi possível obter 2,5 g L^{-1} de ácido lático a partir da fração contendo açúcares do extrato. Ao avaliar o rendimento do ácido lático em relação à massa seca de açúcares do extrato, foi obtido rendimento de 51%. Isso indica que 49% de açúcares não foram convertidos em ácido lático. Baseado nesse estudo e na literatura recente, é necessário dar continuidade ao estudo para obtenção de maiores rendimentos de ácido lático, bem como o estudo mais aprofundado dos usos dos demais constituintes do extrato, tais como os taninos hidrolisáveis.

Por fim, conclui-se que a utilização do subproduto da hidrodestilação é uma forma sustentável de reduzir o consumo de água pelas indústrias, além de resultar na obtenção de coprodutos com múltiplas funcionalidades: taninos, açúcares, ácidos orgânicos e Inositol. Esse estudo abre uma possibilidade de que as indústrias repensem sua forma de produção e utilizem esse subproduto de forma mais sustentável.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. **Journal of Biotechnology**, v. 156, n. 4, p. 286–301, 2011.

ABRAF. **Anuário estatístico ABRAF 2013**. Brasília: v.1.

AHMADI, L.; MIRZA, M.; SHAHMIR, F. The volatile constituents of Artemisia marschaliana Sprengel and its secretory elements. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 141–143, 2002.

AIT SI SAID, C. et al. Screening of Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oil and Volatile Fraction from Olive Mill Wastewater. **Chemosensors**, v. 10, n. 11, p. 491, 2022.

ANTONANGELO, A.; BACHA, C. J. C. As Fases da Silvicultura no Brasil. **RBE**, v. 52, n. 1, p. 207–238, 1998.

ANTÔNIA FÁDIA VALENTIM DE AMORIM. **Métodos cromatográficos**. 1. ed. Fortaleza: Editora da Universidade Estadual do Ceará, 2019.

APAK, R. et al. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 997–1027, 2016.

ASSIS, T. F. Hybrids and mini-cutting: a powerful combination that has revolutionized the Eucalyptusclonal forestry. **BMC Proceedings**, v. 5, n. S7, p. I18, 2011.

BABU, K. G. D.; KAUL, V. K. Variation in essential oil composition of rose-scented geranium (Pelargonium sp.) distilled by different distillation techniques. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, n. 2, p. 222–231, 2005.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BARANAUSKIENE, R. et al. Agrorefinery of Tanacetum vulgare L. into valuable products and evaluation of their antioxidant properties and phytochemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 113–122, 2014.

BARBIERI, C.; BORSOTTO, P. Essential Oils: Market and Legislation. Em: **Intech Open**. [s.l: s.n.]. p. 107–127.

BERTOLA, A. **Eucalipto: 100 Anos de Brasil "Falem mal, mas continuem falando de mim!"** v. 1

BHAGAT, M.; SAXENA, A. **Anti-proliferative effect of leaf extracts of Eucalyptus citriodora against human cancer cells in vitro and in vivo**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/235372494>.

BHUYAN, D. J. et al. Exploring the Least Studied Australian Eucalypt Genera: Corymbia and Angophora for Phytochemicals with Anticancer Activity against Pancreatic Malignancies. **Chemistry and Biodiversity**, v. 14, n. 3, 2017.

BIESAGA, M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 18, p. 2505–2512, 2011.

BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. Brazilian essential oils: general view, developments and perspectives. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588–594, 2009.

BLANCO, A.; BLANCO, G. Metabolism. Em: **Medical Biochemistry**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 275–281.

BODÎRLĂU, R.; T. C. A. Fourier transform infrared spectroscopy and thermal analysis of lignocellulose fillers treated with organic anhydrides. **Romania Journal Physics**, v. 54, n. 1–2, p. 93–104, 2009.

BOSO, S. et al. Polyphenols in the Wastewater Produced during the Hydrodistillation of 'Narcea Roses' Cultivated in the Cibea River Valley (Northern Spain). **Horticulturae**, v. 8, n. 5, p. 376, 2022.

BOSSOU, A. D. et al. Characterization of volatile compounds from three Cymbopogon species and Eucalyptus citriodora from Benin and their insecticidal activities against Tribolium castaneum. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 306–317, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, v. 91305, p. 25–30, 1995.

BRISOLA, S. H.; DEMARCO, D. Stem anatomical analysis of Eucalyptus grandis, E. urophylla and E. grandis x urophylla: wood development and its industrial importance. **Scientia Forestalis**, v. 39, n. 91, p. 317–330, 2011.

CASSEL, E. et al. Stem distillation modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 171–176, 2009.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; JOSEPH, P. Experiments and Modeling of the Cymbopogon winterianus Essential Oil Extraction by Steam Distillation. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 50, n. 3, p. 126–129, 2006.

CASTILLO MARTINEZ, F. A. et al. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, n. 1, p. 70–83, 2013.

CASTRO, C. A. DE O. et al. Brief history of Eucalyptus breeding in Brazil under perspective of biometric advances. **Ciência Rural**, v. 46, n. 9, p. 1585–1593, 2016.

CHANFREAU, S. et al. Enzymatic synthesis of poly-L-lactide and poly-L-lactide-co-glycolide in an ionic liquid. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 33, n. 5, p. 629–38, 2010.

CHUENSANGJUN, C. et al. Surface-Modified Cellulose Nanofibers-graft-poly(lactic acid)s Made by Ring-Opening Polymerization of l-Lactide. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 27, n. 4, p. 847–861, 2019.

CLEMENTE, M. A. et al. Acaricidal activity of the essential oils from Eucalyptus citriodora and Cymbopogon nardus on larvae of Amblyomma cajennense

(Acari: Ixodidae) and Anocentor nitens (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 107, n. 4, p. 987–992, 2010.

COPPEN, J. J. W.; HONE, G. A. **Eucalyptus oils: a review of production and markets**: Bulletin 56. Greenwich: Natural Resources Institute, 1992.

COSME, P. et al. Plant Phenolics: Bioavailability as a Key Determinant of Their Potential Health-Promoting Applications. **Antioxidants**, v. 9, n. 12, p. 1263, 12 dez. 2020.

COSTA, A. V. et al. Chemical composition of essential oil from Eucalyptus citriodora leaves and insecticidal activity against Myzus persicae and Frankliniella schultzei. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 18, n. 2, p. 374–381, 2015.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville ed. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250–1318.

DA ROSA, F. S. et al. Environmental impact management of Brazilian companies: Analyzing factors that influence disclosure of waste, emissions, effluents, and other impacts. **Journal of Cleaner Production**, v. 96, p. 148–160, 2015.

DAMJANOVIĆ, L. et al. The investigation of phenol removal from aqueous solutions by zeolites as solid adsorbents. **Journal of Hazardous Materials**, v. 184, n. 1–3, p. 477–484, 2010.

DE ANDRADE, A. M.; GOMES, S. DA S. Influência de alguns fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de Eucalyptus citriodora Hook. **Floresta e Ambiente**, v. 7, n. 1, p. 181–189, 2000.

PADILHA, C. E. et al. Fractionation of green coconut fiber using sequential hydrothermal/alkaline pretreatments and Amberlite XAD-7HP resin. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 6, p. 103474, 2019.

DE ELGUEA-CULEBRAS, G. O.; BRAVO, E. M.; SÁNCHEZ-VIOQUE, R. Potential sources and methodologies for the recovery of phenolic compounds from distillation residues of Mediterranean aromatic plants. An approach to the valuation of by-products of the essential oil market – A review. **Industrial Crops and Products**, v. 175, p. 114261, 2022.

DE OLIVEIRA, E. B.; JÚNIOR, J. E. P. **O eucalipto e a Embrapa: Quatro décadas de pesquisa e desenvolvimento**. Embrapa Florestas ed. Brasília

DECHY-CABARET, O.; MARTIN-VACA, B.; BOURISSOU, D. Controlled Ring-Opening Polymerization of Lactide and Glycolide. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6147–6176, 2004.

DEL OLMO, J. A. et al. Antibacterial catechol-based hyaluronic acid, chitosan and poly (N-vinyl pyrrolidone) coatings onto Ti6Al4V surfaces for application as biomedical implant. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 1222–1235, 2021.

DHOUIBI, N. et al. Valorization and Reuse of Centaurea Kroumeriensis Hydrodistillation Effluent: A Sustainable Phytodyeing Process for Wool Fabrics. **Fibers and Polymers**, v. 22, n. 8, p. 2238–2250, 2021.

DOGENSKI, M.; FERREIRA, N. J.; OLIVEIRA, A. L. DE. Extraction of *Corymbia citriodora* essential oil and resin using near and supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 115, p. 54–64, 2016.

DONG, R. et al. Recent developments in luminescent nanoparticles for plant imaging and photosynthesis. **Journal of Rare Earths**, v. 37, n. 9, p. 903–915, 2019.

