



**Guilherme António
da Silva Vilas Boas
Barros**

**Biocompostos extraídos de fontes naturais com
benefícios para a saúde**

**Biocompounds extracted from natural sources with
benefits to health**



**Guilherme António
da Silva Vilas Boas
Barros**

Biocompostos extraídos de fontes naturais com benefícios para a saúde

Biocompounds extracted from natural sources with benefits to health

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria da Conceição Ferreira, Investigadora do Departamento de Química, CICECO, da Universidade de Aveiro e coorientação de Professor Doutor João Manuel da Costa Araújo Pereira Coutinho, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Aos meus pais por tudo o que me ensinaram e fizeram para que esta minha
etapa fosse possível

o júri

Presidente

Prof. Dr^a. Maria Inês Purcell de Portugal Branco
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Dr^a. Maria Olga de Amorim e Sá Ferreira
Professora Adjunta do Departamento de Tecnologia Química e Biológica do Instituto
Politécnico de Bragança

Dr^a. Ana Maria da Conceição Ferreira
Investigadora do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

A realização da dissertação foi o culminar do meu percurso académico e gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento a todas as pessoas que me ajudaram a concretizar esta etapa.

Em primeiro lugar quero agradecer do fundo do meu coração aos meus pais e ao meu irmão por tudo o que fizeram por mim, por todo o apoio e suporte que me deram para conquistar esta meta. Sem vocês nada disto seria possível. Espero ter-vos enchido de orgulho!

Um enorme obrigado à Ana Maria por toda a disponibilidade, ajuda e paciência que teve comigo em todas as fases da dissertação.

Ao professor doutor João Coutinho por todo o feedback que me deu.

Um agradecimento especial à Sandra por todo o apoio e força que me deu ao longo destes meses. Obrigado por toda a tua compreensão e presença, tanto nos bons momentos como nos momentos mais complicados.

Aos meus amigos por me fazerem um bocadinho do que sou hoje e por todos os momentos que vivemos juntos que jamais serão esquecidos.

Por fim, é com um sentimento de saudade, mas acima de tudo de dever cumprido, que me despeço destes fantásticos e enriquecedores anos, onde cresci tanto a nível académico como a nível pessoal. Todos os momentos vividos na Universidade de Aveiro nunca serão esquecidos e posso afirmar que foram dos mais felizes da minha vida!

Palavras-chave

Extração sólido-líquido, biomassa, casca de banana, biocompostos, ácidos orgânicos, otimização do processo.

Resumo

O objetivo desta dissertação recai sob o estudo de ácidos orgânicos como solventes alternativos para extração de compostos de valor acrescentado a partir de biomassa. Em particular, estudou-se a utilização de ácidos orgânicos e suas misturas aquosas na extração de dopamina e de rutina a partir de cascas de banana. O interesse na extração destes compostos deve-se às suas propriedades antioxidantes, antibacterianas e anticancerígenas, e ao seu consequente interesse pelas indústrias alimentar e farmacêutica. De salientar ainda, que as cascas da banana são um produto residual sem valor associado, constituindo assim uma matéria-prima praticamente sem custos e com um enorme potencial de biocompostos de valor acrescentado passíveis de serem extraídos. Para tal, efetuaram-se extrações do tipo sólido-líquido a partir de cascas de banana utilizando diferentes ácidos orgânicos e diferentes condições de extração, com o intuito de se verificar quais as melhores condições processuais, nomeadamente a maturação da banana, a temperatura de extração, o tempo de extração e a razão sólido-líquido, assim como o solvente (ácido orgânico) mais eficiente.

Começou-se por estudar a extração da dopamina, constatando-se que a casca da banana verde foi a que apresentou uma maior quantidade de dopamina das três maturações em estudo. Posto isto, verificou-se que a mistura aquosa de ácido cítrico 50 (m/m) % foi a mais eficiente na extração de dopamina, obtendo-se 57,9 mg/100 g de peso seco de biomassa (PS) de dopamina.

Em relação à extração da rutina, ao contrário do que se verificou com a dopamina, a casca de banana madura mostrou ser a mais rica neste biocomposto. Já em relação ao efeito dos ácidos orgânicos na extração da rutina, o ácido acético a 65 (m/m) % foi o mais eficiente, conseguindo-se extrair cerca de 200 mg/100 g PS de rutina. Posto isto, otimizou-se as condições de extração através de um planeamento experimental, sendo que para uma temperatura de 25 °C, com um tempo de extração de 80 minutos e uma razão sólido-líquido de 0,06, conseguiu-se obter 238,5 mg/100 g PS de rutina. Para além disso, a recuperação e reutilização do solvente de extração também foram verificadas, contribuindo assim para o desenvolvimento de um processo sustentável.

Em suma, esta dissertação demonstra que as misturas aquosas de ácidos orgânicos têm potencial para substituir os solventes orgânicos convencionais na extração de biocompostos a partir de fontes naturais, contribuindo assim para o desenvolvimento processos de extração mais eficientes e sustentáveis.

Keywords

Solid-liquid extraction, biomass, banana peel, biocompounds, organic acids, process optimization.

Abstract

The objective of this dissertation consists on the study of organic acids as alternative solvents for the extraction of added-value compounds from biomass. More specifically, organic acids and their aqueous mixtures were used to extract dopamine and rutin from banana peels. These compounds display important properties such as antioxidant, antibacterial and anticancer, that are relevant in food and pharmaceutical industries, and banana peels are a waste product without commercial value, being thus a raw material with virtually no cost and with a huge potential of value-added compounds able to be extracted. To this end, solid-liquid extractions were realized from banana peels using different organic acids and different extraction conditions, in order to verify which conditions are the best, namely banana ripening, extraction temperature, extraction time, solid-liquid ratio, and solvent used.

Firstly, it was studied the dopamine extraction from peels with bananas of ripening different, verifying that the green banana peels were the richest in dopamine of the three maturations under study. Then, different organic acids and corresponding aqueous mixtures were used to extract dopamine, where aqueous mixture of citric acid 50 (w/w) % was the most effective, obtaining 57.9 mg/100 g of dry weight of biomass (PS) of dopamine.

Regarding the rutin extraction, unlike what happened with dopamine, ripe banana peels proven to be more abundant in this biocompound. From all the organic acids used for the extraction of rutin, the aqueous mixture of acetic acid at 65 (w/w) % was the most efficient, being able to extract about 200 mg/100 g PS of rutin. Moreover, the extraction conditions were optimized through experimental planning. The optimal parameters for the extraction are a temperature of 25 °C, with an extraction time of 80 minutes and a solid-liquid ratio of 0.06, translating in 238.5 mg/100 g PS of rutin extracted. In addition, the capability to recover and reuse the extraction solvent were also verified, contributing for the development of a sustainable process.

In summary, this dissertation demonstrates that aqueous mixtures of organic acids have a potential to substitute the conventional organic solvents in the extraction of biocompounds from natural sources, thus contributing to the development of more efficient and sustainable extractive processes.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Objetivos e contextualização	1
1.2. Resíduos alimentares e o seu papel na economia circular	2
1.3. A Banana e a sua casca.....	4
1.3.1. Dopamina.....	5
1.3.2. Rutina.....	7
1.4. Processo de Extração	9
1.4.1. Solventes convencionais vs. solventes alternativos	10
2. Material e Procedimento Experimental	13
2.1. Material.....	13
2.2. Procedimento experimental	13
2.2.1. Extração sólido-líquido dos compostos de interesse (dopamina e rutina)	13
2.2.2. Quantificação dos compostos de interesse (dopamina e rutina).....	15
2.2.3. Otimização das condições de extração através do planeamento experimental.....	16
2.2.4. Atividade antioxidante dos extratos.....	18
2.2.5. Reutilização da biomassa & Saturação e reciclabilidade do solvente	19
3. Discussão de Resultados	21
3.1. Dopamina	21
3.1.1. Efeito da maturação da banana.....	21
3.1.2. Influência de diferentes solventes no processo de extração	22
3.1.3. Efeito do tempo de armazenamento	25
3.1.4. Conclusões	26
3.2. Rutina	27

3.2.1. Efeito da maturação da banana.....	27
3.2.2. Efeito do tempo de armazenamento	28
3.2.3. Influência de diferentes solventes no processo de extração	29
3.2.4. Otimização das condições de extração através do planeamento experimental.....	33
3.2.5. Atividade antioxidante dos extratos.....	36
3.2.6. Reutilização da biomassa & Saturação e reciclabilidade do solvente	37
3.2.7. Conclusões	41
4. Conclusões e trabalho futuro	43
5. Referências.....	45
Apêndice A – Procedimento experimental.....	49
Otimização das condições de extração através do planeamento experimental ...	49
Apêndice B – Dados experimentais da extração de dopamina.....	51
Extração sólido-líquido.....	51
Apêndice C – Dados experimentais da extração de rutina.....	55
Extração sólido-líquido.....	55
Otimização das condições de extração através do planeamento experimental ...	57
Atividade antioxidante dos extratos	62
Reutilização da biomassa e reciclabilidade do solvente	62

Lista de Figuras

Figura 1- Representação do desperdício alimentar nas várias zonas mundiais, adaptado de [1].....	3
Figura 2- Representação gráfica dos diferentes tipos de alimentos desperdiçados mundialmente [1].....	3
Figura 3- Estrutura química da dopamina.....	5
Figura 4- Estrutura química da rutina.	7
Figura 5- Equipamento Carousel Radleys Tech utilizado na extração sólido-líquido. ...	14
Figura 6- Representação gráfica da influência dos três estados de maturação da banana no processo de extração de dopamina. Casca da banana: (■) verde, (■) semi-madura e (■) madura. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C e razão S/L=0,1, utilizando metanol puro ou uma mistura de metanol com água (m/m) % como solvente de extração.	21
Figura 7- Representação gráfica da influência da utilização de diferentes ácidos orgânicos na extração de dopamina a partir da casca de banana verde: (■) ácido acético, (■) ácido glicólico, (■) ácido láctico e (■) ácido cítrico. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; razão S/L=0,1, utilizando solvente puro ou a sua mistura aquosa (m/m) %. ...	23
Figura 8- Representação gráfica da degradação da dopamina ao longo do tempo utilizando casca de banana verde no seu processo de extração. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; razão S/L=0,1, utilizando metanol puro.	25
Figura 10- Representação gráfica da influência dos três estados de maturação da banana no processo de extração de dopamina. Casca da banana: (■) verde, (■) semi-madura e (■) madura. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C e razão S/L=0,1, utilizando metanol puro ou uma mistura de metanol com água (m/m) % como solvente de extração.	27
Figura 11- Representação gráfica da degradação da rutina ao longo do tempo utilizando casca de banana madura no seu processo de extração. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; razão S/L=0,1, utilizando metanol puro.	29

Figura 12- Representação gráfica da influência da utilização de diferentes ácidos orgânicos na extração de dopamina a partir da casca de banana verde: (■) ácido acético, (■) ácido cítrico, (■) ácido lático e (■) ácido glicólico. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; razão S/L=0,1, utilizando solvente puro ou a sua mistura com água (m/m %).	30
Figura 13- Representação gráfica da otimização da concentração do ácido acético, utilizando casca de banana madura, no processo de extração de rutina. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; razão S/L=0,1, utilizando ácido acético puro ou uma mistura de ácido acético com água (m/m) %	32
Figura 14- Gráficos de superfície de resposta (esquerda) e gráficos de contorno (direita) relativos ao teor de rutina extraído utilizando uma mistura aquosa de +ácido acético a 65 (m/m) % com os efeitos combinados de: (i) razão S/L e temperatura (T, °C); (ii) tempo (t, min) e temperatura (T, °C); e (iii) razão S/L e tempo (t, min).	34
Figura 15- Representação gráfica da otimização das condições do processo de extração de rutina a partir da casca de banana madura, utilizando ácido acético a 65(m/m) %. Condições de extração: T=25 °C; razão S/L=0,06.	35
Figura 16- Representação gráfica da atividade antioxidante no processo de extração de rutina a partir da casca de banana madura com a utilização de diferentes solventes: (■) ácido acético 65 %, (■) etanol, (■) metanol e (■) água. Condições de extração: T=25 °C; razão S/L=0,06.	37
Figura 17- Representação gráfica do teor de rutina extraído de casca de banana madura com a reutilização de (i) biomassa e de (ii) solvente nas condições de extração otimizadas, utilizando uma solução aquosa de ácido acético 65 (m/m) %: T=25 °C; razão S/L=0,06.	38
Figura 18- Representação gráfica do teor de rutina correspondente aos extratos obtidos em cada ciclo de reciclabilidade, utilizando as condições de extração otimizadas: T=25 °C; razão S/L=0,06.	39
Figura 19- Representação esquemática do processo de extração de rutina de casca de banana.	40

Figura B.1- Representação gráfica da influência da utilização de diferentes solventes utilizados no processo de extração de dopamina a partir da casca de banana verde utilizando solventes orgânicos e água. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; S/L R=0,1, utilizando solventes puros.....	53
Figura C.1- Representação gráfica da influência da utilização de diferentes solventes utilizados no processo de extração de rutina a partir da casca de banana madura utilizando solventes orgânicos e água. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; S/L R=0,1, utilizando solventes puros.....	57
Figura C.2- Diagrama de Pareto do planejamento experimental relativo à influência das variáveis independentes (tempo, temperatura e razão sólido/líquido) no processo de extração de rutina a partir de casca de banana madura, utilizando ácido acético 65 (m/m) % como solvente.	60
Figura C.3- Valores observados vs valores previstos.	60
Figura C.4- Distribuição de resíduos.....	61

Lista de Tabelas

Tabela 1- Teor de Dopamina extraído, em peso seco (PS), de diferentes fontes e os seus respectivos solventes.	6
Tabela 2- Teor de Rutina extraído de diferentes fontes e os seus respectivos solventes.	9
Tabela 3- Lista de compostos utilizados no trabalho experimental, juntamente com seu número CAS, marca e pureza.	13
Tabela 4- Lista de solventes utilizados na extração sólido-líquido, e respectivas estruturas químicas e concentrações mássicas (m/m %). ✓ solvente preparado; × solvente sólido, não foi possível a sua preparação; --- solvente não preparado.	15
Tabela 5- Extrações referentes ao planeamento experimental com as suas respectivas condições de temperatura, tempo e razão.	17
Tabela 6- Condições de extração referentes à determinação das condições ótimas de extração de rutina a partir da casca de banana madura, utilizando o ácido acético (m/m) % como solvente.	18
Tabela A.1- Níveis codificados das variáveis independentes utilizadas no planeamento fatorial.	49
Tabela A.2- Planeamento Fatorial.	49
Tabela B.1- Valores obtidos de teor de dopamina extraída a partir de três tipos de maturação de casca de banana, utilizando metanol a várias concentrações e respetivos desvios padrão. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; S/L R=0,1.	51
Tabela B.2- Valores obtidos de teor de dopamina extraída a partir da casca de banana verde, utilizando vários solventes a diferentes concentrações e respetivos desvios padrão. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; S/L R=0,1.	52
Tabela B.3- Valores obtidos de teor de dopamina extraída a partir da mesma biomassa de casca de banana verde ao longo do tempo, utilizando metanol puro e respetivos desvios padrão. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; S/L R=0,1.	53
Tabela C.1- Valores obtidos de teor de rutina extraída a partir de três tipos de maturação de casca de banana, utilizando metanol a várias concentrações e respetivos desvios padrão. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; S/L R=0,1.	55