DORAN, J. C. et al. Effect of Harvest Time on the Leaf and Essential Oil Yield of *Eucalyptus camaldulensis*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 6, p. 627–632, 1995.

DORNELLES, E. S. **Lactic acid production: an overview on process improvement**. Francisco Beltrão: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2021.

DORNIANI, D. et al. Preparation of Fe3O4 magnetic nanoparticles coated with gallic acid for drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, p. 5745, 2012.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. **Phitotherapy Research**, v. 323, p. 308–323, 2007.

FADEL, O. et al. Separation and identification of polar polyphenols in oily formulation using high-performance thin-layer chromatography and mass spectroscopy techniques. **OCL**, v. 25, n. 5, p. 506, 2018.

FATHI, E.; SEFIDKON, F.; ABRAVESH, Z. The Effects of Drying and Extraction Methods on Essential Oil Content and Composition of *Eucalyptus spathulata*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 12, n. 2, p. 189–197, 2009.

FERHAT, M. A. et al. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 121–126, 2006.

FERRO, M. D. et al. Chromatographic Separation of Phenolic Compounds from Extra Virgin Olive Oil: Development and Validation of a New Method Based on a Biphenyl HPLC Column. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, p. 201, 2019.

FIALHO, R. DE O.; PAPA, M. DE F. S. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE Sphaceloma ampelinum. **Cultura Agronômica**, v. 24, n. 1, p. 63–70, 2015.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus*. **Tecnologia Agroalimentar**, p. 96–100, 2013.

FOELKEL, C. E. B. **Eucalipto no Brasil, história de pioneirismo**. Curitiba..

FUKUSHIMA, K. et al. Production of D-Lactic Acid by Bacterial Fermentation of Rice Starch. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 11, p. 1021–1027, 2004.

FURTADO, J. D. S. et al. Indicadores econômicos na implantação do cultivo de eucalipto citriodora – <i>Corymbia citriodora</i> (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson). **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 37, n. 3, p. 26-57, 2020.

GARCÍA, Á.; CARRIL, E. P.-U. A. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal**, v. 2, n. 3, p. 119–145, 2009.

GERSHENZON, J. Metanolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. **Jornal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 6, p. 1281–1328, 1994.

GHAFFAR, T. et al. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 222–229, 2014.

GHARRED, N. et al. Wastewater to Ecological Dyeing Process and Bioactive Compounds Resources: Case Study of Dittrichia graveolens Hydrodistillation Aqueous Residue. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 9, p. 5065–5077, 2021.

GOLLE, D. P. et al. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação de biotecnologia. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, p. 1606–1613, 2009.

GOODINE, T.; OELGEMÖLLER, M. *Corymbia citriodora*: A Valuable Resource from Australian Flora for the Production of Fragrances, Repellents, and Bioactive Compounds. **ChemBioEng Reviews**, v. 7, n. 6, p. 170–192, 2020.

GRANATO, D. et al. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 266–279, 2016.

GRAND VIEW RESEARCH. **U.S. Essential Oil Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Eucalyptus, Lemon), By Application (Flavors, Fragrances), And Segment Forecasts, 2016 - 2024**. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/us-essential-oil-market>. Acesso em: 2022.

GUNSTONE, F. D. United States of America year. **Lipid Technology**, v. 22, n. 6, p. 144–144, 2010.

GUO, L. et al. Purification and characterization of hydrolysable tannins extracted from Coriaria nepalensis bark using macroporous resin and their application in gallic acid production. **Industrial Crops and Products**, v. 162, p. 13-30, 2021.

GUO, Z. et al. Integrated biorefinery of bamboo for fermentable sugars, native-like lignin, and furfural production by novel deep eutectic solvents treatment. **Industrial Crops and Products**, v. 188, p. 15-45, 2022.

HALL, D. A.; RAO, K. K. **Fotossíntese**. E.P.U ed. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, 1980. v. 10

HAN, X.; PARKER, T. L. Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (Origanum vulgare) essential oil in a human skin disease model. **Biochimie Open**, v. 4, p. 73–77, 2017.

HILL, K. D.; JOHNSON, L. A. S. Systematic studies in the eucalypts 7. A revision of the bloodwoods, genus *Corymbia* (Myrtaceae). **Telopea**, v. 6, n. 2–3, p. 185–504, 1995.

HONG, C. H. et al. Development of Four Unit Processes for Biobased PLA Manufacturing. **ISRN Polymer Science**, v. 2012, p. 1–6, 2012.

HOU, M.; ZHANG, L. Adsorption/desorption characteristics and chromatographic purification of polyphenols from Vernonia patula (Dryand.) Merr. using macroporous adsorption resin. **Industrial Crops and Products**, v. 170, p. 13-29, 2021.

HU, J. et al. High-titer lactic acid production by Lactobacillus pentosus FL0421 from corn stover using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 74–80, 2016.

HUERTA, R. R. et al. Clove essential oil emulsion-filled cellulose nanofiber hydrogel produced by high-intensity ultrasound technology for tissue engineering applications. **Ultrasonics Sonochemistry**, p. 104845, 2019.

IBÁ. **Relatório Anual: Indústria Brasileira de Árvores**. IBÁ ed. São Paulo: [s.n.]. v. 1

IGLESIAS, S. P. et al. Techno-economic assessment of bio-oil produced from Eucalyptus forestry residues. **Industrial Crops and Products**, v. 171, p. 113936, 2021.

IPT. **Informações sobre madeiras: Eucalipto citriodora**. Disponível em: <http://www.ipt.br/informacoes_madeiras/12.htm#:~:text=CARACTER%C3%8DSTICAS%20GERAIS,revessa%3B%20textura%20fina%20a%20m%C3%A9dia.>. Acesso em: 2022.

IRAM, W. et al. Mass spectrometric identification and toxicity assessment of degraded products of aflatoxin B1 and B2 by Corymbia citriodora aqueous extracts. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14672, 2015.

ISRAELACHVILI, J. N. Van der Waals Forces. Em: **Intermolecular and Surface Forces**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 107–132.

JAENSON, T. G. T.; GARBOUI, S.; PÅLSSON, K. Repellency of oils of lemon eucalyptus, geranium, and lavender and the mosquito repellent MyggA natural to Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) in the laboratory and field. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 4, p. 731–736, 2006.

JIANG, Y. et al. Cinnamon essential oil Pickering emulsion stabilized by zein-pectin composite nanoparticles: Characterization, antimicrobial effect and advantages in storage application. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.

KATO, H.; YAMAMOTO, M.; FUJIMAKI, M. Mechanisms of Browning Degradation of d-Fructose in Special Comparison with d-Glucose-Glycine Reaction. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 939–948, 1969.

KOMESU, A. et al. Lactic Acid Production to Purification: A Review. **BioResources**, v. 12, n. 2, p. 4364–4383, 2017.

KOUDORO, Y. et al. Phytochemistry, antimicrobial and antiradical activities evaluation of essential oils, ethanolic and hydroethanolic extracts of the leaves of eucalyptus citriodora hook from benin. **Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry**, v. 15, n. 1, p. 59–73, 2014.

KUMAR, A.; THAKUR, A.; PANESAR, P. S. Lactic acid and its separation and purification techniques: A review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 18, n. 4, p. 823–853, 2019.

KUMAR, V. et al. A critical review on current strategies and trends employed for removal of inhibitors and toxic materials generated during biomass pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 299, p. 122633, 2020.

LEE, H. et al. Tolerance of Saccharomyces cerevisiae K35 to lignocellulose-derived inhibitory compounds. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 4, p. 755–760, 2011.

LEE, J. T. E.; EE, A. W. L.; TONG, Y. W. Environmental impact comparison of four options to treat the cellulosic fraction of municipal solid waste (CF-MSW) in green megacities. **Waste Management**, v. 78, p. 677–685, 2018.

LEMOS, A. L. F. et al. Madeira de Corymbia citriodora (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson sob Aspectos Físicos e Anatômicos como Fatores Qualitativos. **Floresta e Ambiente**, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2012.

LI, Y. et al. Sustainable Lactic Acid Production from Lignocellulosic Biomass. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 9, n. 3, p. 1341–1351, 2021.

LIANG, E. et al. P4-359: Effects of oral ELND005 (Scyllo-inositol) on brain scyllo-inositol and myo-inositol levels: Spectroscopy results from a phase 2 study in MILD-TO-MODERATE Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 8, n. 4S_Part_21, 2012.

LIANG, Q. et al. Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, toxicology, and quality control of Rhododendron dauricum L. leaves: A comprehensive review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 305, p. 116085, 2023.

LISPERGUER, J.; SARAVIA, Y.; VERGARA, E. Structure and thermal behavior of tannins from acacia dealbata bark and their reactivity toward formaldehyde. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 61, n. 4, p. 3188–3190, 2016.