Tabela C.2- Valores obtidos de teor de rutina extraída a partir da mesma biomassa de casca de banana madura ao longo do tempo, utilizando metanol puro e respectivos desvios padrão. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; S/L R=0,1.	55
Tabela C.3- Valores obtidos de teor de rutina extraída a partir da casca de banana madura, utilizando vários solventes a diferentes concentrações e respectivos desvios padrão. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; S/L R=0,1.	56
Tabela C.4- Valores obtidos de teor de rutina extraída a partir da casca de banana madura, utilizando ácido acético a diferentes concentrações e desvios padrão. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; S/L R=0,1.	57
Tabela C.5- Valores obtidos de teor de rutina extraída a partir da casca de banana madura, utilizando ácido acético a 65 (m/m) % e as respectivas condições de extração.	58
Tabela C.6- Coeficientes de regressão do modelo polinomial de segunda ordem previsto para o rendimento de extração de rutina obtido a partir do planejamento experimental.	59
Tabela C.7- Tabela da ANOVA para o planejamento fatorial 2 ³	59
Tabela C.8- Valores obtidos de teor de rutina extraída a partir da casca de banana madura, utilizando ácido acético a 65 (m/m) % e respectivos desvios padrão.....	61
Tabela C.9- Valores obtidos de atividade antioxidante extraída a partir da casca de banana madura, utilizando diferentes solventes com dois tempos de extração às condições ótimas de extração: T=25 °C; S/L R=0,06.	62
Tabela C.10- Valores obtidos de teor de rutina extraída a partir da casca de banana madura, utilizando ácido a acético 65 (m/m) % referente à recirculação da biomassa. Condições de extração: t=80 min; T=25 °C; S/L R=0,06.	62
Tabela C.11- Valores obtidos de teor de rutina extraída a partir da casca de banana madura, utilizando ácido acético a 65 (m/m) % referente à reciclabilidade do solvente. Condições de extração: t=80 min; T=25 °C; S/L R=0,06.	62

Lista de Símbolos

%AA	percentagem de redução de DPPH
Abs_{amostra}	absorbância da amostra
Abs_{branco}	absorbância do branco
k	número de fatores contribuintes para a obtenção da resposta final
<i>m_{biomassa seca}</i>	massa da casca da banana seca (g)
<i>m_{biomassa inicial}</i>	massa pesada no primeiro dia de estufa (g)
<i>m_{biomassa final}</i>	massa pesada no último dia de estufa (g)
<i>m_{H₂O}</i>	massa de água (g)
<i>y</i>	resposta final
<i>α</i>	distância entre os pontos axiais e o ponto central

Lista de Abreviaturas

DaT	scan de transporte de dopamina
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazil
dez	dezembro
DP	doença de Parkinson
FAO	organização das nações unidas para a alimentação e agricultura
g	gramas
H₂O	molécula de água
jan	janeiro
L	litros
mg	miligramas
min	minutos
mL	mililitros
nm	nanómetros
nov	novembro
PS	peso seco
rpm	rotações por minuto
RSM	metodologia de superfície de resposta
razão S/L	razão sólido/líquido
t	tempo (min)
T	temperatura (°C)
TE	trolox
µL	microlitros

1. Introdução

1.1. Objetivos e contextualização

Atualmente, a sustentabilidade dos processos e os desperdícios alimentares têm sido temas de grande destaque na nossa sociedade, devido à escassez dos recursos naturais e à rapidez com que estes têm vindo a ser consumidos nas últimas décadas. A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) estimou, em 2019, que cerca de um terço dos alimentos produzidos mundialmente são desperdiçados, sendo o grupo das frutas e dos vegetais um dos que mais se destaca [1]. Contudo, há que ter em conta que grande parte dos resíduos gerados pela indústria agroalimentar são uma fonte de compostos de valor acrescentado, compostos estes que podem apresentar desde propriedades anticancerígenas a antimicrobianas, antioxidantes, analgésicas, entre outras. Assim, porque não utilizar os resíduos alimentares como uma fonte de biocompostos, contribuindo desta forma para a valorização das matérias-primas numa perspetiva de biorrefinaria integrada e de economia circular [2].

A banana é um dos alimentos mais consumidos em todo o mundo [3], sendo que a sua casca é, na maior parte das vezes descartada. No entanto, a casca da banana tem na sua composição vários biocompostos com benefícios para a saúde humana como a dopamina e a rutina [4]. Mais concretamente, a dopamina está diretamente relacionada com a atenuação dos sintomas da doença de Parkinson, assim como ao nosso bom-humor, contribuindo também para o tratamento de depressões [5]. Por outro lado, a rutina tem propriedades antioxidantes, antibacterianas e anticancerígenas [6]. Desta forma, a casca da banana é um exemplo de uma oportunidade de converter um produto descartável num produto de valor acrescentado.

No entanto, os processos de extração de biocompostos utilizados apresentam algumas desvantagens, como por exemplo baixa eficiência e seletividade, serem morosos, estarem associados a gastos de energia elevados, e em alguns casos poderem levar à degradação dos compostos extraídos. Adicionalmente, os métodos convencionais envolvem habitualmente a utilização de elevadas quantidades de solventes orgânicos voláteis, o que levanta preocupações ambientais e a nível do impacto/efeito na saúde de animais e humanos [7]. Tradicionalmente, as abordagens

referentes à extração de dopamina e de rutina a partir da biomassa de casca de banana englobam extrações sólido-líquido com a utilização de solventes orgânicos, como por exemplo o metanol [8, 9]. Desta forma, há a necessidade de encontrar processos de extração e solventes mais eficientes, de baixo custo e mais sustentáveis.

Assim, o principal objetivo desta dissertação é a extração de dopamina e de rutina da casca da banana, utilizando ácidos orgânicos, tanto puros como na forma de misturas aquosas. Para tal, começou-se por estudar qual a maturação da casca de banana mais indicada para se obter o máximo de cada composto pretendido, assim como o solvente mais eficiente para a sua extração. Posto isto, as condições de extração foram otimizadas, nomeadamente, a temperatura, o tempo de extração e a razão sólido-líquido entre a biomassa e o solvente, através de um planeamento experimental, finalizando-se com o estudo de recuperação e reutilização do solvente de extração otimizado.

Em suma, esta dissertação procura contribuir para o desenvolvimento de processos de extração sustentáveis e de baixo custo de compostos de valor acrescentado de resíduos da indústria alimentar, procurando assim responder aos objetivos da agenda 2020 das Nações Unidas na procura de processos mais sustentáveis [10].

1.2. Resíduos alimentares e o seu papel na economia circular

Os resíduos/desperdícios alimentares são um problema a nível mundial da sociedade moderna (Figura 1). Mais concretamente, cerca de um terço dos alimentos produzidos por todo o mundo são desperdiçados anualmente segundo a organização das nações unidas para a alimentação e agricultura (FAO) [1]. Contudo, os resíduos alimentares são ricos em compostos de valor acrescentado, isto é, em compostos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, anticancerígenas que têm interesse para as indústrias alimentar, farmacêutica entre outras [6, 10]. Assim, a extração destes compostos de valor acrescentado pode contribuir para a valorização das matérias-primas (resíduos alimentares) numa perspetiva integrada de biorrefinaria, e consequentemente de economia circular. Sendo assim, a extração de biocompostos de resíduos alimentares pode ser uma solução sustentável para a valorização dos mesmos, aumentando assim a eficiência do uso dos recursos naturais. Para além disso, há ainda

que ter em conta que a produção dos alimentos implica gastos energéticos consideráveis, sendo que os desperdícios alimentares representam cerca de 10 % da energia utilizada a nível mundial [1]. Assim a valorização destes resíduos é de extrema importância.

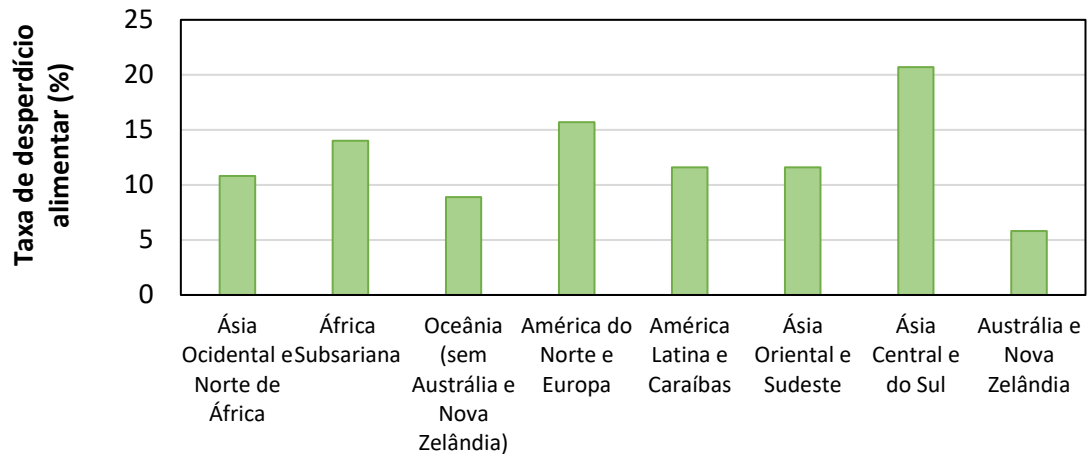


Figura 1- Representação do desperdício alimentar nas várias zonas mundiais, adaptado de [1].

Nesse sentido, há que entender primeiro qual é o resíduo alimentar mais abundante, sendo que o grupo das frutas e dos vegetais é o mais significativo, quando conhecida a origem do desperdício alimentar, representando cerca de 22 % dos resíduos alimentares [1], como se pode verificar na Figura 2. Sendo que no grupo das frutas, a banana aparece como uma das favoritas a nível mundial, sendo a quarta cultura alimentar mais importante do mundo [11, 12].

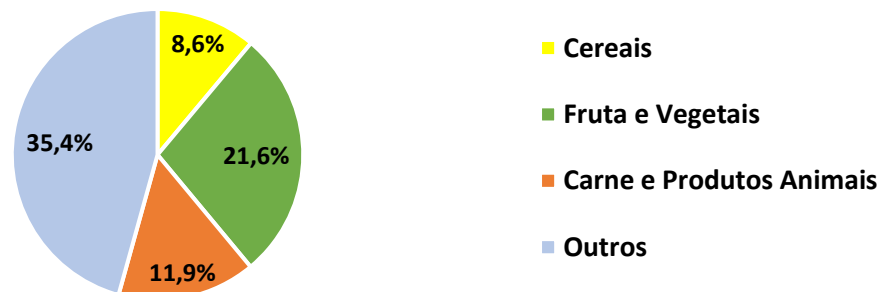


Figura 2- Representação gráfica dos diferentes tipos de alimentos desperdiçados mundialmente [1].

1.3. A Banana e a sua casca

Banana é o nome comum para a fruta herbácea, nativa da região tropical do sudeste asiático, pertencente à família Musaceae e género *Musa* [5]. Cerca de 170 países estão envolvidos na sua produção, com uma produção anual de mais de 100 milhões de toneladas de banana [5]. Os principais produtores de banana são atualmente a Índia, China, Uganda, Brasil, Equador e Filipinas [13]. Portugal (Madeira) também é um produtor, mas em menor escala, produzindo cerca de 25 mil toneladas por ano [13], sendo que mais de 60% da banana pertence à espécie *Dwarf Cavendish* [14].

A banana é considerada um alimento base para a vida humana, já que fornece energia ao corpo humano, devido à composição elevada em hidratos de carbonos, além de ser rica em fibras, minerais e vitaminas [15]. Esta é uma fonte chave em variadíssimos compostos, como por exemplo dopamina, rutina, naringina, serotina, tiramina, putrescina, espermidina, espermina e histamina [16, 17].

Para além disso, há que ter em conta que a casca de banana representa 40 % do peso total da banana fresca [11] e, assim como a banana, a sua casca também é rica em compostos de valor acrescentado [15]. Contudo, a casca da banana, tal como uma boa parte dos resíduos alimentares, é um subproduto que não é atualmente valorizado, sendo na maioria das vezes descartada como lixo apesar de ser uma fonte chave de biocompostos que apresentam benefícios para a saúde humana.

Há ainda que ter em conta que a composição da banana, assim como da sua casca, pode variar de acordo com a espécie, localização e meio ambiente de produção, assim como com o estado de maturação [16]. Sendo que, de todos os fatores que podem influenciar a composição da banana e da sua casca, o que mais se destaca é o da maturação, já que à medida que ocorre o amadurecimento há mudanças não só na composição bioquímica, mas também a nível da cor, textura, sabor e aroma [16]. Assim, quando se pretende fazer a extração de compostos da banana ou da sua casca, torna-se necessário verificar em qual dos estados de maturação o composto de interesse se encontra em maior quantidade [16].

1.3.1. Dopamina

A dopamina (Figura 3), quimicamente conhecida como 4-(2-aminoetil)-benzeno-1,2-diol, é um neurotransmissor crucial no sistema nervoso. Mais concretamente, a dopamina tem influência sobre os processos cerebrais responsáveis pelo controlo do movimento emocional, e pela capacidade de experienciar sentimentos de dor e prazer [5]. Além disso, esta também desempenha um papel relevante ao nível do funcionamento dos sistemas cardiovascular, hormonal e renal [19]. Por exemplo, a dopamina em conjunto com a noradrenalina, leva a um aumento dos níveis energéticos corporais, elevando a respiração mitocondrial e causando um bom humor e uma motivação acrescida [5], apresentando resultados similares aos de antidepressivos [5].

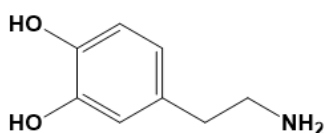


Figura 3- Estrutura química da dopamina

A carência de dopamina pode levar a doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson [20]. Esta é uma das doenças neurodegenerativas mais comuns no mundo, com um risco de vida estimado entre 3-7 % [20]. Entre 1990 e 2016, houve um crescimento de 2,5 milhões para 6,1 milhões de pacientes, sendo que este valor tem tendência a aumentar [20]. Os sintomas característicos desta doença são a combinação de rigidez muscular, tremores, instabilidade na postura e a demora de respostas físicas e psíquicas [18, 21]. Em circunstâncias onde o tremor é o sintoma clínico mais evidente, um scan transportador de dopamina (DaT) pode ajudar na formulação de um diagnóstico [20], sendo que os recetores de dopamina no cérebro são os alvos principais no tratamento médico da doença de Parkinson [22].

Estudos realizados sobre a extração da dopamina

Nos últimos anos, tem-se observado um interesse pelo estudo da extração de dopamina a partir de biomassa, sendo que na Tabela 1 encontram-se alguns dos exemplos encontrados na literatura sobre este tema.

Tabela 1- Teor de Dopamina extraído, em peso seco (PS), de diferentes fontes e os seus respectivos solventes.

Biomassa	Espécie	Solvente	Condições de extração	Teor Dopamina (mg/100g PS)	Ref.
Banana Verde ¹	Grand Naine	Metanol	55 °C; 120 min	381	[8]
Banana Verde ¹	Gruesa	Metanol	55 °C; 120 min	339	[8]
Banana Verde ¹	Grande Naine	Etanol	55 °C; 120 min	204	[8]
Banana Verde ¹	Gruesa	Etanol	55 °C; 120 min	166	[8]
Banana Verde ¹	Grande Naine	Acetona	55 °C; 120 min	120	[8]
Banana Verde ¹	Gruesa	Acetona	55 °C; 120 min	101	[8]
Banana Verde ¹	Grande Naine	Metanol-Água 1:1 (v/v)	55 °C; 1 min	167	[8]
Banana Verde ¹	Gruesa	Metanol-Água 1:1 (v/v)	55 °C; 1 min	158	[8]
Banana Verde ¹	Grand Naine	Etanol-Água 1:1 (v/v)	55 °C; 1 min	217	[8]
Banana Verde ¹	Gruesa	Etanol-Água 1:1 (v/v)	55 °C; 120 min	239	[8]
Banana Verde ¹	Grande Naine	Acetona	20°C; 10 min	1200	[23]
Banana Semi-madura ¹	Grand Naine	Acetona	20°C; 10 min	500	[23]
Banana Madura ¹	Grand Naine	Acetona	20°C; 10 min	700	[23]
Batata ²	Solanum tuberosum	Metanol	70 °C; 15 min	0,7	[24]

¹casca; ²folhas

Os solventes mais utilizados na extração de dopamina têm sido solventes orgânicos, nomeadamente o metanol, acetona e etanol. González-Montelongo *et al.* [8] estudou o efeito dos diferentes solventes orgânicos na extração de dopamina, sendo que verificou que o solvente mais eficaz na sua extração foi o metanol. Tendo em conta os resultados obtidos por Bonnet *et al.* a acetona também parece ser uma boa opção, apesar que neste caso o autor não fez comparação entre os vários solventes.