LIU, Z. et al. Cinnamomum camphora fruit peel as a source of essential oil extracted using the solvent-free microwave-assisted method compared with conventional hydrodistillation. **LWT**, v. 153, p. 112549, 2022.

LOURENÇON, T. V. et al. Physical properties of Corymbia citriodora wood in radial direction. **Scientia Forestalis**, v. 41, n. 99, p. 369–375, 2013.

LUZ, O. DOS S. L. et al. Characteristics for the selection of parents of Corymbia citriodora aiming to the production of wood and essential oil. **Revista Árvore**, v. 42, n. 1, 2018.

MACIEL, L. G. et al. The potential of the pecan nut cake as an ingredient for the food industry. **Food Research International**, v. 127, p. 108–118, 2020.

MAGALHAES, W. L. E. et al. **Método de fracionamento de extratos de erva-mate e separação dos compostos fenólicos dos açúcares**. Colombo: Embrapa Florestas, v.1.

MANI, J. S. et al. Antioxidative and therapeutic potential of selected Australian plants: A review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 268, p. 113580, 2021.

MANIKA, N. et al. Effect of season on yield and composition of the essential oil of Eucalyptus citriodora Hook. leaf grown in sub-tropical conditions of North India. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 14, p. 2875–2879, 2012.

MARCHIORI, J. N. C. Primórdios da silvicultura no Rio Grande do Sul: Nota sobre introdução do gênero Eucalyptus L'Her. **Balduinia**, v. 44, p. 21–31, 2014.

MARKET RESEARCH HIGHLIGHTS. **Essential Oils Market Size Is Anticipated To Reach Nearly USD 14 Billion By 2024**. Disponível em: <marketresearchhighlights.org/industry-reports/essential-oils-market/>. Acesso em: 2022.

MASUTANI, K.; KIMURA, Y. Chapter 1. PLA Synthesis. From the Monomer to the Polymer. Em: [s.l: s.n.]. p. 1–36.

MASYITA, A. et al. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. **Food Chemistry: X**, v. 13, p. 100217, 2022.

ARANTES, M. S. T. **Desenvolvimento de um adsorvente a partir do resíduo da agroindústria de palmito de pupunha para a remoção de cobre (II) de soluções aquosas**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2022.

MATOS, M. et al. Pilot-Scaled Fast-Pyrolysis Conversion of Eucalyptus Wood Fines into Products: Discussion Toward Possible Applications in Biofuels, Materials, and Precursors. **BioEnergy Research**, v. 13, n. 2, p. 411–422, 2020.

MATTONAI, M.; RIBECHINI, E. Fast screening for hydrolysable and condensed tannins in lignocellulosic biomass using reactive Py-GC/MS with in situ silylation. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 135, p. 242–250, 2018.

MATTOS, B. D. et al. Colour changes of Brazilian eucalypts wood by natural weathering. **International Wood Products Journal**, v. 5, n. 1, p. 33–38, 2014a.

MATTOS, B. D. et al. Biodeterioration of wood from two fast-growing eucalypts exposed to field test. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 93, p. 210–215, 2014.

MAYCOCK, C. D. et al. An application of quinic acid to the synthesis of linear homochiral molecules: A synthesis of (+)-negamycin. **Tetrahedron Letters**, v. 33, n. 32, p. 4633–4636, 1992.

MEDEIROS, B. L. M. A. et al. Avaliação das Propriedades Físicas e Químicas da Madeira de Corymbia citriodora e Eucalyptus urophylla x Eucalyptus grandis Cultivadas no Piauí. **Nativa**, v. 4, n. 6, p. 403–407, 2016.

MEDEIROS, P. M.; SIMONEIT, B. R. T. Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1141, n. 2, p. 271–278, 2007.

MELO, L. F. M. DE et al. Biological and pharmacological aspects of tannins and potential biotechnological applications. **Food Chemistry**, v. 414, p. 135645, 2023.

MELO, T. O. et al. Simultaneous pyrolysis and trimethylsilylation with N-methyl-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide for the characterisation of lignocellulosic materials from kraft pulping. **Holzforschung**, v. 72, n. 10, p. 851–862, 2018.

MELO, T. O.; MARQUES, F. A.; HANSEL, F. A. Pyrolysis-gas chromatography–mass spectrometry Kováts retention index of pyrolysis products of lignocellulosic materials. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 126, p. 332–336, 2017.

MOREIRA, C. Fotossíntese. **Revista de Ciência Elementar**, v. 4, n. 1, p. 1–5, 2013.

MORONE-FORTUNATO, I. et al. Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of Helichrysum italicum (Roth) G. Don ssp. italicum from wild Mediterranean germplasm. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 639–649, 2010.

MOURA, G. S.; FRANZENER, G. Anatomia foliar de Corymbia Citriodora (Hook.) k.d. hill & L.A.S. Johnson oriundas da região noroeste do Paraná. **Journal of Neotropical Biology**, v. 11, n. 2, p. 116–123, 2014.

NAPOLI, E. et al. Phenolic Profiles, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Hydrodistillation Wastewaters from Five Lamiaceae Species. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7427, 2022.

NEVES, K. M. DAS et al. Uso de RMN de 13C para identificação da madeira de Corymbia citriodora. **Revista Ciência da Madeira - RCM**, v. 10, n. 1, p. 1–7, 2019.

NIEROP, K. G. J.; NAAFS, D. F. W.; VAN BERGEN, P. F. Origin, occurrence and fate of extractable lipids in Dutch coastal dune soils along a pH gradient. **Organic Geochemistry**, v. 36, n. 4, p. 555–566, 2005.

NIKOLIC, L. et al. Novel Microwave-Assisted Synthesis of Poly(D,L-lactide): The Influence of Monomer/Initiator Molar Ratio on the Product Properties. **Sensors**, v. 10, n. 5, p. 5063–5073, 2010.

NOLASCO, J.; DE MASSAGUER, P. R. Thermal degradation kinetics of sucrose, glucose and fructose in sugarcane must for bioethanol production. **Journal of Food Process Engineering**, v. 29, n. 5, p. 462–477, 2006.

OJO, A. O.; DE SMIDT, O. Lactic Acid: A Comprehensive Review of Production to Purification. **Processes**, v. 11, n. 3, p. 688, 2023.

OLIVEIRA, F. C. M. DE. **Caracterização dos resíduos industriais gerados no processo de extração de óleos essenciais por arraste a vapor**. [s.l.] Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2015.

OLIVO, C. J. et al. Efeito do óleo de eucalipto (Corymbia citriodora) no controle do carrapato bovino. **Ciencia Rural**, v. 43, n. 2, p. 331–337, 2013.

PANIKAR, S. et al. Essential oils as an effective alternative for the treatment of COVID-19: Molecular interaction analysis of protease (Mpro) with pharmacokinetics and toxicological properties. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 5, p. 601–610, 2021.

PAULA, M. O. DE et al. Análise termomecânica da madeira de Corymbia citriodora submetida a gradientes térmicos. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 3, p. 358–368, 2014.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy**. 3. ed. Washington: Thomson Learning, 2001. v. 3

PEREIRA, A. K. S. et al. Eucaliptos não tradicionais: uma revisão sistemática sobre Eucalyptus camaldulensis, Corymbia citriodora e Corymbia maculata. **Madeiras Nativas e Plantadas do Brasil: qualidade, pesquisas e atualidades**, v. 26, p. 436–450, 2021.

PEREIRA, R. A.; FILHO, E. B.; MOURA, R. G. Rendimento de óleo essencial de Corymbia citriodora Hill & Johnson sob diferentes níveis de infestação de galhas de Epichrysocharis burwelli schauff (Hymenoptera, Eulophidae). **Revista de Agricultura**, v. 87, n. 1, p. 10–17, 2012.

PERTUZATTI, P. B. et al. Carotenoids, tocopherols and ascorbic acid content in yellow passion fruit (Passiflora edulis) grown under different cultivation systems. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 259–263, 2015.

PINALES-MÁRQUEZ, C. D. et al. Circular bioeconomy and integrated biorefinery in the production of xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 162, p. 113274, 2021.

PRABAKAR, D. et al. Pretreatment technologies for industrial effluents: Critical review on bioenergy production and environmental concerns. **Journal of Environmental Management**, v. 218, p. 165–180, 2018.

QIN, L. et al. Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 70, 2016.

RAJESWARA RAO, B. R. et al. Chemical-profile variations in essential oils isolated from lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) biomass and condensate wastewater by re-distillation and solvent extraction techniques. **Journal of Essential Oil Research**, v. 28, n. 6, p. 557–564, 2016.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

REIS, C. A. F. et al. **Corymbia citriodora: estado da arte de pesquisas no Brasil**. Embrapa Florestas ed. Colombo:. v. 1

REJMÁNEK, M.; RICHARDSON, D. M. Trees and shrubs as invasive alien species - 2013 update of the global database. **Diversity and Distributions**, v. 19, n. 8, p. 1093–1094, 2013.

ROSSI, T. **Estudo do potencial de uso do resíduo efluente gerado da destilação do óleo de folhas de eucalipto (Corymbia citriodora(hook) Pryor e Johnson 1976), como corante natural para o tingimento têxtil de algodão**.

RYU, Y.; BERRY, J. A.; BALDOCCHI, D. D. What is global photosynthesis? History, uncertainties and opportunities. **Remote Sensing of Environment**, v. 223, n. November 2018, p. 95–114, 2019.

SABAHI, Z. et al. Valorization of Waste Water of Rosa damascena Oil Distillation Process by Ion Exchange Chromatography. **The Scientific World Journal**, v. 2020, p. 1–6, 2020.

SÁENZ DE MIERA, B. et al. A pathway to improve detoxification processes by selective extraction of phenols and sugars from aqueous media using sustainable solvents. **Separation and Purification Technology**, v. 299, n. 121675, p. 1–11, 2022.

SALIM, R.; ASIK, J.; SARJADI, M. S. Chemical functional groups of extractives, cellulose and lignin extracted from native Leucaena leucocephala bark. **Wood Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 295–313, 2021.

SALLA, S. et al. Antioxidant and Apoptotic Activity of Papaya Peel Extracts in HepG2 Cells. **Food and Nutrition Sciences**, v. 07, n. 06, p. 485–494, 2016.

SANTAROSA, E.; JÚNIOR, J. F. P.; GOULART, I. C. G. DOS R. **Cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda**. ed. Colombo: Embrapa Florestas, v. 1

SARMA, S. N. et al. A metabolomics study on effects of polyaromatic compounds in oil sand extracts on the respiratory, hepatic and nervous systems using three human cell lines. **Environmental Research**, v. 178, p. 108680, 2019.

SAVITHRAMMA, N.; RAO, M. L.; ANKANNA, S. Screening of Medicinal Plants for Secondary Metabolites. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 4, p. 643–647, 2011.

SCOPEL, J. M. et al. Essential oil and residual distillation water of *Pterocaulon polystachyum* DC: composition, antifungal activity, and mathematical modeling of steam distillation. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 1, p. 1–8, 2022.

SHABAN, M. et al. Synthesis, characterization, and the investigation of the applicability of citric acid functionalized Fe2O3 nanoparticles for the extraction of carvedilol from human plasma using DFT calculations and clinical samples analysis. **Microchemical Journal**, v. 179, p. 107-398, 2022.

SHEN, X.; XIA, L. Lactic acid production from cellulosic material by synergetic hydrolysis and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 133, n. 1, p. 251–263, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, C.; KIMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. New York: LTC, 2006. v. 7

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Óleos voláteis. **Anais**...Porto Alegre/ Florianopolis: 1999.

SIMOES-CARDOSO, J. C.; YOSHIMOTO, N.; YAMAMOTO, S. Thermodynamic analysis of polyphenols retention in polymer resin chromatography by van't Hoff plot and isothermal titration calorimetry. **Journal of Chromatography A**, v. 1608, p. 460405, dez. 2019.

SINGHVI, M.; GOKHALE, D. Biomass to biodegradable polymer (PLA). **RSC Advances**, v. 3, n. 33, p. 13558, 2013.

SLAVOV, A. et al. Valorization of wastes from the rose oil industry. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 16, n. 2, p. 309–325, 2017.

SNENE, A. et al. In vitro antimicrobial, antioxidant and antiviral activities of the essential oil and various extracts of wild (*Daucus virgatus* (Poir.) Maire) from Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 109–115, 2017.

STANFORD, J. P. et al. Separation of sugars and phenolics from the heavy fraction of bio-oil using polymeric resin adsorbents. **Separation and Purification Technology**, v. 194, p. 170–180, 2018.

STATISTA. **Market volume of lactic acid worldwide from 2015 to 2021, with a forecast for 2022 to 2029**. Acesso em 2023.

STRINGARO, A.; NORDIO, M.; VAZQUEZ-LEVIN, M. Application of myo-inositol and d-chiro-inositol in andrological issues. Em: **A Clinical Guide to Inositols**. p. 197–211, 2023

SWETHA, T. A. et al. A review on biodegradable polylactic acid (PLA) production from fermentative food waste - Its applications and degradation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 234, p. 123703, 2023.

TAPPI T 650 OM-15. **Solids content of black liquor**. Georgia: 2015.

TOLBA, H. et al. Essential oil of Algerian *Eucalyptus citriodora*: Chemical composition, antifungal activity. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 25, n. 4, p. 128–133, 2015.

TRUEMAN, S.; HUNG, C.; WENDLING, I. Tissue Culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Forests**, v. 9, n. 2, p. 84, 2018.

ULTRA INTERNATIONAL. **Essential Oils Market report**. Acesso em 2023.

VAFADAR-YENGEJE, L.; AMINI, R.; NASAB, A. D. M. Chemical compositions and yield of essential oil of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) in intercropping with faba bean (*Vicia faba* L.) under different fertilizers application. **Journal of Cleaner Production**, v. 239, p. 18-33, 2019.

VENSKUTONIS, P. R.; JONUŠAITE, K. High pressure biorefinery of Essential oil yielding plants into valuable ingredients. **Acta Horticulturae**, v. 1125, p. 399–406, 2016.

VERA, M. et al. Recent advances in tannin-containing food biopackaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 133, p. 28–36, 2023.

VERLET, N. Overviw of the essential oils economy. Em: **Acta Horticulturae**. p. 65–72.

VERMA, P.; SHAH, N. G.; MAHAJANI, S. M. A Novel Technique to Characterize and Quantify Crystalline and Amorphous Matter in Complex Sugar Mixtures. **Food Analytical Methods**, v. 13, n. 11, p. 2087–2101, 2020.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo Essencial de Eucalipto**. Escola Superior ed. v. 17

VUONG, Q. V et al. REVIEW Botanical, Phytochemical, and Anticancer Properties of the Eucalyptus Species. **Chemistry & Biodiversity**, v. 12, p. 907–924, 2015.

WANG, Y.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 1, p. 10–18, 2015.

WEDLER, J. et al. In vitro modulation of inflammatory target gene expression by a polyphenol-enriched fraction of rose oil distillation wastewater. **Fitoterapia**, v. 114, p. 56–62, 2016.

WHATLEY, J. M.; WHATLEY, F. R. **A luz da vida das plantas**. E.P.U. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1982. v. 30

WOODBURY, T. J. et al. Mechanisms of the different effects of sucrose, glucose, fructose, and a glucose–fructose mixture on wheat starch gelatinization, pasting, and retrogradation. **Journal of Food Science**, v. 88, n. 1, p. 293–314, 2023.

XIA, Z. et al. Unraveling the mechanism of thermal and thermo-oxidative degradation of tannic acid. **Thermochimica Acta**, v. 605, p. 77–85, 2015.

ZHANG, W. et al. Bionic multi-tentacled ionic liquid-modified silica gel for adsorption and separation of polyphenols from green tea (*Camellia sinensis*) leaves. **Food Chemistry**, v. 230, p. 637–648, 2017.

ZHAO, Z.; UMEMURA, K. Investigation of a New Natural Particleboard Adhesive Composed of Tannin and Sucrose. 2. Effect of Pressing Temperature and Time on Board Properties, and Characterization of Adhesive. **BioResources**, v. 10, n. 2, 2015.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555–559, 1999.

LISTA DE PUBLICAÇÕES

Artigo aceito na Industrial Crops and Products: SOARES, A. K.; DE LIMA, G. G.; MATOS, M.; HANSEL, F. A.; CADEMARTORI, P. H. G.; MAGALHÃES, W. L. E. Wastewater from hydrodistillation can be reused for various sequential extractions, a study using *Corymbia citriodora* leaves. Industrial Crops & Products (F.I: 6,449), jun. 2023.

Resumo simples aceito no XX Brazil MRS Meeting: SOARES, A. K.; HANSEL, F. A.; MATOS, M.; ZAIONCZ, S.; CADEMARTORI, P. H. G.; DIAS, I. A.; MAGALHAES, W. L. E. Harnessing the power of polysaccharides: producing lactic acid from hydrodistilled *Corymbia citriodora* leaves wastewater. In: XXI Brazil MRS Meeting, 2023, Maceió.

Artigo publicado na Industrial Crops and Products: BAESSO, A. S.; DA SILVA, D. J.; SOARES, A. K.; PAULA, M. M. S.; CADEMARTORI, P. H. G. Biosynthesis of gold nanoparticles using papaya seed extract for the functionalization of nanocellulose membranes. Industrial Crops & Products, v.197, p.116601, 2023.