Para além disso, a casca de banana tem sido uma das fontes mais exploradas, como se pode observar pela Tabela 1. González-Montelongo *et al.* [8] estudaram o processo de extração de dopamina a partir de casca de banana de duas espécies diferentes, sendo

que a “Grand Naine” apresentou teores de dopamina superiores. Por sua vez, Szopa *et al.* [24] mostraram ser possível extrair dopamina a partir das folhas da batata, apesar desta biomassa apresentar um teor em dopamina bastante inferior à da casca de banana.

A maturação da casca da banana também é um aspeto significativo a ter em conta no processo de extração, como já foi referido anteriormente. Nesse sentido, Bonnet *et al.* [23] realizaram um estudo relativo à influência da maturação da casca de banana “Grand Naine” no processo extrativo de dopamina, onde foi demonstrado que a casca de banana verde apresentou praticamente o dobro de dopamina (1200 mg/100 g PS) em relação às casca de banana semi-madura (500 mg/100 g PS) e madura (750 mg/100 g PS).

1.3.2. Rutina

A rutina (Figura 4) $C_{27}H_{30}O_{16}$, é um flavonoide presente na casca da banana, sendo quimicamente um glicosídeo e também conhecida como vitamina P [6]. Este composto contém propriedades medicinais como poder antioxidante, antimicrobiano, antialérgico e antifúngico, além de que pode ser utilizada como agente protetor em certas doenças, como o cancro [6]. Assim, a rutina apresenta uma grande variedade de ações farmacológicas.

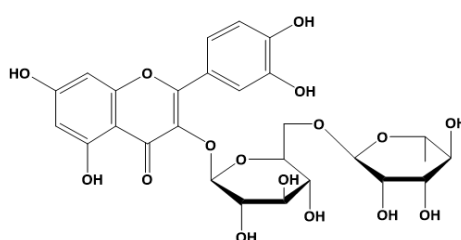


Figura 4- Estrutura química da rutina.

Por exemplo, as infeções bacterianas são uma das principais causas que levam à morte humana, uma vez que podem desenvolver várias doenças tais como pneumonia, tétano, cólera, tuberculose e infeções no sangue, sendo que estudos sobre a atividade antimicrobiana de extratos ricos em rutina sobre oito microrganismos mostraram ter a capacidade de inibir a multiplicação dos organismos em estudo [25].

Há ainda estudos que mostram que a rutina pode ajudar na luta contra diferentes tipos de cancro (redução de tumores e na luta contra as células cancerígenas), bem como no tratamento da diabetes [6]. Todas estas propriedades aqui referidas fazem da rutina um composto de grande interesse por parte da indústria farmacêutica.

Estudos realizados sobre a extração da rutina

A rutina tem sido extraída de vários frutos e plantas, não apenas da casca de banana. Na Tabela 2 encontram-se alguns exemplos encontrados na literatura. Mais concretamente, até ao momento mais de 70 espécies de plantas revelam conter rutina na sua composição [9]. Como se pode observar na Tabela 2, as quantidades de rutina extraídas variam muito com a origem da biomassa, e na maior parte dos casos os seus valores não são muito elevados.

A rutina tem sido extraída recorrendo a tecnologias convencionais (soxhlet) [9, 26, 27], assim como a tecnologias mais inovadoras, tais como, a extração assistida por ultrassom [9, 28], a extração assistida por micro-ondas [9, 29], entre outros. No caso do soxhlet, este método apresenta algumas desvantagens relacionadas com a utilização de altas temperaturas mantidas por longos períodos de tempo, bem como o seu efeito na saúde humana e no meio ambiente devido à utilização, por norma, de solventes orgânicos tóxicos [9, 27, 30]. Na maior parte dos casos as extrações de rutina têm sido feitas recorrendo a solventes orgânicos como o metanol e o etanol a diferentes concentrações [9], como se pode ver pela Tabela 2. Contudo, começam a aparecer estudos em que os autores recorrem a solventes alternativos, como por exemplo líquidos iónicos [9, 27] e solventes eutécticos profundos [9, 26, 29].

No entanto, na maior parte dos casos, a biomassa utilizada no processo de extração de rutina apresenta um pequeno teor desta mesma. Para que um processo destes a nível industrial seja viável é necessário encontrar uma fonte que seja rica neste composto, para além de que esta deve ser abundante e disponível a preços reduzidos. Nessa linha, a casca de banana parece ser uma excelente opção como fonte de rutina, visto que Behiry *et al.* [31] conseguiu extrair um valor promissor (973 mg/100 g PS) de rutina em comparação com outro tipo de fontes e, adicionalmente, Yingyuen [32] afirmou que a banana é um resíduo alimentar de enorme potencial devido ao seu custo reduzido e fácil acesso.

Tabela 2- Teor de Rutina extraído de diferentes fontes e os seus respectivos solventes.

Biomassa	Espécie	Solvente	Condições de extração	Teor de Rutina (mg/100g PS)	Ref.
Banana¹	<i>Musa</i> <i>Paradisiaca</i>	Metanol	25 °C; 3 dias	973	[31]
Uva¹	---	Etanol	60 °C; 15 min	54	[33]
Sabugueiro²	<i>Sambucus</i> <i>Nigra</i>	Etanol-Água 80:20 (v/v)	100 °C; 10 min	2,0	[34]
Azeitona³	<i>Olea Europaea</i>	Metanol	25 °C; 20 min	191	[35]
Noni²	<i>Morinda</i> <i>citrifolia</i>	Etanol	57 °C; 40 min	121	[36]
Formigueiro	<i>Myrmecodia</i> <i>pendan</i>	Etanol-Água 80:20 (v/v)	55 °C; 4 horas	0,3	[37]
Tangerina¹	<i>Camellia</i> <i>reticulata</i>	Metanol	25 °C; 10 min	29	[38]
Planta	<i>Panicum</i> <i>virgatum L.</i>	Metanol-Água 60:40 (v/v)	80 °C; 20 min	62	[39]
Planta	<i>Sophora</i> <i>japonica</i>	ChCl/ácido levulínico	55 °C; 20 min	19780	[26]
Figueira	<i>Ficus carica L.</i>	[BMIM][PF6]	25 °C; 30 min	238	[27]
Planta²	<i>Amaranthus</i> <i>Paniculatus</i>	Etanol-Água 30:70 (v/v)	188 °C; 20 min	1430	[30]

¹casca; ²flor; ³polpa; --- sem informação.

1.4. Processo de Extração

O desenvolvimento de um processo de extração eficiente e sustentável levanta alguns desafios, como a escolha da técnica de extração a utilizar, assim como do solvente de extração.

Existem diversas técnicas para o processo de extração de fontes naturais como por exemplo maceração, soxhlet, extração assistida por micro-ondas ou por ultrassom, extração acelerada por solvente e extração supercrítica [40]. Os métodos tradicionais como o soxhlet, consomem muito tempo e requerem largas quantidades de solventes [41]. Como tal, têm vindo a ser estudadas novas técnicas de extração com menor consumo de solventes, tendo um menor impacto ambiental, tal como a extração

assistida por micro-ondas e extração supercrítica. A extração assistida por micro-ondas e extração supercrítica são técnicas de extração mais rápidas e eficazes, pois possibilitam a alteração de temperaturas e/ou pressões. Estes novos procedimentos revelam grande potencial para extrair compostos de valor acrescentado a partir de biomassa [40]. Contudo requerem consumos elevados de energia.

Neste trabalho prático, a técnica de extração utilizada foi a extração sólido-líquido simples, que consiste na separação de uma mistura sólida por dissolução preferencial do componente de interesse a separar num solvente. Este tipo de extração envolve as seguintes etapas: o contacto, penetração e difusão do solvente na matriz sólida contendo o soluto desejado, seguindo-se a solubilização e transferência do soluto do meio sólido para o meio líquido [42]. Após a extração, as duas fases são separadas por centrifugação ou filtração, e a extração dá-se como finalizada. Contudo, há que ter em conta, que para se obter o componente extraído na sua forma pura será ainda necessário um segundo processo de separação.

1.4.1. Solventes convencionais vs. solventes alternativos

Atualmente tem-se verificado um aumento crescente da extração de compostos naturais com o intuito da sua aplicação em diferentes tipos de indústrias. Para além disso, procura-se que os processos de extração sejam o mais sustentáveis possíveis, seja através da escolha dos solventes ou da metodologia de extração utilizados, como já se tinha referido anteriormente.

No processo de extração a escolha correta do solvente faz toda a diferença no resultado final. Na escolha do solvente deve-se ter em conta características como a sua viscosidade, seletividade, toxicidade, temperatura de ebulição e capacidade de dissolver o soluto [43]. Nas extrações sólido-líquido, na maior parte das vezes, são utilizados solventes orgânicos como o metanol, etanol, acetona, tanto na sua forma pura como em misturas líquidas, devido à sua solubilidade e polaridade. Contudo, alguns destes solventes são voláteis e tóxicos [44], o que implica restrições a nível da sua utilização nas indústrias de cosmética, alimentar e farmacêutica.

Assim, nas últimas décadas tem-se estudado a hipótese da substituição de solventes orgânicos tóxicos por outro tipo de solventes menos prejudiciais, sendo este um dos maiores desafios para a indústria química [45]. Os solventes alternativos que mais se

têm destacado são os líquidos iônicos, os fluidos supercríticos baseados em compostos não tóxicos como o CO₂, e os solventes eutéticos profundos [46]. Para além disso, os ácidos orgânicos com baixa massa molecular, como por exemplo o ácido acético, ácido glicólico, ácido cítrico ou ácido láctico revelam ser solventes promissores relativamente à sua utilização nos processos de extração, como substituição dos solventes orgânicos tóxicos [47] e, adicionalmente, este tipo de ácidos orgânicos são autorizados pela Comissão Europeia a serem utilizados como aditivos alimentares, já que levantam preocupações toxicológicas mínimas [48].

Por outro lado, a utilização de água, ou mais concretamente de misturas aquosas, também é uma mais valia para o processo de extração, devido à sua capacidade de diminuir a viscosidade do solvente de extração, melhorando a transferência de massa e reduzindo os gastos energéticos [46, 47]. Além disso, a utilização de água no processo de extração ainda tem a seu favor o facto de esta ser considerada um solvente verde e de baixo custo, que para além de contribuir para o desenvolvimento de um processo de extração mais sustentável, também contribui para aumentar a seletividade do solvente para os produtos químicos alvo [49].

2. Material e Procedimento Experimental

2.1. Material

As bananas da Madeira foram adquiridas com três maturações diferentes, em mercados locais: verde, semi-madura e madura. As cascas das bananas foram retiradas e posteriormente congeladas. Antes da extração, as cascas da banana da maturação em estudo foram descongeladas, imersas em azoto líquido e trituradas num moinho de café até se obter um “pó”. Os compostos químicos utilizados neste trabalho encontram-se resumidos na Tabela 3, particularmente a marca, a pureza em percentagem mássica e o número CAS. A água utilizada em todos as experiências foi água ultra-pura, destilada duas vezes, passada por um sistema de osmose reversa e tratada com um dispositivo de purificação de água *Milli-Q plus* 185.

Tabela 3- Lista de compostos utilizados no trabalho experimental, juntamente com seu número CAS, marca e pureza.

Composto	Marca	Pureza (%)	CAS
Ácido acético	Fisher Chemical	99,0	64-19-7
Ácido cítrico	Panreac	99,5	77-92-9
Ácido glicólico	Sigma-Aldrich	99,0	79-14-1
Ácido láctico	Riedel de Haen	90,0	79-33-4
Metanol	Fisher	99,0	67-56-1
Etanol	Fisher	99,0	64-17-5
Dopamina	Sigma	99,0	62-31-7
Rutina	Alfa Aesar	97,0	250249-75-3
DPPH	Sigma-Aldrich	100	1898-66-4

2.2. Procedimento experimental

2.2.1. Extração sólido-líquido dos compostos de interesse (dopamina e rutina)

As extrações sólido-líquido dos compostos de interesse de cascas da banana foram realizadas num Carousel Radleys Tech como indicado na Figura 5, já que este equipamento permite manter a temperatura e agitação constante. As extrações foram realizadas durante 60 minutos (tempo de extração, t), à temperatura (T) de $25 \pm 0,5$ °C,


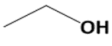

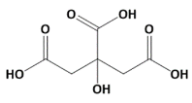
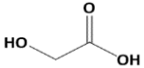
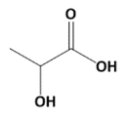

com agitação constante a 300 rpm. As misturas foram preparadas numa balança com incerteza de $\pm 10^{-4}$ g, a uma razão sólido-líquido (massa do solvente por massa da casca da banana, razão S/L) de 0,1.

A Tabela 4 mostra os solventes utilizados no estudo da extração de dopamina e de rutina da casca da banana. Foram utilizados solventes puros ou em misturas aquosas preparadas em massa. No caso do ácido cítrico e do ácido glicólico não foi possível utilizá-los puros já que estes ácidos são sólidos à temperatura ambiente. Para efeitos de comparação, também foram realizadas extrações com os solventes convencionais, mais concretamente com o metanol, etanol e também com água e água acidificada a $\text{pH} \approx 3$ através da adição de ácido clorídrico a 1M. Note-se que, as extrações de dopamina foram realizadas na ausência de luz, visto esta ser fotossensível [50]. Após a extração, os solventes foram separados da biomassa através de centrifugação (a 5600 rpm durante 10 minutos utilizando a centrífuga de *ependorf 5804*), e o sobrenadante foi filtrado com um filtro de seringa de 0,45 μm . Cada extração realizada foi repetida no mínimo três vezes, o que permitiu determinar a média do teor de composto extraído e o respetivo desvio padrão.



Figura 5- Equipamento Carousel Radleys Tech utilizado na extração sólido-líquido.

Tabela 4- Lista de solventes utilizados na extração sólido-líquido, e respectivas estruturas químicas e concentrações mássicas (m/m %). ✓ solvente preparado; × solvente sólido, não foi possível a sua preparação; --- solvente não preparado.

Solvente	Estrutura química	Composição em massa (m/m %)			
		100	75	50	25
Metanol		✓	✓	✓	---
Etanol		✓	---	---	---
Ácido Acético		✓	✓	✓	✓
Ácido Cítrico		×	✓	✓	✓
Ácido Glicólico		×	✓	✓	✓
Ácido Láctico		✓	✓	✓	✓
Água		✓	---	---	---

Soxhlet

A extração de rutina utilizando a técnica soxhlet também foi realizada, sendo que se utilizou casca da banana madura e metanol como solvente, tendo esta a duração de 240 minutos.

2.2.2. Quantificação dos compostos de interesse (dopamina e rutina)

A dopamina e a rutina foram quantificadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O equipamento utilizado foi um sistema de cromatografia HPLC (VWR Hitachi) equipado com detetor por arranjo de díodos (DAD). As análises no HPLC foram realizadas com uma coluna analítica de fase reversa C18 (250 × 4,60 mm), Kinetex 5 µm C18 100 Å, da Phenomenex.

O método de quantificação utilizado foi baseado na tese de mestrado de Diogo Silva [51]. A fase móvel utilizada foi um sistema em gradiente de água ultrapura com 0,2 % de ácido trifluoroacético (fase A) e de acetonitrilo com 0,2 % de ácido trifluoroacético (fase B), sendo que estas foram previamente desgaseificadas por ultra-sons. A

separação foi realizada utilizando o seguinte gradiente: 0 min 90 % de fase A, 4 min 0 % de fase A, 10 min 90 % de fase A e 25 min 90 % de fase A. O fluxo de eluição utilizado foi de 0,8 mL/min, e o volume de injeção foi de 20 µL. O forno da coluna operou a uma temperatura de 25 °C, enquanto que o injetor automático trabalhou a uma temperatura de 10 °C. DAD foi fixado a um comprimento de onda de 280 nm.

As curvas de calibração foram preparadas utilizando dopamina e rutina puras dissolvidas numa mistura de água-metanol a 50 (m/m) %. A dopamina e a rutina apresentaram um tempo de retenção de 4,3 e 5,7 minutos, respetivamente.

O teor de dopamina ou rutina extraído por 100 g de biomassa (teor de composto, mg/100g PS) foi calculado da seguinte forma:

$$\text{teor composto (mg/100g PS)} = \frac{m_{\text{extraída}}}{m_{\text{biomassa}}} \times 100 \quad (1)$$

onde a $m_{\text{extraída}}$ é a massa do composto extraído em mg, e m_{biomassa} é a massa em g de peso seco (PS) da casca de banana.

2.2.3. Otimização das condições de extração através do planeamento experimental

Para otimizar o teor de rutina extraído realizou-se um planeamento experimental, de forma a identificar os parâmetros mais significativos, assim como as suas interações. Num planeamento fatorial 2^k existem k fatores que podem contribuir para a obtenção de uma resposta diferente [43]. Sendo que os fatores em estudo contribuem para uma resposta final (y), isto é, teor de rutina extraído, segundo a seguinte equação polinomial de segunda ordem:

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

onde β_0 , β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes ajustados para os termos de interceção, linear, quadrático e interação, respetivamente, e X_i e X_j são as variáveis independentes.

Neste trabalho foram avaliados o efeito de três fatores, a temperatura (T), o tempo (t) e a razão sólido/líquido (razão S/L), ou seja realizou-se um planeamento fatorial 2^3

para otimizar a quantidade de rutina extraída das cascas de banana madura, utilizando a composição de solvente previamente determinada (ácido acético a 65 (m/m) %).

Três tipos de níveis foram tomados em consideração: o nível zero (o ponto central), o nível um, (pontos fatoriais 1 e -1) e o nível α (pontos axiais). Estes últimos são codificados a uma distância α do ponto central através da Equação 3 [52].

$$\alpha = (2^k)^{\frac{1}{4}} \quad (3)$$

onde α é a distância entre os pontos axiais e o ponto central e k é o número de fatores contribuintes para a obtenção da resposta final (apêndice A, Tabela A.1 e Tabela A.2). Assim, foram realizadas 20 extrações, encontrando-se as condições aplicadas na Tabela 5. Os resultados obtidos foram sujeitos a uma análise estatística com uma confiança de 95 % (ANOVA), utilizando o software *Statistica* 10.0 da *Statsoft*. Este modelo matemático possibilita obter as curvas da superfície de resposta, bem como estabelecer a otimização das condições processuais [43]

Tabela 5- Extrações referentes ao planejamento experimental com as suas respectivas condições de temperatura, tempo e razão.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Razão
30	30	0,05
46	30	0,05
30	90	0,05
46	90	0,05
30	30	0,15
46	30	0,15
30	90	0,15
46	90	0,15
24	60	0,10
51	60	0,10
38	10	0,10
38	110	0,10
38	60	0,016
38	60	0,18
38	60	0,10
38	60	0,10
38	60	0,10
38	60	0,10
38	60	0,10
38	60	0,10
38	60	0,10

De seguida, de forma a definir o ponto ótimo de condições no processo de extração da rutina, foram realizadas três extrações a diferentes condições de tempo de extração (Tabela 6). Estas condições de extração foram escolhidas de acordo com os dados obtidos através do planeamento experimental.

Tabela 6- Condições de extração referentes à determinação das condições ótimas de extração de rutina a partir da casca de banana madura, utilizando o ácido acético 65 (m/m) % como solvente.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Razão
25	110	0,06
25	80	0,06
25	50	0,06

Os estudos de otimização de extração apenas foram realizados para a extração de rutina, devido ao facto de o teor de dopamina diminuir com o tempo de armazenamento da biomassa, como será analisado mais adiante na secção dos resultados e discussão de dados.

2.2.4. Atividade antioxidante dos extratos

A atividade antioxidante do extrato obtido nas condições de extração do ponto ótimo (80 min, 25 °C, razão S/L=0,06) utilizando ácido acético 65 (m/m) %, e utilizando os solventes convencionais (metanol e etanol) e água nas mesmas condições de extração do ponto ótimo, foram avaliadas através do método de Brand-William. Este método consiste na estabilização do radical 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) pela ação de um agente antioxidante [53]. Para além disso, também foram avaliados extratos obtidos com as mesmas condições de extração anteriores, assim como com os mesmos solventes de extração, sendo que neste caso o tempo de extração foi de 110 min.

Em primeiro lugar foi preparada uma solução de 125 mol/L de DPPH em ácido acético 80 (m/m) %, pesando para um balão volumétrico de 100 mL, cerca de 0,00493 g de DPPH. A solução ficou a agitar numa placa, aproximadamente, durante 60 minutos no escuro até solubilizar. De seguida, os extratos foram diluídos em ácido acético a 80 (m/m) %. Pipetou-se 5 µL de cada extrato numa microplaca e adicionou-se 195 µL da solução de DPPH. Também foi realizado um ensaio do branco em que se adicionou 5 µL

do solvente e 195 µL de DPPH. Por fim, as amostras foram incubadas a 25 °C durante 30 minutos, e leu-se a absorbância a um comprimento de onda de 517 nm, utilizando o leitor de microplacas da *BioTek Synergy HT*. Também foram realizados ensaios com os solventes puros, por forma a verificar a sua influência sobre a atividade antioxidante.

A atividade antioxidante foi determinada através da curva padrão: $441,8 \times \%AA - 16,725$. A percentagem de redução de DPPH para cada amostra foi calculada através da Equação 4:

$$\%AA = \frac{Abs_{branco} - Abs_{amostra}}{Abs_{branco}} \quad (4)$$

onde Abs_{branco} é a absorbância do branco e $Abs_{amostra}$ é a absorbância da amostra em estudo, isto é, do extrato diluído. Os resultados obtidos da atividade antioxidante de cada ensaio foram convertidos em miligramas de equivalente de trolox (TE) por g de peso seco de casca de banana.

2.2.5. Reutilização da biomassa & Saturação e reciclabilidade do solvente

Para o desenvolvimento de um processo sustentável de extração foram avaliados três parâmetros.

A reutilização da biomassa foi realizada por forma a avaliar se a rotina presente na biomassa tinha sido completamente extraída. Para tal, fez-se duas extrações consecutivas à mesma biomassa utilizando as condições ótimas de extração (80 min, 25 °C, razão S/L=0,06, ácido acético 65 (m/m) %). Após cada extração a mistura sólido-líquido foi filtrada e uma nova mistura aquosa de ácido orgânico foi utilizada na mesma amostra (biomassa).

Depois avaliou-se a saturação do solvente em rotina. Mais concretamente, o mesmo solvente foi reutilizado por quatro ciclos de extração sucessivos, mas recorrendo a biomassa nova em cada ciclo, por forma a atingir a sua saturação. Estes ensaios foram realizados nas condições ótimas de extração de rotina determinadas (razão S/L de 0,06, durante 80 minutos e a 25 °C).

Finalmente, estudou-se a recuperação e reutilização do solvente utilizado no processo de extração após a sua saturação em rotina (ciclo de reciclabilidade). O

solvente, após saturado (duas extrações sucessivas nas condições de extração otimizadas), foi recuperado através da evaporação a pressão reduzida, e utilizado novamente na extração de rotina até se atingir a sua saturação. Tendo sido efetuado no total três ciclos de reciclabilidade do solvente.

3. Discussão de Resultados

3.1. Dopamina

3.1.1. Efeito da maturação da banana

Começou-se por estudar o efeito da maturação da banana no teor de dopamina extraída. Mais especificamente, foram analisados três estados de maturação, nomeadamente casca de banana verde, semi-madura e madura. As condições de extração foram mantidas constantes em todas as experiências, nomeadamente tempo de extração de 60 minutos, temperatura de 25 °C e razão sólido-líquido de 0,1. Utilizou-se o metanol como solvente de extração para este estudo, uma vez que é um dos solventes mais utilizados na literatura para a extração de dopamina [8]. Na Figura 6 encontram-se os resultados obtidos, isto é, o teor de dopamina extraído da casca de banana para as diferentes maturações em estudo.

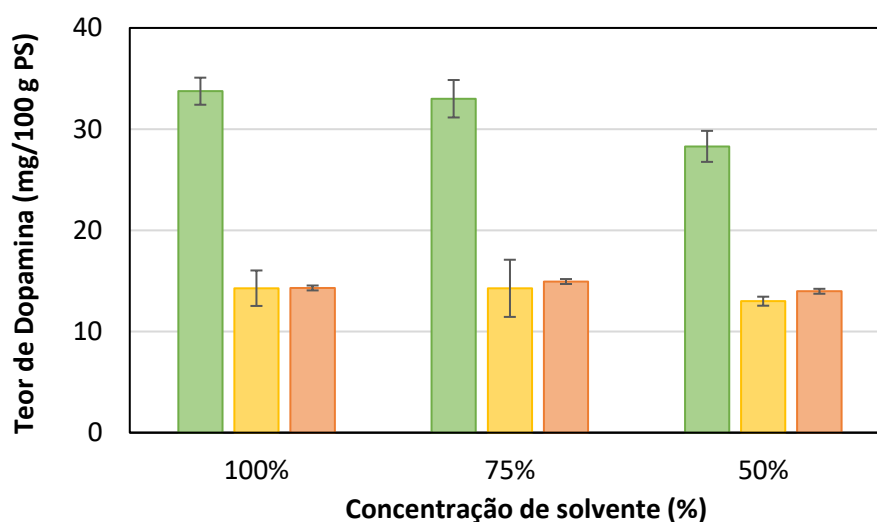


Figura 6- Representação gráfica da influência dos três estados de maturação da banana no processo de extração de dopamina. Casca da banana: (■) verde, (■) semi-madura e (■) madura. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C e razão S/L=0,1, utilizando metanol puro ou uma mistura de metanol com água (m/m) % como solvente de extração.

Na Figura 6 (apêndice B, Tabela B.1) observa-se que parece não haver uma diferença significativa entre a utilização de metanol puro ou da sua mistura com água nas diferentes percentagens mássicas. Em relação ao efeito da maturação na extração da

dopamina, na Figura 6 constata-se que as cascas de banana semi-madura e madura apresentam quantidades de dopamina semelhantes (≈ 15 mg/100 g PS), enquanto que a casca de banana verde apresenta um teor de dopamina bastante elevado (33,7 mg/100 g PS, utilizando metanol puro como solvente) em relação às outras duas maturações em estudo. Estes resultados indicam que, com o aumento da maturação, o teor de dopamina tem tendência a diminuir, o que está de acordo com os resultados obtidos por Bonnet *et al.* [23] e Kanazawa *et al.* [54]. Mais concretamente, estes autores verificaram que o período de colheita das bananas afeta o seu conteúdo de dopamina, isto é, que a casca de banana verde apresentou um teor de dopamina maior relativamente às cascas de banana madura. Assim, a casca de banana verde apresenta-se como sendo a mais indicada para se obter extratos ricos em dopamina, sendo por isso esta a maturação escolhida para utilizar nos próximos estudos de extração de dopamina.

3.1.2. Influência de diferentes solventes no processo de extração

Após a percepção de qual a maturação da banana mais indicada para obter extratos ricos em dopamina (casca de banana verde), iniciou-se o estudo da influência dos solventes na extração da dopamina, por forma a identificar o mais eficiente. Foram utilizados diferentes ácidos orgânicos, nomeadamente ácido láctico, ácido glicólico, ácido cítrico e ácido acético, sendo que estes foram utilizados na sua forma pura e em mistura aquosa a diferentes concentrações mássicas. A escolha destes solventes foi realizada por forma a investigar o efeito da estrutura molecular dos ácidos na extração de dopamina, já que se estudaram ácidos monocarboxílicos lineares (ácido acético), ácidos dicarboxílicos (ácido glicólico e ácido láctico) e ácidos triboxílicos (ácido cítrico). Na Figura 7 (apêndice B, Tabela B.2) encontram-se os dados relativos ao teor de dopamina extraído de casca de banana verde, utilizando ácidos orgânicos e as suas misturas aquosas. Note-se que, não foi possível realizar extrações com o ácido glicólico e com o ácido cítrico nas suas formas puras, devido à sua natureza sólida, como já foi referido anteriormente.

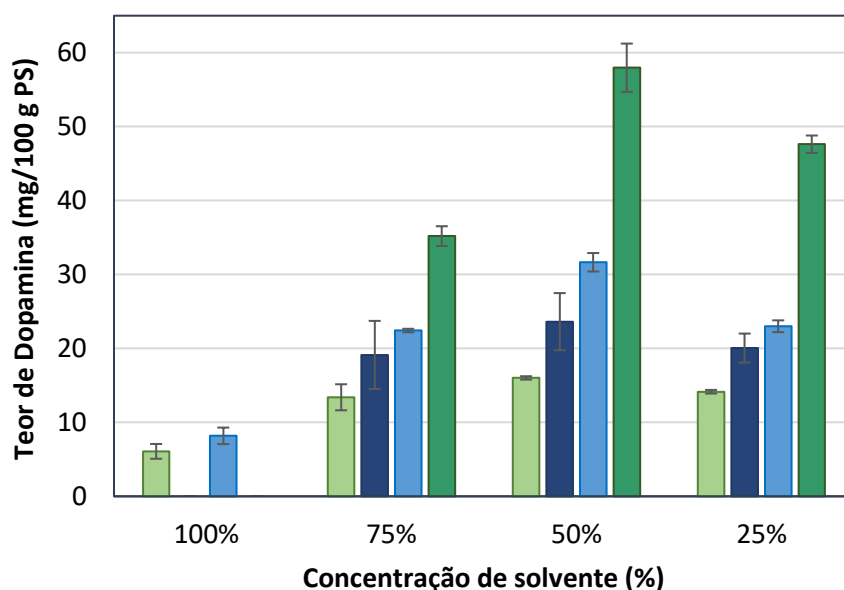


Figura 7- Representação gráfica da influência da utilização de diferentes ácidos orgânicos na extração de dopamina a partir da casca de banana verde: (■) ácido acético, (■) ácido glicólico, (■) ácido láctico e (■) ácido cítrico. Condições de extração: $t=60$ min; $T=25$ °C; razão $S/L=0,1$, utilizando solvente puro ou a sua mistura aquosa (m/m) %.