Artigo publicado na Journal of wood chemistry and technology: SOARES, A. K.; GATTO, D. A.; MAGALHÃES, W. L. E.; ERDOCIA, X.; GUTIÉRREZ, M. A. U.; DELUCIS, R. A.; MISSIO, A. L. Kraft lignin as a partial replacement for a traditional surfactant in thymol-based biocidal suspensions: physical and chemical features. Journal of Wood Chemistry and Technology, v. 41, p. 199-209, 2021.

Resumo simples apresentado no XX Brazil MRS Meeting: SOARES, A. K.; DE LIMA, G. G.; AGGIO, B. B.; MATOS, M.; LIMA, T.; NUGENT, M.; MAGALHAES, W. L. E. Multiple steps defibrillated of cellulose using ultra-fine friction grinding on the structure of polyvinyl alcohol hydrogels. In: XX Brazil MRS Meeting, 2022, Foz do Iguaçu.

Comunicado técnico publicado pela Embrapa Florestas: MAGALHÃES, W. L. E.; MATOS, M.; SOARES, A. K.; HANSEL, F. A.; WENDLING, I. Método de fracionamento de extratos de erva-mate e separação dos compostos fenólicos dos açúcares. Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, v. 1, p. 1-9, 2021.

Comunicado técnico publicado pela Embrapa Florestas: MAGALHAES, W. L. E.; MATOS, M.; SOARES, A. K.; HANSEL, F. A. Carvão ativado de eucalipto para remoção de glifosato de água. Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, v. 1, p. 1-12, 2021.

Resumo expandido apresentado no 4° Congresso Internacioal de Biomassa: SOARES, A. K.; MAGALHAES, W. L. E.; ZANATTA, P.; GATTO, D. A. Capacidade antifúngica de suspensões estáveis de lignina e timol contra o fungo *Ganoderma applanatum*. In: 4° Congresso Internacioal de Biomassa, 2019, Pinhais.

Resumo simples apresentado no XVIII Brazil MRS Meeting: SOARES, A. K.; DE CADEMARTORI, P. H. G.; ZANATTA, P.; GATTO, D. A.; MAGALHÃES, W. L. E. Antifungal activity against *Ganoderma applanatum* of a stable suspension of lignin and thymol. In: XVIII Brazil MRS Meeting, 2019, Balneário Camboriú.

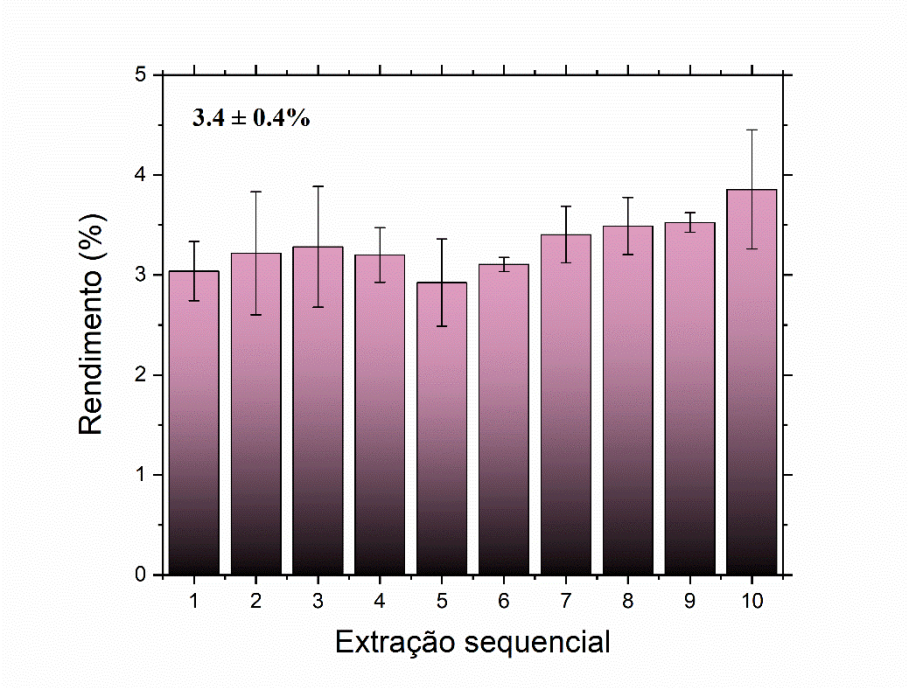
APÊNDICES

APÊNDICE II.1. COMPOSTOS IDENTIFICADOS E SUAS CONCENTRAÇÕES (% ÁREA POR GC-MS) PARA O ÓLEO ESSENCIAL DA *C. citriodora* PROVENIENTE DA 1° E 7° EXTRAÇÃO SEQUENCIAL.

Composto	**RI**	**Concentração (%).**	
		1° extração	7° extração
Metil-(3E)-hexanoato	934	0.06 ± 0.02 [a]	0.14 ± 0.03 [a]
Mirceno	930	**0.17 ± 0.01 [a]**	**0.34 ± 0.01 [b]**
b-pineno	979	**0.39 ± 0.01 [a]**	**0.82 ± 0.05 [b]**
Mirceno	990	0.08 ± 0.01 [a]	0.10 ± 0.02 [a]
Isoamyl isobutyrate	1009	0.01 ± 0.01 [a]	0.04 ± 0.01 [a]
Limoneno	1029	0.07 ± 0.01 [a]	0.11 ± 0.01 [a]
1,8-cineol	1031	0.36 ± 0.02 [a]	0.51 ± 0.02 [a]
Citronellol	1152	*12.00 ± 3.00 [a]*	*9.00 ± 1.00 [a]*
Citronellal	1153	*69.00 ± 4.00 [a]*	*65.00 ± 1.00 [a]*
Mentona	1160	6.40 ± 0.60 [a]	5.97 ± 0.05 [a]
Neo (iso) isopulegol	1171	0.80 ± 0.04 [a]	0.69 ± 0.06 [a]
Isopulegol	1180	0.11 ± 0.02 [a]	0.11 ± 0.02 [a]
Citronellyl acetate	1229	**9.90 ± 0.90 [a]**	**13.70 ± 0.10 [b]**
Eugenol	1360	0.20 ± 0.02 [a]	0.21 ± 0.07 [a]
β-cariofileno	1417	**0.87 ± 0.01 [a]**	**1.28 ± 0.03 [b]**
Total identificado		99,99	98,01

Letras minúsculas diferentes para o teste de Tukey indicam diferença estatística entre as extrações 1 e 7 para cada composto.

APÊNDICE II.2. RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL PARA AS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS.

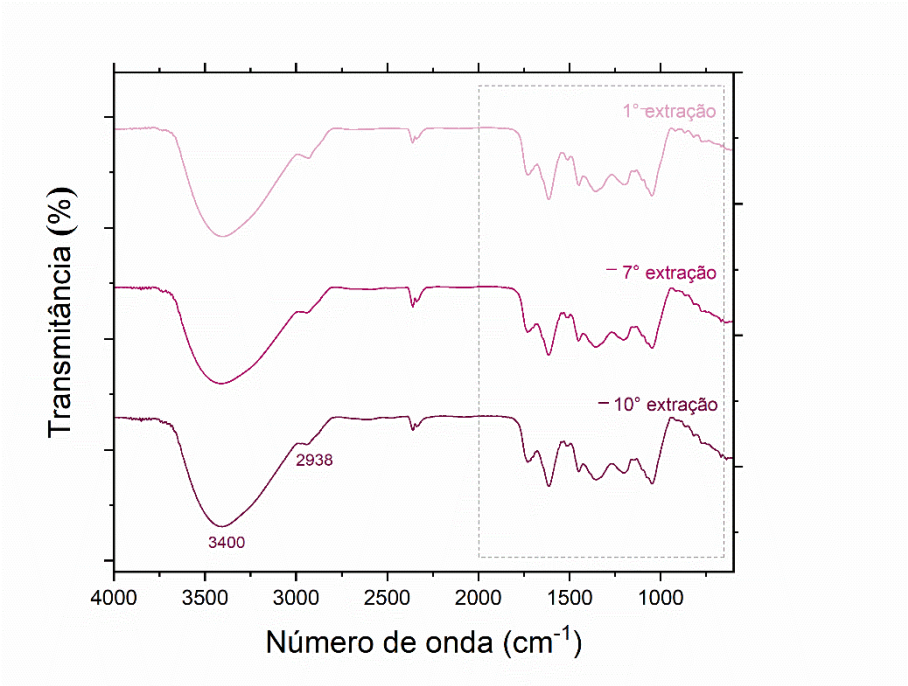


APÊNDICE II.3. COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GC-MS (µg mg^{-1}) DOS EXTRATOS 1 E 7 OBTIDOS DE EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DAS FOLHAS DE *C. citriodora*.