Em relação aos resultados de teor de dopamina obtidos utilizando ácidos na sua forma pura, estes parecem ser menos eficazes na extração de dopamina comparativamente às suas misturas aquosas, sendo que o teor de dopamina extraído ficou sempre abaixo de 10 mg/100g PS. De facto, a adição de água ao solvente ácido permite melhorar a eficiência de extração da dopamina de uma forma geral para todos os ácidos em estudo. Estes resultados talvez possam ser explicados pela redução da viscosidade verificada com o aumento de percentagem de água, o que pode ter facilitado a transferência de massa, melhorando assim a eficiência da extração da dopamina [47, 54]. Claudio *et al.* [55] relataram que a utilização da água como um co-solvente melhora a extração de compostos de biomassa, para além de que aumenta a seletividade de extração. No entanto, a extração de dopamina é favorecida pela presença de água até certo ponto, já que os valores de teor de dopamina para as misturas aquosas a 25 (m/m) % foram inferiores do que para as misturas aquosas a 50 (m/m) %.

Em relação às diferenças estruturais do solvente apresentadas na Tabela 4, algumas tendências podem ser destacadas. A adição de um grupo hidroxilo (-OH) ao solvente de extração leva à obtenção de teores de dopamina mais elevados, como se pode observar pela Figura 7. O ácido acético e as suas misturas aquosas foram os solventes menos eficientes na extração de dopamina, sendo que o teor máximo que se conseguiu extrair foi de 17,1 mg/100 g PS, para a mistura aquosa a 50 (m/m) %. Por outro lado, as misturas aquosas de ácido cítrico mostraram ser as mais eficientes, obtendo-se um teor de dopamina de 58 mg/100 g PS, para a mistura aquosa a 50 (m/m) %. Estes resultados vão de encontro aos resultados obtidos por Jordana [47] onde os teores extraídos de levodopa, uma molécula estruturalmente semelhante à dopamina, foram superiores com a utilização de ácido cítrico 50 (m/m) % como solvente.

Adicionalmente, foram realizadas extrações de dopamina a partir de casca de banana verde utilizando os solventes convencionais, nomeadamente metanol e etanol, bem como água e água acidificada a pH=3 (apêndice B, Figura B.1, Tabela B.2), para efeitos de comparação. O metanol puro, dos solventes convencionais, foi o mais eficiente, conseguindo extrair um teor de dopamina de 38 mg/100 g PS, enquanto que a água foi o menos eficiente, extraíndo um teor de dopamina inferior a 23 mg/100 g PS. Estes resultados vão de encontro aos resultados obtidos por González-Montelongo *et al.* [8]. Para além disso, como os solventes ácidos mostraram-se mais eficientes na extração da dopamina, foi realizada a extração de dopamina recorrendo a água acidificada a pH=3, com o propósito de se analisar qual seria o efeito desta alteração no teor de dopamina extraído comparativamente à extração com água pura. Os resultados obtidos demonstram um pequeno acréscimo de dopamina (25 mg/100 g PS) quando se utilizou este solvente com pH mais ácido, suportando assim que a utilização de solventes ácidos tem um efeito benéfico na extração de dopamina.

Em suma, as misturas aquosas de ácidos orgânicos, mais concretamente a mistura aquosa de ácido cítrico a 50 (m/m) %, mostrou ser mais promissora na extração de dopamina do que os solventes convencionalmente utilizados. Sem esquecer que o ácido cítrico tem ainda a seu favor o facto de ser considerado um aditivo alimentar pela comissão europeia [48].

3.1.3. Efeito do tempo de armazenamento

Num processo de extração é importante ter em conta a estabilidade dos compostos que se pretendem extrair da biomassa ao longo do tempo. Nesse sentido, fez-se um estudo para verificar se o teor de dopamina na biomassa ao longo do tempo se mantinha constante. Este estudo envolveu a realização de extrações ao longo do tempo, feitas sempre nas mesmas condições e utilizando a mesma biomassa, acondicionada num congelador a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ em novembro de 2019. Sendo que foi sempre esta a biomassa utilizada na realização das extrações ao longo do tempo de armazenamento (novembro, dezembro e janeiro). Os resultados obtidos encontram-se na Figura 8 (apêndice B, Tabela B.3).

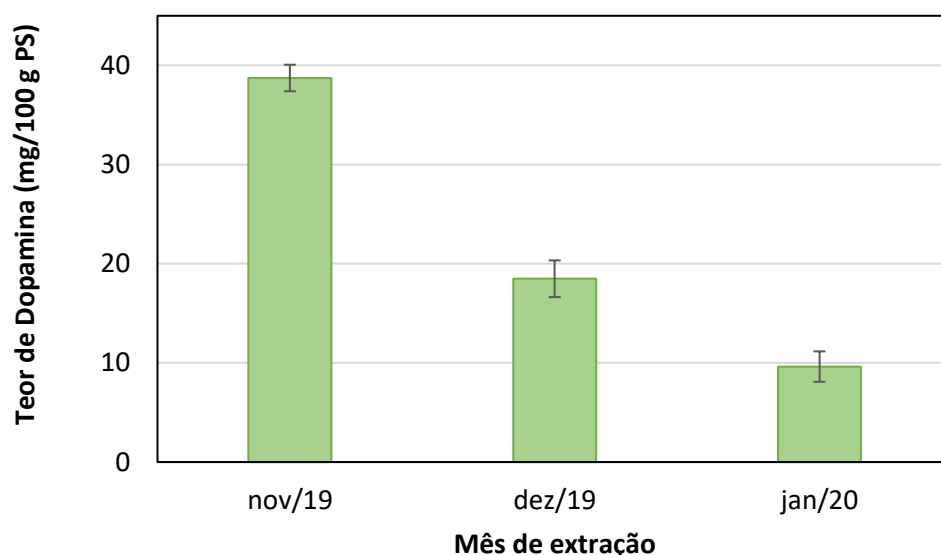


Figura 8- Representação gráfica da degradação da dopamina ao longo do tempo utilizando casca de banana verde no seu processo de extração. Condições de extração: $t=60\text{ min}$; $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$; razão $S/L=0,1$, utilizando metanol puro.

Pela Figura 8 é possível constatar que enquanto em novembro de 2019 se obteve um teor de dopamina de $38,7\text{ mg}/100\text{ g PS}$, em janeiro de 2020 já só se conseguiu obter um teor de dopamina próximo de $9,6\text{ mg}/100\text{ g PS}$. Assim, observou-se uma perda de, aproximadamente, 75 % de teor de dopamina extraída com o tempo de armazenamento da biomassa, apesar de se utilizar a mesma biomassa e as mesmas condições de extração.

Os resultados obtidos parecem indicar que o teor de dopamina ao longo do tempo na biomassa não é estável, pelo menos tendo em conta a forma de armazenamento de biomassa que se utilizou. Deste modo, o desenvolvimento de um processo de extração e otimização de dopamina por forma a obter extratos com elevados teores de dopamina implicaria a realização de extrações num curto espaço de tempo, o que pode significar um entrave à viabilidade e praticabilidade deste processo. Neste sentido, o mais indicado será encontrar um armazenamento alternativo para a biomassa, em que o teor de dopamina não se altere. Uma hipótese será congelar a biomassa a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, e analisar se a uma temperatura muito mais baixa de facto permitirá que o teor de dopamina presente na casca de banana se mantenha constante com o avanço do tempo de armazenamento, o que de acordo com Bonnet *et al.* [23] deve ser possível. Contudo, no decorrer desta dissertação não houve tempo para se analisar este parâmetro, tendo em conta a situação atual do COVID-19, e consequentemente a otimização da extração de dopamina da casca de banana não foi realizada.

3.1.4. Conclusões

Três parâmetros no processo de extração de dopamina foram estudados com o intuito de se verificar quais as melhores condições para a realização deste, nomeadamente a maturação da banana, o solvente e o tempo de armazenamento da biomassa. Verificou-se que a casca de banana verde apresentou um teor de dopamina maior do que as outras maturações, sendo por isso a mais indicada a utilizar no processo de extração de dopamina. Constatou-se também que, as misturas aquosas de ácidos orgânicos são uma opção viável para a extração de dopamina, sendo que o teor máximo de dopamina extraído foi $57,96\text{ mg}/100\text{ g PS}$, utilizando como solvente uma mistura aquosa de ácido cítrico a 50 (m/m) \% . Contudo, observou-se que o teor de dopamina presente na casca de banana congelada decresceu com o avanço do tempo de armazenamento, sendo necessário encontrar uma técnica de armazenamento alternativa que permita que o teor de dopamina se mantenha constante, por forma a tornar o processo de otimização de extração mais viável.

3.2. Rutina

3.2.1. Efeito da maturação da banana

De igual modo aos estudos realizados à extração de dopamina, na extração da rutina também se começou por estudar o efeito da maturação da banana no teor de rutina extraído, por forma a se escolher a biomassa mais indicada para otimizar o processo de extração. Sendo que nestes estudos também se utilizou o metanol como solvente de extração, já que a extração de rutina convencionalmente é realizada maioritariamente com este solvente [9]. O teor de rutina extraído para as maturações da banana em estudo, encontram-se na Figura 9 (apêndice C, Tabela C.1).

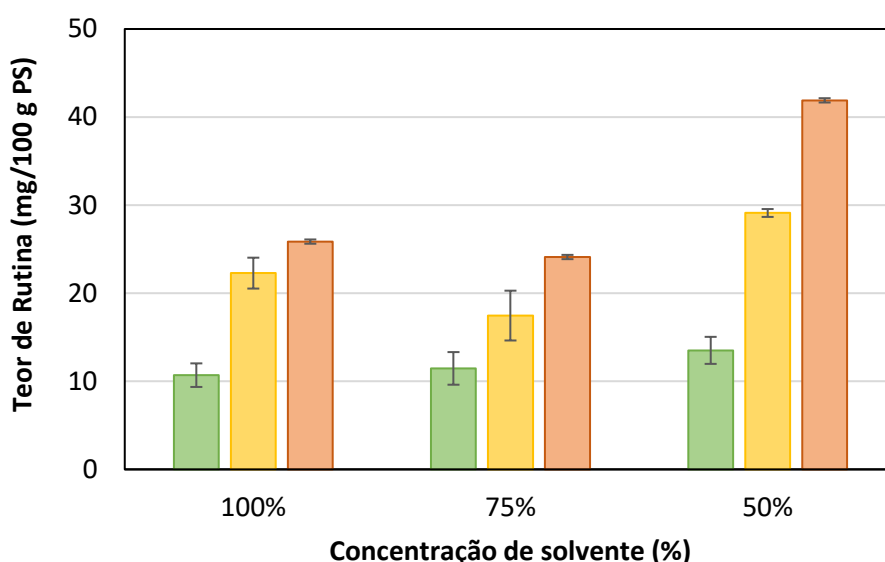


Figura 9- Representação gráfica da influência dos três estados de maturação da banana no processo de extração de dopamina. Casca da banana: (■) verde, (■) semi-maduro e (■) maduro. Condições de extração: $t=60$ min; $T=25$ °C e razão $S/L=0,1$, utilizando metanol puro ou uma mistura de metanol com água (m/m) % como solvente de extração.

Os resultados mostram que, os extratos de casca de banana verde apresentam um teor de rutina menor (10,7 mg/100 g PS, metanol puro como solvente de extração) em comparação ao teor obtido nos extratos de casca de banana madura (25,9 mg/100 g PS, metanol puro como solvente de extração). Assim, ao contrário do que aconteceu na extração de dopamina, parece haver um aumento do teor de rutina com o avanço do estado de maturação da banana.

Para além disso, constatou-se ainda que a presença de água tem um efeito positivo na extração de rutina, já que há medida que se aumentou a sua percentagem, também se observou um aumento do teor de rutina extraído. De facto, os resultados na literatura sobre a extração de rutina de outras fontes de biomassa, mostram que quando se adiciona uma pequena percentagem de água ao solvente orgânico verifica-se um aumento da eficiência da extração [9, 46]. Sendo que este fenómeno pode ser explicado pelo facto de que a água ao ser absorvida pela biomassa provoca a expansão da mesma, ou seja, há um aumento da área de superfície de contato entre o soluto e o solvente, o que pode levar a um aumento da difusão dos compostos fenólicos extratáveis [46, 56]. Mais concretamente, o teor máximo de rutina obtido neste conjunto de experiências foi de 41,9 mg/100 g PS, utilizando uma mistura de metanol e água a 50 (m/m) % como solvente de extração, e casca de banana madura.

Em suma, a casca de banana madura apresenta-se como sendo a mais indicada para a obtenção de extratos ricos em rutina, sendo por isso esta a maturação escolhida para utilizar nos próximos estudos de extração de rutina.

3.2.2. Efeito do tempo de armazenamento

Antes de se passar aos testes de extração de rutina com diferentes solventes, primeiro estudou-se o efeito do tempo de armazenamento da biomassa, por forma a perceber se o teor de rutina seria ou não afetado com o avanço do tempo de armazenamento da biomassa, uma vez que este mostrou ter influência sobre o teor de dopamina. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 10 (apêndice C, Tabela C.2), sendo que se utilizou como solvente de extração o metanol, pelas razões já apresentadas anteriormente.

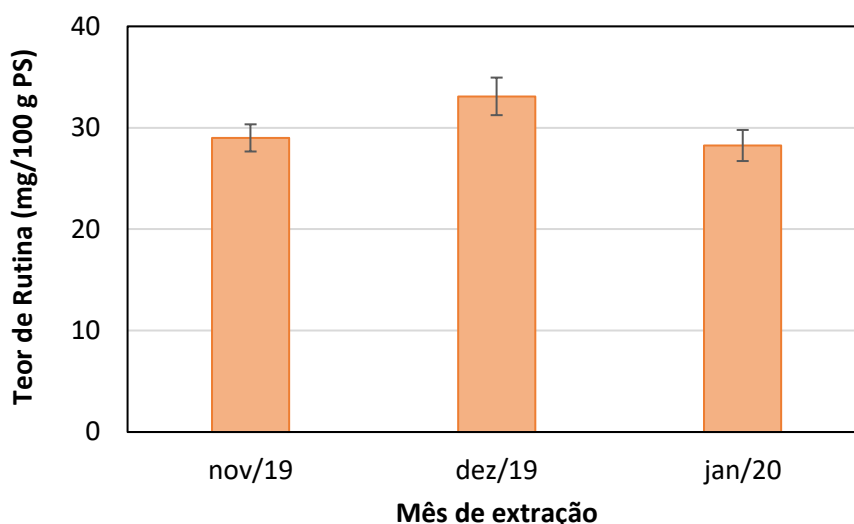


Figura 10- Representação gráfica da degradação da rutina ao longo do tempo utilizando casca de banana madura no seu processo de extração. Condições de extração: $t=60$ min; $T=25$ °C; razão $S/L=0,1$, utilizando metanol puro.

Ao contrário do que se observou na extração de dopamina, na extração de rutina praticamente não se observou alteração do seu teor extraído com o tempo de armazenamento, já que para a primeira extração (Nov-19) obteve-se um teor de rutina de 29,0 mg/100 g PS, enquanto que para a última extração (Jan-20), 2 meses depois, obteve-se um teor de rutina de 28,3 mg/100 g PS. Assim, o teor de rutina não sofre alterações significativas com o tempo de armazenamento da biomassa, o que torna o desenvolvimento do processo de extração da rutina e sua otimização mais simples e preciso.

3.2.3. Influência de diferentes solventes no processo de extração

Após a determinação da biomassa mais apropriada para a extração da rutina, casca de banana madura, iniciou-se o estudo por forma a inferir qual o solvente mais eficaz na sua extração, sendo que as extrações foram efetuadas utilizando ácidos orgânicos e suas misturas aquosas. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 11 (apêndice C, Tabela C.3). Nota-se que, os ácidos cítrico e glicólico não puderam ser utilizados na sua forma pura no processo de extração devido à sua natureza sólida, já referida anteriormente.