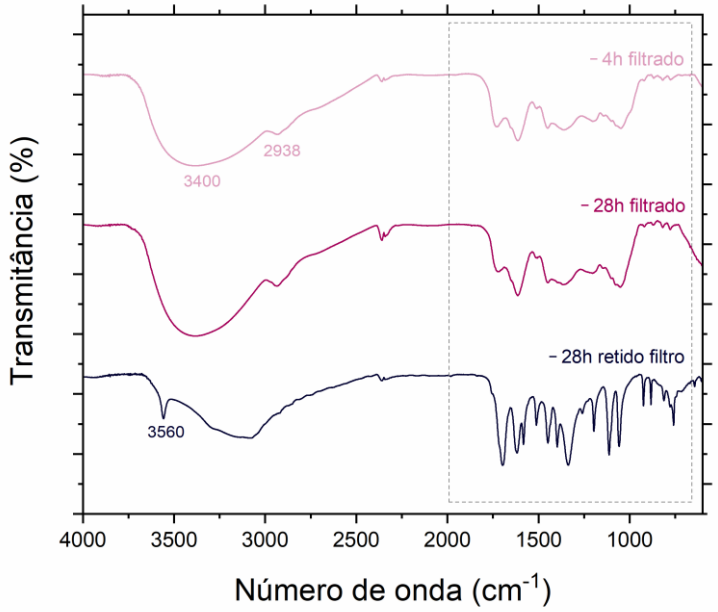
RI	Composto	Classe	m/z	1° extração	7° extração
1053.1	Ácido lático	organic acid	219/191/147	0.39 ± 0.02	1.80 ± 0.80
1076.55	Ácido glicólico	organic acid	205/177/147	0.28 ± 0.02	1.30 ± 0.60
1097.9	Alanina	aminoacid	218/190/147	0.51 ± 0.01	1.90 ± 0.70
1115.05	Benzaldeido	aromatic	135/108/77	0.60 ± 0.03	0.60 ± 0.4
1129.5	Furan - 2 - carboxylic acid	furan	169/125/95	0.21 ± 0.02	1.50 ± 0.90
1124	NA_1131,27	unknown	235/220/147	0.55 ± 0.03	3.00 ± 2.00
1136.25	3-Hydroxypropanoic acid	organic acid	219/177/147	0.12 ± 0.01	1.00 ± 0.50
1155.75	Benzylalcohol	aromatic	180/165/135	1.73 ± 0.06	1.10 ± 0.70
1209.6	valine	aminoacid	218/144/100	0.17 ± 0.08	0.30 ± 0.20
1260.2	Ethanolamine	amine	262/174/100	0.12 ± 0.04	0.40 ± 0.30
1266	phosphoric acid	phosphate	314/299/283	2.50 ± 0.20	4.00 ± 2.00
1299.7	glycine	aminoacid	276/248/174	0.08 ± 0.02	0.30 ± 0.20
1311.1	succinic acid	organic acid	247/172/147	1.90 ± 0.10	1.60 ± 0.90
1324.15	glyceric acid	sugar acid	292/205/189	0.24 ± 0.02	0.50 ± 0.30
1353.7	alanine	aminoacid	306/218/204	0.07 ± 0.02	0.30 ± 0.20
1420.4	Serine	aminoacid	228/217/184	0.06 ± 0.03	0.20 ± 0.10
1422.2	NA_1415,51	unknown	290/248/174	0.19 ± 0.04	0.80 ± 0.50
1481.5	β - alanine	aminoacid	335/245/233	0.04 ± 0.01	0.10 ± 0.10
1493.7	Malic acid	organic acid	211/191/131	6.33 ± 0.06	5.00 ± 2.00
1501.1	cis - linalool oxide (furanoid)	essential oil	211/191/131	22.20 ± 1.90	28.00 ± 11.00
1516.7	trans - linalool oxide (furanoid)	essential oil	211/191/131	1.90 ± 0.20	1.60 ± 0.90
1524.45	cis - linalool oxide (pyranoid)	essential oil	304/216/174	1.53 ± 0.08	2.10 ± 0.90
1533.6	4-amino-butanoic acid	amine	342/239/211	1.50 ± 0.50	7.00 ± 4.00
RI	**Composto**	**Classe**	**m/z**	**1° extração**	**7° extração**
1533.8	1,2,3-trihydroxybenzene	aromatic	319/292/220	0.09 ± 0.01	1.30 ± 0.60
1552.25	erythronic acid	sugar acid	319/292/220	0.05 ± 0.01	0.10 ± 0.10
1560.9	threonic acid	sugar acid	282/267/223	1.00 ± 0.10	1.80 ± 0.60
1623.45	3-hydroxy-benzoic acid	phenol	282/267/223	0.12 ± 0.01	0.40 ± 0.20
1646.25	4-Hydroxy-benzoic acid	phenol	307/277/217	0.09 ± 0.01	0.50 ± 0.20
1708.3	Xylose	sugar	277/160/117	0.36 ± 0.02	1.20 ± 0.50
1715.2	**Rhamnose (1MEOX) (4TMS)**	**sugar**	**319/307/217**	**0.28 ± 0.01**	**4.00 ± 2.00 ***
1753.2	Ribitol	sugar alcohol	292/217/147	0.05 ± 0.01	0.12 ± 0.04
1804.8	Ribonic Acid	sugar acid	372/282/204	0.97 ± 0.09	1.90 ± 0.50
1812.8	Shikimic acid	organic acid	375/273/257	2.58 ± 0.09	3.40 ± 0.70
1849.55	citric acid	organic acid	372/345/255	1.70 ± 0.20	1.60 ± 0.30
1871.65	**quinic acid**	**organic acid**	**364/307/217**	**198.50 ± 0.80**	**123.00 ± 3.00 ***
1873.9	FRUCTOSE	sugar	319/217/205	236.00 ± 25.00	221.00 ± 2.00
1905.15	Fructose	sugar	319/217/205	158.00 ± 8.00	161.70 ± 0.40
1911.3	GALACTOSE	sugar	338/323/308	1.00 ± 0.10	1.60 ± 0.20
1918.2	**GLUCOSE**	**sugar**	**421/319/217**	**198.90 ± 0.09**	**260.00 ± 4.00 ***
1948.7	glucose	sugar	458/443/281	14.00 ± 1.00	14.50 ± 0.40
1985.4	**cis - ferulic acid**	**phenol**	**333/319/292**	**0.05 ± 0.01**	**0.00 ± 0.00 ***

2018.1	mannitol	sugar alcohol	318/305/217	0.07 ± 0.02	0.05 ± 0.01
2049.2	gallic acid	phenol	333/292/204	12.83 ± 0.01	10.60 ± 0.60
2081.15	**Galactonic acid**	**sugar acid**	**318/305/217**	**0.08 ± 0.01**	**0.00 ± 0.00 ***
2088.85	Inositol (isomer)	cyclitol	338/323/308	3.50 ± 0.10	2.70 ± 0.20
2099.1	Galactaric acid	sugar acid	319/217/205	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.00
2130.7	**myo-inositol**	**cyclitol**	**396/381/219**	**101.00 ± 8.00**	**34.00 ± 9.00 ***
2367.2	**trans - ferulic acid**	**phenol**	**292/217/204**	**0.17 ± 0.00**	**0.00 ± 0.00 ***
2624.85	NA_2098,3	unknown	437/361/217	0.39 ± 0.00	0.20 ± 0.10
2723.95	trans - caffeic acid	phenol	361/217/204	0.82 ± 0.09	2.20 ± 0.40
2852.6	NA_2361,83	unknown	361/217/204	0.12 ± 0.01	0.01 ± 0.01
2870.5	**sucrose**	**sugar**	**368/355/267**	**16.00 ± 1.00**	**0.30 ± 0.10 ***
2974.8	maltose	sugar	361/217/204	0.29 ± 0.04	0.04 ± 0.04
3371.5	maltose	sugar	437/361/217	0.14 ± 0.01	0.04 ± 0.01
2853	Isomaltose (1MEOX) (8TMS)	sugar	361/217/204	0.44 ± 0.03	0.20 ± 0.10
2870.5	**Catechin**	**phenol**	**368/355/267**	**0.14 ± 0.01**	**0.00 ± 0.00 ***
2974.8	**Galactinol**	**cyclitol**	**361/217/204**	**2.80 ± 0.10**	**0.60 ± 0.40 ***
3371.5	**Kestose, 1- (11TMS)**	**sugar**	**437/361/217**	**1.35 ± 0.01**	**0.07 ± 0.07 ***
			Total	997.60	915.50

APÊNDICE II.4. ESPECTROS FTIR DOS EXTRATOS DA FOLHA DE *C. citriodora* PROVENIENTES DE EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS.



APÊNDICE II.5. ESPECTROS FTIR DE EXTRATOS DA FOLHA DE *C. citriodora* SUBMETIDOS A PROLONGADO PERÍODO DE EXPOSIÇÃO À TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO.