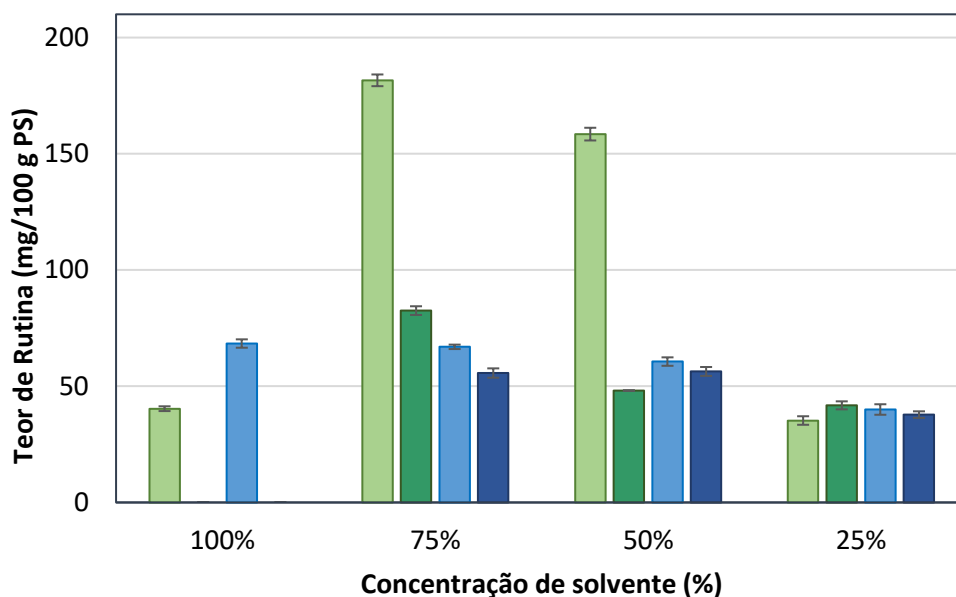


Figura 11- Representação gráfica da influência da utilização de diferentes ácidos orgânicos na extração de dopamina a partir da casca de banana verde: (■) ácido acético, (■) ácido cítrico, (■) ácido láctico e (■) ácido glicólico. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; razão S/L=0,1, utilizando solvente puro ou a sua mistura com água (m/m %).

De forma geral, com o aumento da concentração de ácido na mistura aquosa o teor de rutina extraído aumentou, ao contrário do que se verificou com a dopamina. Por exemplo, para as extrações efetuadas utilizando soluções aquosas de ácido acético com uma concentração de 25, 50 e 75 (m/m) % obteve-se um teor de rutina de 35,3, 158,5 e 181,6 mg/100 g PS, respetivamente. Contudo, quando se utiliza ácido puro como solvente de extração o teor de rutina extraído diminui bastante (40,4 mg/100g, para o ácido acético). Assim, estes resultados mostram que a presença de água no solvente de extração parece ter um papel relevante no processo de extração da rutina, como discutido acima. Contudo, neste caso a percentagem de água na mistura é benéfica apenas para misturas com baixas percentagens de água, já que os teores de rutina extraídos diminuem para as misturas aquosas com maiores percentagens de água.

Em relação às diferenças estruturais do solvente, neste caso a adição de um grupo hidroxilo (-OH) ao solvente de extração leva à obtenção de teores de rutina mais baixos, como se pode observar pela Figura 12. O ácido acético (ácido hidroximonocarboxílico) a 75 (m/m) % distancia-se claramente dos outros ácidos, extraíndo cerca de

181,6 mg/100 g PS de rutina. Por sua vez, o ácido glicólico (ácidos hidroxitriboxílicos) não parece ser uma boa opção como solvente para a extração de rutina.

De igual modo à dopamina, também foram realizadas extrações utilizando solventes orgânicos convencionais, nomeadamente metanol e etanol, assim como, utilizando água e água acidificada a pH=3, para efeitos de comparação. Os resultados obtidos estão no representados em Anexo C na Figura C.1 e na Tabela C.3. O etanol foi o solvente que mais se destacou, tendo sido capaz de extrair 14,6 mg/100 g PS de rutina. No entanto, é importante realçar que os resultados obtidos com os ácidos e suas misturas aquosas na extração de rutina foram bem mais elevados. Por sua vez, a utilização de água acidificada como solvente de extração mostrou ser um pouco mais eficiente do que a utilização de água sem o pH ajustado, visto que existiu um ligeiro acréscimo de rutina extraída em 0,7 mg/100 g PS, o que mostra estar de acordo com o facto de que os solventes ácidos mostram ser mais eficientes na extração de rutina.

Com base nos resultados discutidos acima, o ácido acético foi o solvente que mais se destacou, sendo por isso o solvente escolhido para a otimização das condições operacionais de extração, através do planeamento experimental. Contudo, primeiro estudou-se de forma mais pormenorizada o efeito da concentração do ácido acético na extração de rutina, por forma a escolher a concentração do solvente mais indicada a utilizar para a otimização das condições operacionais. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 12 (apêndice C, Tabela C.4), sendo que as extrações foram realizadas nas mesmas condições de temperatura, tempo e razão sólido/líquido anteriormente utilizadas.

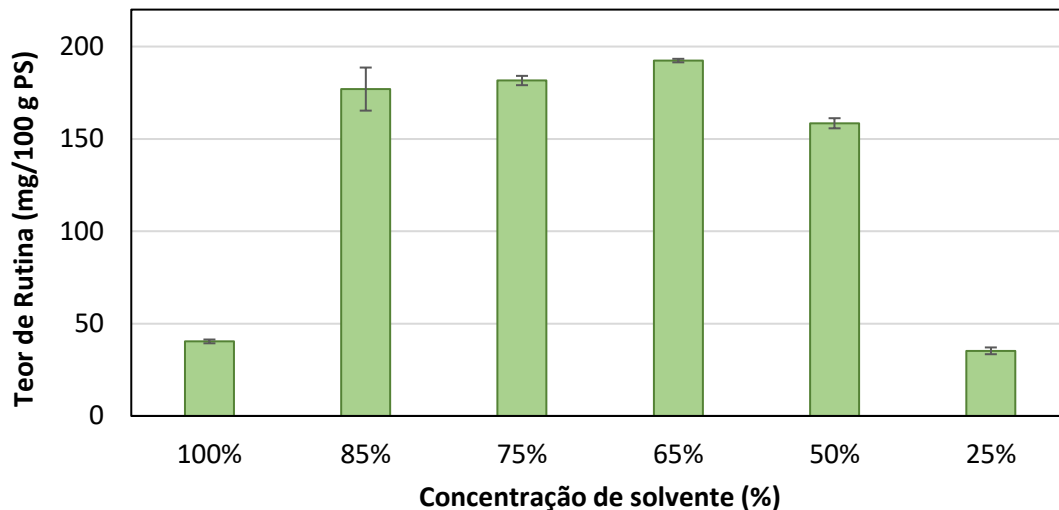


Figura 12- Representação gráfica da otimização da concentração do ácido acético, utilizando casca de banana madura, no processo de extração de rutina. Condições de extração: $t=60$ min; $T=25$ °C; razão S/L=0,1, utilizando ácido acético puro ou uma mistura de ácido acético com água (m/m) %.

A Figura 12 mostra que a utilização do ácido acético puro como solvente não é vantajoso para o processo, como já foi referido anteriormente. Para além disso, estes resultados confirmaram que a adição de água ao ácido orgânico é benéfica para a extração de rutina, até uma concentração de ácido acético de 65 (m/m) %. A justificação para este aumento de eficiência com a adição de água deve-se às razões já anteriormente mencionadas, tornar o solvente menos viscoso, bem como aumentar a área de superfície de contacto entre o soluto e o solvente [56], facilitando assim a transferência de massa [47]. Contudo, o aumento em demasia da percentagem de água no solvente de extração leva a que a sua eficácia de extração diminua, uma vez que os teores de rutina extraídos para a mistura aquosa a 25 (m/m) % foram inferiores aos valores obtidos para o ácido puro, 35,3 mg/100 g PS e 40,4 mg/100 g PS de rutina, respetivamente.

Assim, os resultados mostram que a mistura aquosa de ácido acético a 65 (m/m) % é o solvente que permite maximizar a extração de rutina (192,4 mg/100 g PS) a partir de cascas de banana madura, sendo por isso a concentração escolhida para o estudo da otimização das condições de extração.

3.2.4. Otimização das condições de extração através do planeamento experimental

Após a seleção do melhor solvente para a extração de rutina, ácido acético com uma concentração 65 (m/m) %, foi realizado o planeamento fatorial 2^3 (tês fatores e dois níveis) com o objetivo de otimizar as condições de extração da rutina, de cascas de banana maduras. Esta metodologia permite explicar a relação entre a resposta (teor de rutina extraída, mg/100g PS) e as variáveis independentes que influenciam o teor de rutina do extrato (ilustrado na Figura 13) e conseqüentemente, prever as condições de extração mais favoráveis para o processo. As variáveis independentes avaliadas foram a temperatura (T, °C), tempo de extração (t, min), e a razão sólido/líquido (razão S/L, massa de biomassa por massa de solvente).

Note-se que, os dados obtidos foram sujeitos a uma análise de variância com um intervalo de confiança de 95 %, por forma a perceber a significância das variáveis e das suas interações no teor de rutina extraído. Os pontos experimentais utilizados no planeamento fatorial, a equação do modelo, o rendimento de extração da rutina obtido experimentalmente e os respetivos valores calculados, e os coeficientes de correlação obtidos, bem como todas as estatísticas são mostradas no Apêndice C (Tabela C.6 e C.7 e Figura C.2, C.3 e C.4). O valor de R^2 ajustado da equação polinomial para o teor de rutina extraído foi de 0,916 (explica 91,6% da variação dos valores observados), mostrando assim que não existe uma variação significativa entre as respostas experimentais.

A análise estatística dos dados no apêndice C (Tabela C.6 e Figura C.2) mostram que das variáveis lineares apenas a temperatura e a razão S/L são significativas, sendo que ambas têm um efeito negativo sobre a extração, uma vez que com o aumento destas variáveis o teor de rutina extraído diminui. Para além disso, a maiorias das variáveis de interação mostram ter um efeito significativo sobre a extração de rutina. Em relação ao tempo de extração, este tem um efeito positivo sobre a extração de rutina. Com o aumento do tempo, aumenta o teor de rutina extraído. Contudo, há que ter em conta que o tempo de extração linear e quadrático, assim como a variável de interação entre o tempo e a razão S/L, são variáveis pouco significativas no processo de extração da rutina (ver gráfico de Pareto, apêndice C, Figura C.2).

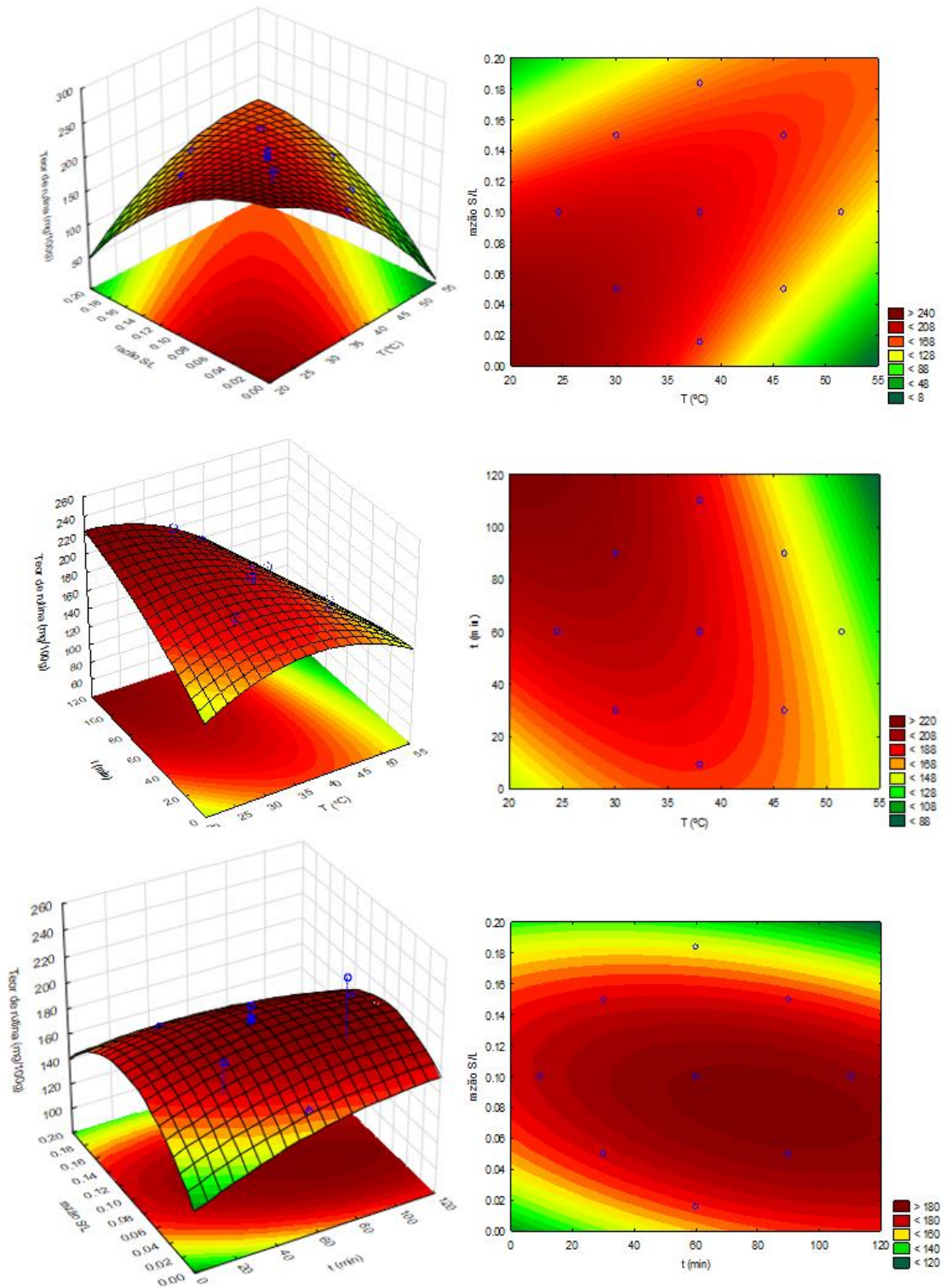


Figura 13- Gráficos de superfície de resposta (esquerda) e gráficos de contorno (direita) relativos ao teor de rutina extraído utilizando uma mistura aquosa de +ácido acético a 65 (m/m) % com os efeitos combinados de: (i) razão S/L e temperatura (T, °C); (ii) tempo (t, min) e temperatura (T, °C); e (iii) razão S/L e tempo (t, min).

Posto isto, determinou-se o ponto ótimo de extração de rutina para uma concentração de ácido orgânico de 65 (m/m) %, o resultado obtido foi tempo de extração de 110 minutos, razão sólido-líquido de 0,06 e temperatura de 25°C. Tendo em conta que o tempo foi a variável menos significativa de todas, optou-se por estudar as condições de extração otimizadas com diferentes tempos de extração, isto é, para além dos 110 minutos, também se realizou extrações com a duração de 80 e 50 minutos, como se pode ver na Figura 14 (apêndice C, Tabela C.8).

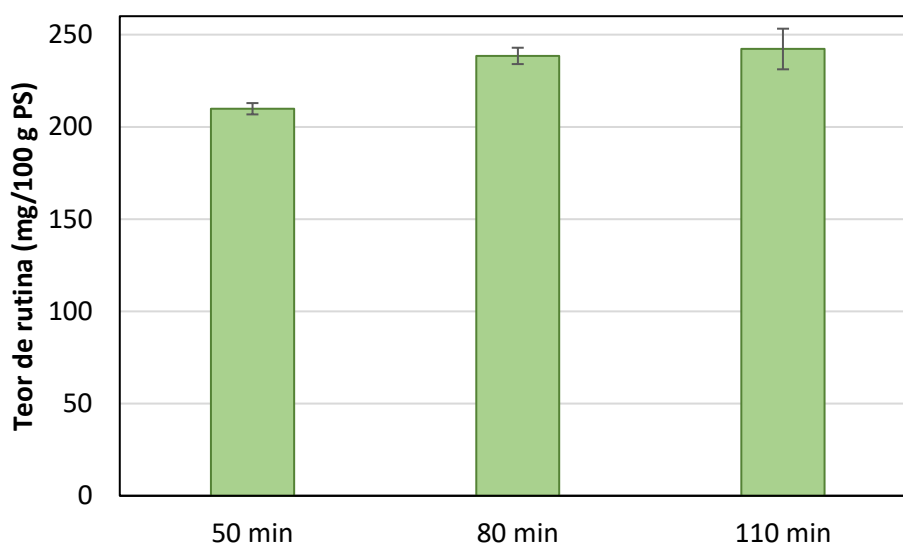


Figura 14- Representação gráfica da otimização das condições do processo de extração de rutina a partir da casca de banana madura, utilizando ácido acético a 65(m/m) %. Condições de extração: T=25 °C; razão S/L=0,06.

De facto, o extrato obtido nas condições ótimas de extração (110 minutos, razão sólido-líquido de 0,06 e uma temperatura de 25°C) foi o que apresentou o maior teor de rutina 242,2 mg/100 g PS. Contudo, ao reduzir o tempo para 80 minutos, o teor de rutina extraído praticamente não se alterou, obtendo-se 238,5 mg/100 g PS de rutina. Porém, diminuindo ainda mais o tempo de extração para 50 minutos o teor de rutina extraído já diminuiu consideravelmente, 209,8 mg/100 g PS. Assim, as condições ótimas para a extração de rutina de casca de banana madura, utilizando uma mistura aquosa de ácido acético a 65 (m/m) %, são 80 minutos, a uma temperatura de 25 °C e uma razão sólido/líquido de 0,06. Para além disso, é ainda importante ressaltar que este valor (238,5 mg/100 g PS) está na mesma faixa dos valores obtidos por extração de soxhlet

(230,1 e 205,5 mg/100 g PS de rutina, utilizando etanol e metanol como solvente de extração, respetivamente), em que os tempos de extração foram mais longos (pelo menos 360 minutos) e as temperaturas mais elevadas (60–80 °C).

Note-se que, a seleção destas condições tem por objetivo a simplificação do processo de extração e minimizar o consumo de energia, através da utilização de um solvente simples e comumente utilizado na indústria alimentar [48] a baixas temperaturas.

3.2.5. Atividade antioxidante dos extratos

De seguida, avaliou-se a atividade antioxidante do extrato obtido nas condições ótimas de extração, ou seja, a uma temperatura de 25 °C, com uma razão S/L de 0,06 e 80 minutos, utilizando como solvente ácido acético a 65 (m/m) %. Também se mediu a atividade dos extratos com solventes orgânicos (metanol e etanol) e água, nas mesmas condições de extração, para efeitos de comparação. Para além disso, também foram avaliados extratos com tempo de extração de 110 minutos, por forma a entender se o aumento do tempo de extração poderia afetar o teor antioxidante do extrato, apesar de não se observar praticamente nenhuma variação nos valores de teor de rutina para os extratos com 80 e 110 minutos de extração. Na Figura 15 (apêndice C, Tabela C.9), encontram-se os resultados obtidos relativamente à atividade antioxidante dos extratos analisados.

Como se pode observar pela Figura 15, para todos os solventes em estudo, a redução do tempo de extração de 110 min para 80 min não afetou a atividade antioxidante do extrato, como seria de esperar tendo em conta os resultados de teor de rutina no extrato obtidos anteriormente. Para além disso, observou-se que os extratos obtidos com ácido acético com uma concentração de 65 (m/m) % apresentaram uma atividade antioxidante superior (63,06 mg TE/g PS em 80 minutos de extração) aos extratos obtidos com solventes orgânicos e água, o que está de acordo com o teor de rutina extraído da casca de banana madura. Note-se que, a atividade dos solventes foi também avaliada, confirmando-se que estes não tiveram qualquer influência no valor de atividade antioxidante do extrato obtido, já que apresentaram atividade antioxidante nula.

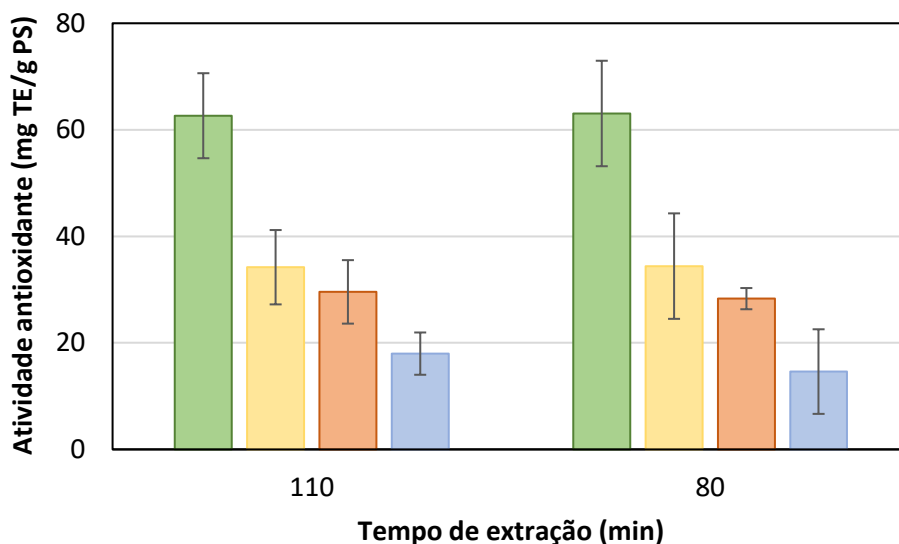


Figura 15- Representação gráfica da atividade antioxidante no processo de extração de rutina a partir da casca de banana madura com a utilização de diferentes solventes: (■) ácido acético 65 %, (■) etanol, (■) metanol e (■) água. Condições de extração: T=25 °C; razão S/L=0,06.

3.2.6. Reutilização da biomassa & Saturação e reciclabilidade do solvente

Após a identificação das condições otimizadas do processo de extração (temperatura de 25 °C, tempo de extração de 80 min, e razão sólido líquido de 0,06), foi estudada a reutilização da biomassa por forma a inferir o teor máximo de rutina presente na casca da banana madura. Desta forma, fez-se um primeiro ciclo de extração nas condições de extração otimizadas anteriormente (ciclo 1, 241,9 mg/100 g PS), sendo que após a extração recuperou-se a biomassa e voltou-se a utilizá-la em mais um ciclo de extração (ciclo 2). Note-se que, em cada ciclo foram utilizadas misturas aquosas de ácido acético a 65 (m/m) % novas, sendo que a biomassa utilizada foi sempre a mesma. Os resultados mostram que, que a rutina foi extraída praticamente na sua totalidade no primeiro ciclo de extração, já que no segundo ciclo de extração o teor de rutina obtido foi muito baixo, 0,9 mg/100 g PS, como se pode constatar na Figura 16 (i). Assim, não há necessidade de voltar a reutilizar a biomassa após a primeira extração.

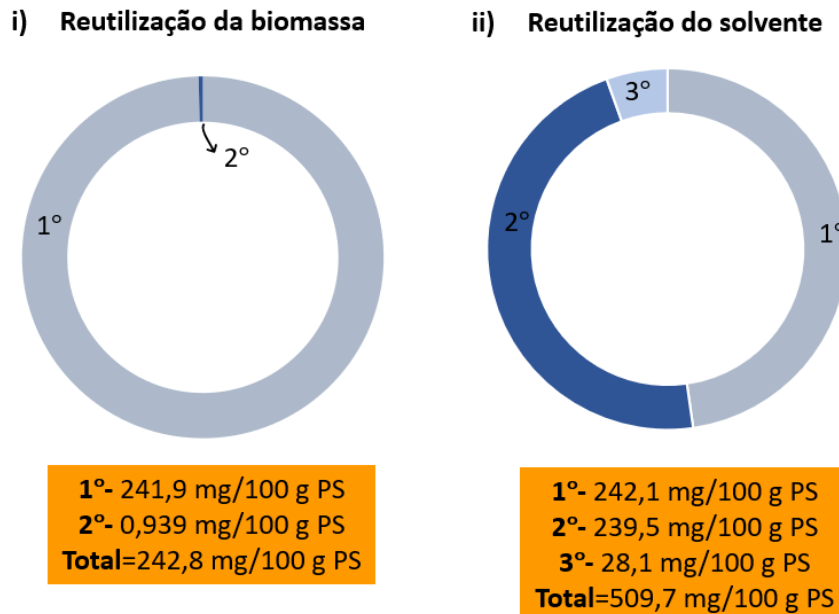


Figura 16- Representação gráfica do teor de rutina extraído de casca de banana madura com a reutilização de (i) biomassa e de (ii) solvente nas condições de extração otimizadas, utilizando uma solução aquosa de ácido acético 65 (m/m) %: T=25 °C; razão S/L=0,06.

Posto isto, passou-se ao estudo da reutilização do solvente de extração, ou seja, determinou-se quantos ciclos seriam necessários para saturar o solvente de extração, por forma a maximizar a relação entre o custo, a eficácia e a sustentabilidade do processo. Para tal, foram realizadas extrações sucessivas com a mesma mistura aquosa de ácido acético a 65 (m/m) %, sob as condições de extração otimizadas. Após cada extração, a mistura sólido-líquido foi filtrada, e o solvente de extração recuperado e reutilizado numa nova extração com casca de banana madura nova, durante três ciclos. Como se pode observar na Figura 16 (ii), o teor de rutina obtido no primeiro ciclo (≈ 240 mg/100 g PS) pode ser melhorado através da reutilização do solvente e utilização de biomassa “fresca”, atingindo um valor de 509,7 mg/100 g PS após o terceiro ciclo de reutilização do solvente, que corresponde a concentração total de rutina de 0,283 mg/g. Contudo, o teor de rutina extraído no terceiro ciclo foi bastante baixo (28,1 mg/100 g PS), assim a mistura aquosa de ácido acético a 65 (m/m) % pode ser utilizada em duas extrações sucessivas de rutina de casca de banana madura, sem diminuir o seu desempenho de extração. Também se determinou a solubilidade da rutina a 25 °C na solução aquosa de ácido acético a 65 (m/m) %, obtendo-se um valor de 0,292 mg/g, o que está de acordo com a concentração de rutina do extrato obtido após a reutilização

do solvente (0,283 mg/g). Para mais informações observar Apêndice C, Tabela C.10 e Tabela C.11.

Outra etapa necessária para garantir a viabilidade económica e sustentável do processo de extração em desenvolvimento, é a confirmação da reciclabilidade do solvente. Para tal, e dada a volatilidade do solvente em estudo, após a saturação do solvente de extração (2 ciclos de extração sólido-líquido), este foi recuperado por evaporação a pressão reduzida na linha de vácuo, e reutilizado. Sendo que este procedimento de extração até à saturação do solvente e recuperação do mesmo (ciclo de reciclabilidade) foi realizado num total de três vezes, os resultados obtidos encontram-se na Figura 17. Uma representação esquemática do processo proposto é fornecida na Figura 18.

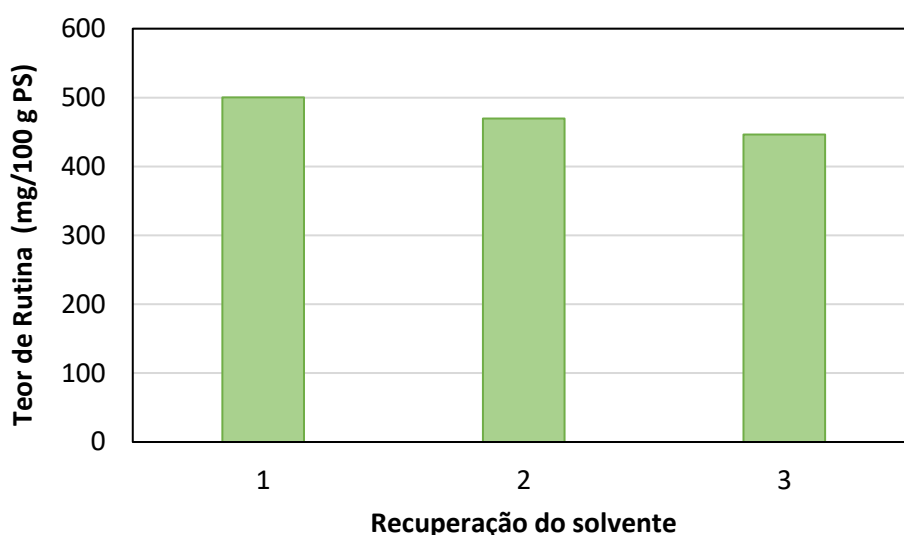


Figura 17- Representação gráfica do teor de rutina correspondente aos extratos obtidos em cada ciclo de reciclabilidade, utilizando as condições de extração otimizadas: T=25 °C; razão S/L=0,06.

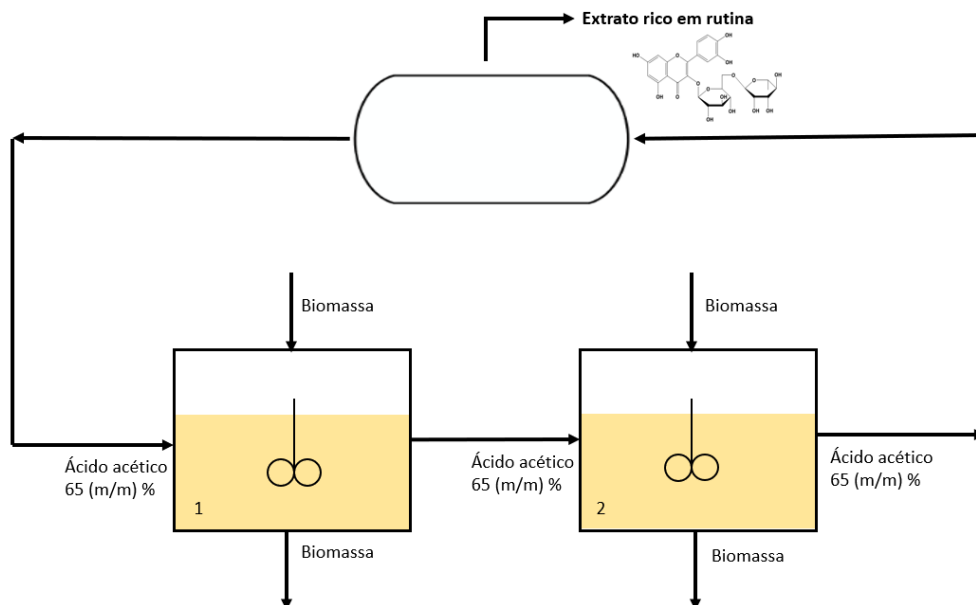


Figura 18- Representação esquemática do processo de extração de rutina de casca de banana.