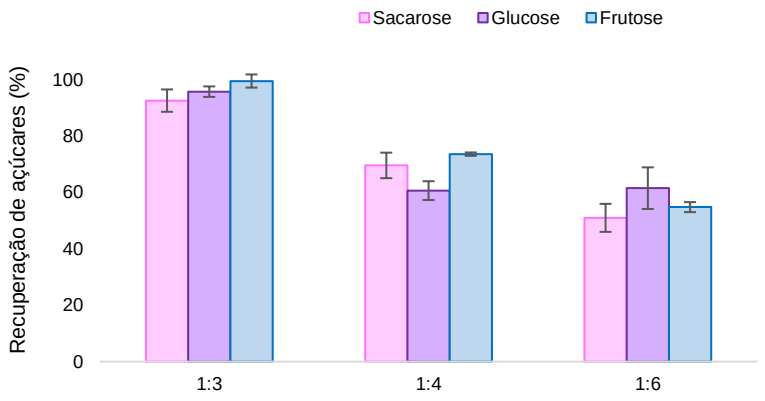
APÊNDICE II.6. COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR SPYT-GC-MS E QUANTIDADE (%) PRESENTE NOS EXTRATOS DE 4 H E 28 H FILTRADOS E 28 H RETIDO NO FILTRO.

RI	Composto	Classe	m/z	4h filtrado	28h filtrado	28h retido filtro
1079.5	hydroxyacetic acid (glycolic acid)	carbohydrate	205/177/147	0.00	0.50	0.00
1112	RI=1112.0	unknown	140/184/255	0.00	1.73	0.00
1218.7	RI=1218.7	unknown	73/189/147	1.19	1.21	0.00
1314.4	RI=1314.4	unknown	183/139/111	0.60	0.78	0.00
1394.7	RI=1394.6	carbohydrate	73/147/204	0.71	1.72	0.00
1434.3	4-vinylguaiacol	phenol	222/207/192	0.00	0.00	1.06
1435.1	3 - hydroxy - 2 - hydroxymethyl - 2 - cyclopenten - 1 - one	cyclopentanone	272/257/147	0.00	0.00	0.65
1475.8	RI=1475.3	unknown	147/205/117	0.60	1.79	0.00
1477.5	Malic acid	organic acid	335/245/233	0.83	0.92	0.00
1490.9	RI=1490.9	unknown	328/313/285	0.00	0.00	1.11
1535.0	1,2,3 - trihydroxybenzene	phenol	342/327/239	5.27	4.99	9.12
1554.2	Threonic acid	carbohydrate	147/73/292	2.25	1.08	0.00
1596.5	1,2,4 - trihydroxybenzene	phenol	342/327/239	0.66	0.91	0.64
1639.8	1,3,5 - trihydroxybenzene	phenol	342/327/268	0.00	0.00	9.97
1645.8	RI=1645.8	unknown	416/313/239	0.00	0.00	3.99
1667.9	RI=1667.9	unknown	416/313/239	0.00	0.00	9.13
1695.5	1,6 - anhydro - b - D - glucopyranose (levoglucosan, 3TMS)	carbohydrate	333/217/204	0.00	0.00	3.31
1771.4	RI=1771.0	unknown	334/244/204	0.73	1.31	0.00
1772.9	3 - deoxy - xylo - hexonic acid (gamma - lactone)	lactone	147/155/246	0.73	0.92	0.00
1796.2	α - fructofuranose	carbohydrate	437/217/257	7.08	9.08	0.00
1804.2	β - fructofuranose	carbohydrate	437/217/257	7.91	7.96	0.00
1837.7	α - glucopyranose	carbohydrate	217/191/147	4.47	6.09	0.00
1851.4	Quinic acid	organic acid	345/255/147	33.15	26.19	0.66
1866.2	RI=1866.0	unknown	273/257/183	5.39	4.10	0.00

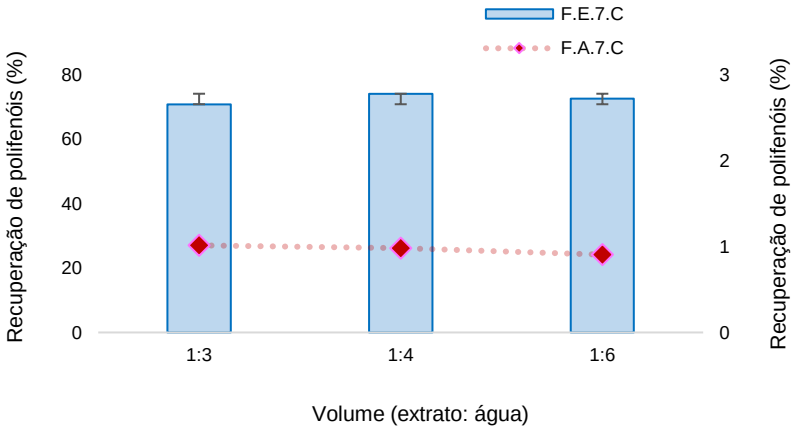
1880.7	RI=1880.7	unknown	217/305/147	1.02	2.84	0.00
1948.5	Gallic acid	phenol	281/458/443	16.69	11.72	34.36
1955.5	RI=1955.1	unknown	217/147/129	0.77	1.15	0.00
1975.7	RI=1975.6	unknown	217/147/318	0.77	1.02	0.00
2032.9	gallic acid (derivative)	phenol	355/281/532	0.00	0.00	20.75

APÊNDICE III.7. RECUPERAÇÃO DE A) AÇÚCARES E B) POLIFENÓIS A PARTIR DE COLUNAS DE SÍLICA FUNCIONALIZADA C18 UTILIZANDO 1 mL DE EXTRATO.

a)

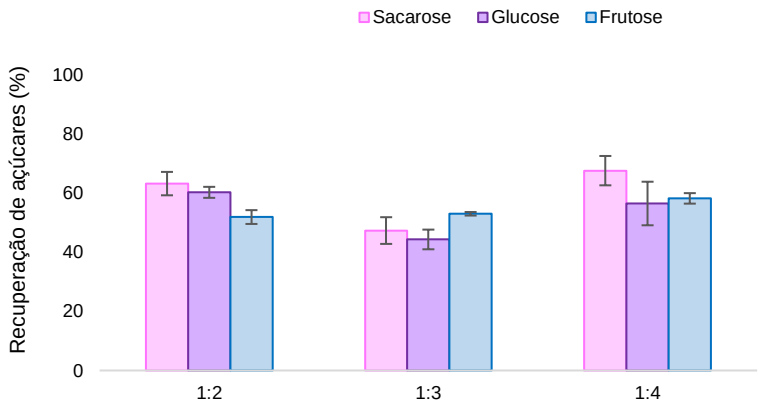


b)

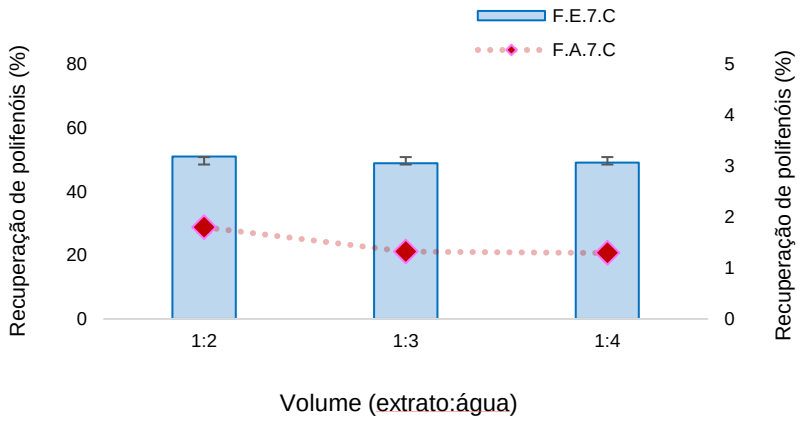


APÊNDICE III.8. RECUPERAÇÃO DE A) AÇÚCARES E B) POLIFENÓIS A PARTIR DE COLUNAS DE SÍLICA FUNCIONALIZADA C18 UTILIZANDO 1,5 mL DE EXTRATO. EM QUE:F.A.7.C= FRAÇÃO AQUOSA DO EXTRATO 7 DA COLUNA C18 E F.E.7.C= FRAÇÃO ETANÓLICA DO EXTRATO 7 DA COLUNA C18.

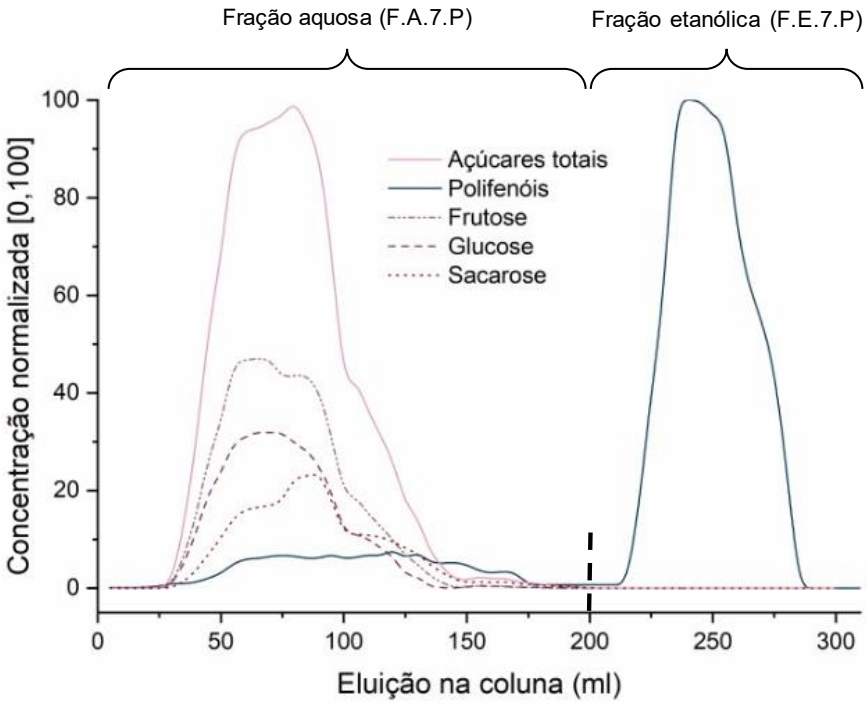
a)



b)

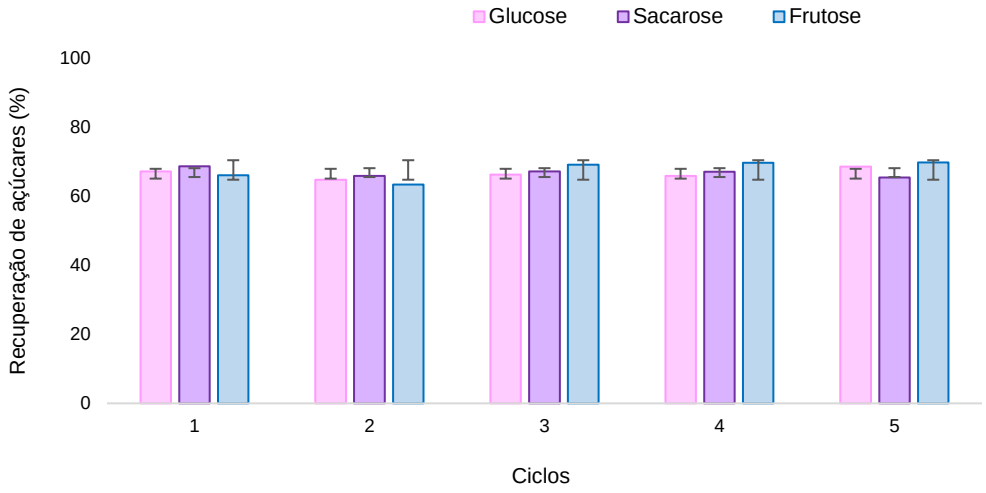


APÊNDICE III.9. PERFIL DE SAÍDA DOS COMPOSTOS NA COLUNA K29, VOLUME MORTO DA COLUNA REALIZADOS EM UMA COLUNA COM 20 cm DE ALTURA E VOLUME DE RESINA DE 100 mm^3. EM QUE:F.A.7.P= FRAÇÃO AQUOSA DO EXTRATO 7 DA COLUNA K29 E F.E.7.P= FRAÇÃO ETANÓLICA DO EXTRATO 7 DA COLUNA K29.

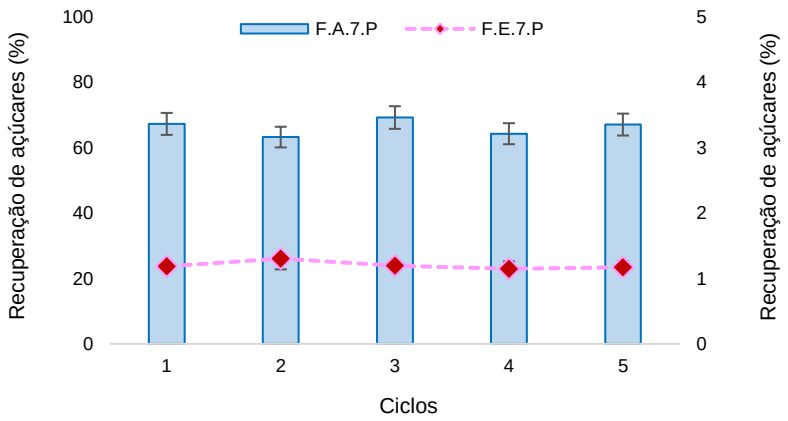


APÊNDICE III.10. RECUPERAÇÃO DE A) AÇÚCARES B) AÇÚCARES TOTAIS E C) POLIFENÓIS PARA CINCO CICLOS DE REUTILIZAÇÃO DA RESINA K29 REALIZADOS EM UMA COLUNA COM 20 cm DE ALTURA E VOLUME DE RESINA DE 100 mm^3. EM QUE:F.A.7.P= FRAÇÃO AQUOSA DO EXTRATO 7 DA COLUNA K29 E F.E.7.P= FRAÇÃO ETANÓLICA DO EXTRATO 7 DA COLUNA K29.

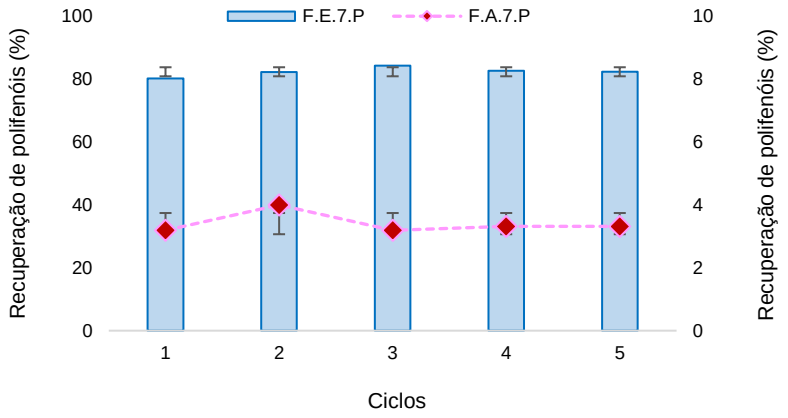
a)



b)



c)



APÊNDICE III.11 – ANÁLISE SIMPLIFICADA DE CUSTO DOS MATERIAIS ADSORVENTES UTILIZADOS NA SEPARAÇÃO DO EXTRATO.

	K29	**C18**
Custo	39,5 $/L*	175,6 $/Kg*
Volume de trabalho	40,0 mL	1,0 mL
Material adsorvente	72,4 mL	0,5 g
Polifenóis totais (g L^{-1})	14,1	12,4
Açúcares totais (g L^{-1})	4,9	7,1
	5080 $/ Kg polifenóis	**7070 $/ Kg polifenóis**
	14500 $/ Kg açúcares	**12350 $/ Kg açúcares**

Em que: Custo dos materiais adsorventes utilizados para separação de compostos foram obtidos por meio de cotação com as empresas.

APÊNDICE III.12. COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR SPYT-GC-MS E QUANTIDADE (µg mg^{-1}) PRESENTES NAS FRAÇÕES ETANOICAS DAS COLUNAS.

RI	**Identificação**	**Classe**	**m/z**			**F.E.7.P**	**F.E.7.C**
			(1)	**(2)**	**(3)**		
1535.0	1,2,3 - trihidroxibenzeno	Tanino/ Carboidrato	342	327	239	0.03	0.02
1639.0	1.3.5 - trihidroxibenzeno	Tanino	342	327	268	0.02	0.01
1833.6	4 - (hidroxivinil) - 1,2 - dihidroxibenzeno (cis)	Tanino	368	265	191	0.01	0.01
1875.7	4 - (hidroxivinil) - 1,2 - dihidroxibenzeno (trans)	Tanino	368	265	191	0.01	0.01
1950.6	ácido gálico	Tanino	458	443	281	0.80	0.57
1990.0	4 - (hidroxivinil) - 1,2,3 - trihidroxibenzeno (cis)	Tanino	456	368	353	0.01	0.00
2011.1	4 - (hidroxivinil) - 1,2,3 - trihidroxibenzeno (trans)	Tanino	456	368	353	0.01	0.00
2020.0	ácido gálico (derivatizado) I	Tanino	532	355	281	0.00	0.00
2032.9	ácido gálico (derivatizado) II	Tanino	532	355	281	0.05	0.04
	TOTAL					0.95	0.67