Pela Figura 18 pode-se verificar que a eficiência de extração do solvente sofre um pequeno decréscimo com os ciclos de reciclabilidade do solvente, mais concretamente do primeiro para o terceiro ciclo observou-se uma perda de, aproximadamente, 11 % no teor de rutina extraído. Contudo a perda de eficiência é bastante baixa, demonstrando assim a viabilidade do processo de extração de rutina desenvolvido. Por outro lado, há que ter em conta que será necessário haver uma fonte de alimentação de solvente extra ao processo, já que durante as etapas de extração e recuperação do solvente existiram perdas de aproximadamente 6 (m/m) %. Por fim, é importante referir, que o precipitado obtido é rico em rutina, ou seja, este não é completamente puro, sendo que consoante a aplicação desejada poderá ou não haver a necessidade de um passo de purificação após a obtenção do precipitado.

Note-se ainda, que o solvente utilizado neste processo, mistura aquosa de ácido acético, é mais benigno em termos ambientais que os solventes orgânicos por norma utilizados. Para além disso, ainda tem a seu favor, que a sua utilização é aprovada pela comissão da união europeia como aditivo na indústria alimentar [48].

3.2.7. Conclusões

Verificou-se que, o teor de dopamina é maior para a casca de banana madura do que para as outras maturações em estudo, sendo por isso a mais indicada a utilizar no processo de extração de dopamina.

Constatou-se que, as misturas aquosas de ácidos orgânicos são uma opção viável para a extração de rutina. No caso da extração da rutina foi possível ir mais longe, e otimizar as condições de extração através do planeamento experimental, já que neste caso o teor de rutina não sofreu alterações com o aumento do tempo de armazenamento da biomassa. O resultado ótimo de teor de rutina alcançado foi de 238,5 mg/100 g PS, obtido a 25 °C, durante 80 minutos e com uma razão S/L de 0,06 e utilizando ácido acético 65 (m/m) %. Este valor é maior do que o obtido com solventes orgânicos nas mesmas condições de extração, sendo semelhante ao valor de extração obtido utilizando os solventes orgânicos com temperaturas mais elevadas e tempos de extração maiores. Assim, os resultados dos ácidos orgânicos mostraram ser uma boa alternativa comparativamente aos solventes convencionais utilizados na literatura.

Verificou-se ainda que os extratos obtidos apresentavam atividade antioxidante, em especial o extrato obtido nas condições ótimas de extração, suportando assim esta propriedade presente na rutina.

Por fim, a recuperação e reutilização da mistura aquosa de ácido acético foi estudada, por forma a avaliar a sustentabilidade do processo.

4. Conclusões e trabalho futuro

A dissertação em estudo teve como objetivo principal estudar e desenvolver o processo de extração sólido-líquido de dois componentes presentes na casca da banana: a dopamina e a rutina. Ambos os compostos apresentam características relevantes para a saúde humana.

Em relação à extração da dopamina, constatou-se que a casca da banana verde foi a que apresentou maior quantidade de dopamina das três maturações em estudo. A solução aquosa de ácido cítrico a 50 % (m/m) foi a mais eficiente na extração de dopamina, obtendo-se 57,9 mg/100 g PS de dopamina. Contudo, observou-se que a quantidade de dopamina na biomassa ao longo do tempo de armazenamento diminuía. Assim, seria necessário realizar as extrações num curto espaço de tempo, o que tornava o processo de otimização pouco viável. Sendo que, por isso o seu processo de extração não foi otimizado.

Já em relação à rutina, a casca de banana madura mostrou ser a mais rica neste biocomposto. O ácido acético a 65 % (m/m) foi o mais eficiente dos ácidos em estudo, conseguindo-se extrair cerca de 200 mg/100 g PS de rutina. Para além disso, no caso da rutina não se verificou que a sua quantidade na biomassa ao longo do tempo sofresse qualquer tipo de alteração. Posto isto, otimizou-se as condições de extração através de um planeamento experimental, sendo que para uma temperatura de 25 °C, com um tempo de extração de 80 minutos e uma razão sólido-líquido de 0,06, conseguiu-se obter 238,5 mg/100 g PS de rutina. Por fim, a recuperação e reutilização do solvente de extração também foram verificadas, contribuindo assim para o desenvolvimento de um processo sustentável.

Em suma, há que destacar que as misturas aquosas de ácidos orgânicos revelaram ser uma boa alternativa aos solventes orgânicos tradicionalmente utilizados na extração de biocompostos a partir de fontes naturais, contribuindo assim para o desenvolvimento de processos de extração mais eficientes e sustentáveis.

Como trabalho futuro, recomenda-se o estudo de outro tipo de solventes alternativos como por exemplo os solventes eutéticos, e/ou os bio-solventes, tendo em conta a sua baixa toxicidade. Outro aspeto importante que se deverá explorar num trabalho futuro é uma alternativa para o armazenamento da biomassa por forma a que

o teor de dopamina ao longo do tempo de armazenamento não se altere, e consequentemente tornar o seu processo de extração mais viável. Adicionalmente, também será interessante encontrar outras fontes naturais de dopamina, uma vez que os estudos que têm vindo a ser feitos focam-se essencialmente extração de dopamina de banana e da sua casca, ao contrário do que acontece com a rutina que existem estudos de várias fontes naturais. Por fim, no futuro também será interessante valorizar outro tipo de resíduos alimentares relacionados com a indústria alimentar portuguesa como por exemplo o azeite, laranja, castanha, etc.

5. Referências

- [1] FAO, "The State of Food and Agriculture," 2019.
[Online]. Available: <http://www.fao.org/3/CA6030EN/CA6030EN.pdf> (accessed May, 2020)
- [2] C. Schotten *et al.*, "Continuous Flow Metathesis for Direct Valorization of Food Waste: An Example of Cocoa Butter Triglyceride," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, pp. 1453–1459, 2015.
- [3] FAO, "Banana Market Review 2018," *Prelim. results 2018*, pp. 1–11, 2018.
- [4] R. C. Adão and M. B. A. Glória, "Bioactive amines and carbohydrate changes during ripening of 'Prata' banana (*Musa acuminata* x *M. balbisiana*)," *Food Chem.*, pp. 705–711, 2005.
- [5] M. Medasani, "Natural extract from whole banana fruit." 2013.
- [6] R. Prasad and S. B. Prasad, "A review on the chemistry and biological properties of Rutin, a promising nutraceutical agent," *Asian J. Pharm. Pharmacol.*, pp. 1–20, 2019.
- [7] N. J. Simpson, *Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications*. CRC Press, 2000.
- [8] R. González-Montelongo, M. Gloria Lobo, and M. González, "Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds," *Food Chem.*, pp. 1030–1039, 2010.
- [9] B. Gullón, T. A. Lú-Chau, M. T. Moreira, J. M. Lema, and G. Eibes, "Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability," *Trends Food Sci. Technol.*, pp. 220–235, 2017.
- [10] United States General Assembly, "Transforming our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development," 2015.
Available: <https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld> (accessed April, 2020)
- [11] P. Khawas, A. J. Das, and S. C. Deka, "Banana Peels and their Prospects for Industrial Utilization," in *Food Processing by- Products and their Utilization*, pp. 195–206. 2017
- [12] M. Shahbandeh, "Global fruit production in 2018, by selected variety (in million metric tons)," 2020.
[Online]. Available: www.statista.com/statistics/264001/worldwide-production-of-fruit-by-variety/ (accessed May, 2020).
- [13] Knoema, "Production statistics- crops, crops processed," 2019.
[Online]. Available: <https://knoema.com/FAOPRDSC2020/production-statistics-crops-crops-processed> (accessed June, 2020).
- [14] L. Oliveira, D. V. Evtuguin, N. Cordeiro, A. J. D. Silvestre, A. M. S. Silva, and I. C. Torres, "Structural characterization of lignin from leaf sheaths of 'dwarf cavendish' banana plant," *J. Agric. Food Chem.*, pp. 2598–2605, 2006.
- [15] J. S. Sidhu and T. A. Zafar, "Bioactive compounds in banana fruits and their health benefits," *Food Qual. Saf.*, pp. 183–188, 2018.
- [16] C. V. Borges *et al.*, "Bioactive amines changes during the ripening and thermal processes of bananas and plantains," *Food Chem.*, pp. 1-7, 2019.
- [17] C. V. Passo Tsamo *et al.*, "Phenolic profiling in the pulp and peel of nine plantain cultivars (*Musa* sp.)," *Food Chem.*, pp. 197–204, 2015.
- [18] W. Poewe, K. Seppi and C. Tanner "Parkinson disease" *Nat Rev Dis Primers* pp. 1-21, 2017.

- [19] L. Guo, Y. Zhang, and Q. Li, "Spectrophotometric determination of dopamine hydrochloride in pharmaceutical, banana, urine and serum samples by potassium ferricyanide-Fe(III)," *Anal. Sci.*, pp. 1451–1455, 2009.
- [20] S. Esmail, "The Diagnosis and Management of Parkinson's Disease," *Sch. J. Appl. Sci. Res.*, pp. 14–19, 2019.
- [21] S. McGuigan, S. H. Zhou, M. B. Brosnan, D. Thyagarajan, M. A. Bellgrove, and T. T. J. Chong, "Dopamine restores cognitive motivation in Parkinson's disease," *Brain*, pp. 719–732, 2019.
- [22] P. Seeman and H. H. M. Van Tol, "Dopamine receptor pharmacology," *Trends Pharmacol. Sci.*, pp. 264–270, 1994.
- [23] C. Bruno Bonnet *et al.*, "Effect of physiological harvest stages on the composition of bioactive compounds in Cavendish bananas," *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, pp. 270–278, 2013.
- [24] J. Szopa, G. Wilczyński, O. Fiehn, A. Wenczel, and L. Willmitzer, "Identification and quantification of catecholamines in potato plants (*Solanum tuberosum*) by GC-MS," *Phytochemistry*, pp. 315–320, 2001.
- [25] M. Singh, R. Govindarajan, A. K. S. Rawat, and P. B. Khare, "Antimicrobial Flavonoid Rutin from *Pteris Vittata* L. Against Pathogenic Gastrointestinal Microflora," *Am. Fern J.*, pp. 98–103, 2008.
- [26] M. W. Nam, J. Zhao, M. S. Lee, J. H. Jeong, and J. Lee, "Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: Application to flavonoid extraction from *Flos sophorae*," *Green Chem.*, pp. 1718–1727, 2015.
- [27] H. Qin, G. Zhou, G. Peng, J. Li, and J. Chen, "Application of Ionic Liquid-Based Ultrasound-Assisted Extraction of Five Phenolic Compounds from Fig (*Ficus carica* L.) for HPLC-UV," *Food Anal. Methods*, pp. 1673–1681, 2015.
- [28] K. Ameer, H. M. Shahbaz, and J. H. Kwon, "Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, pp. 295–315, 2017.
- [29] L. Angiolillo, M. A. Del Nobile, and A. Conte, "The extraction of bioactive compounds from food residues using microwaves," *Curr. Opin. Food Sci.*, pp. 93–98, 2015.
- [30] P. Kraujalis, P. R. Venskutonis, E. Ibáñez, and M. Herrero, "Optimization of rutin isolation from *Amaranthus paniculatus* leaves by high pressure extraction and fractionation techniques," *J. Supercrit. Fluids*, pp. 1–34, 2015.
- [31] S. I. Behiry *et al.*, "Antifungal and antibacterial activities of *Musa paradisiaca* L. peel extract: HPLC analysis of phenolic and flavonoid contents," *Processes*, pp. 1–11, 2019.
- [32] P. Yingyuen, S. Sukrong, and M. Phisalaphong, "Isolation, separation and purification of rutin from Banana leaves (*Musa balbisiana*)," *Ind. Crops Prod.*, pp. 1–9, 2020.
- [33] A. Chafer, M. C. Pascual-Martí, A. Salvador, and A. Berna, "Supercritical fluid extraction and HPLC determination of relevant polyphenolic compounds in grape skin," *J. Sep. Sci.*, pp. 2050–2056, 2005.
- [34] A. L. Dawidowicz, D. Wianowska, and B. Baraniak, "The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts)," *LWT - Food Sci. Technol.*, pp. 308–315, 2006.
- [35] T. Jerman, P. Trebše, and B. Mozetič Vodopivec, "Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds," *Food Chem.*, pp. 175–182, 2010.
- [36] Y. Y. Thoo, S. K. Ho, F. Abas, O. M. Lai, C. W. Ho, and C. P. Tan, "Optimal binary solvent extraction system for phenolic antioxidants from mengkudu (*Morinda citrifolia*) fruit," *Molecules*, pp. 7004–7022, 2013.

- [37] A. M. Engida, N. S. Kasim, Y. A. Tsigie, S. Ismadji, L. H. Huynh, and Y. H. Ju, "Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarang semut (*Myrmecodia pendan*)," *Ind. Crops Prod.*, pp. 392–396, 2013.
- [38] N. Mahato, M. Sinha, K. Sharma, R. Koteswararao, and M. H. Cho, *Modern extraction and purification techniques for obtaining high purity food-grade bioactive compounds and value-added co-products from citrus wastes*, pp. 1-81, 2019.
- [39] N. Uppugundla *et al.*, "Switchgrass water extracts: extraction, separation and biological activity of rutin and quercitrin," *J. Agric. Food Chem.*, pp. 7763–7770, 2009.
- [40] L. Wang and C. L. Weller, "Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants," *Trends Food Sci. Technol.*, pp. 300–312, 2006.
- [41] M. D. Luque de Castro and L. E. García-Ayuso, "Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future," *Anal. Chim. Acta*, pp. 1–10, 1998.
- [42] D. Naviglio, P. Scarano, M. Ciaravolo and M. Gallo "Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): A Powerful and Greener Alternative to the Latest Solid-Liquid Extraction Techniques," *Foods*, pp.1-22, 2019.
- [43] H. Gomes, "Extração de cafeína de borras de café utilizando soluções aquosas de líquidos iônicos," Universidade de Aveiro, pp. 1-60, 2015.
- [44] M. Meireles, *Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications*. CRC Press, 2008.
- [45] F. Pena-Pereira and J. Namieśnik, "Ionic liquids and deep eutectic mixtures: Sustainable solvents for extraction processes," *ChemSusChem*, pp. 1784–1800, 2014.
- [46] L. S. Chua, "A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities," *J. Ethnopharmacol.*, pp. 805–817, 2013.
- [47] J. B. Silva, "Extração e purificação de levodopa de sementes de mucuna utilizando solventes alternativos," Univesidade Federal de Viçosa, pp. 1-50, 2019.
- [48] E. Comission, "EU Food Additives: making our food safer," 2013.
[Online].
Available:https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/MEMO_13_480
(accessed June, 2020)
- [49] S. P. M. Ventura, F. A. E Silva, M. V. Quental, D. Mondal, M. G. Freire, and J. A. P. Coutinho, "Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends," *Chem. Rev.*, pp. 6984–7052, 2017.
- [50] P. Luliński and D. Maciejewska, "Effective separation of dopamine from bananas on 2-(3,4-dimethoxyphenyl) ethylamine imprinted polymer," *J. Sep. Sci.*, pp. 1050–1057, 2012.
- [51] D. M. M. Silva, "Desenvolvimento de um método analítico para quantificação de catecolaminas por LC-MS/MS," Coimbra, pp. 1-144, 2015.
- [52] E. L. P. De Faria, A. M. Ferreira, A. F. M. Cláudio, J. A. P. Coutinho, A. J. D. Silvestre, and M. G. Freire, "Recovery of Syringic Acid from Industrial Food Waste with Aqueous Solutions of Ionic Liquids," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, pp. 14143–14152, 2019.
- [53] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity," *LWT - Food Sci. Technol.*, pp. 25–30, 1995.
- [54] K. Kanazawa and H. Sakakibara, "High content of dopamine, a strong antioxidant, in cavendish banana," *J. Agric. Food Chem.*, pp. 844–848, 2000.
- [55] A. F. M. Cláudio, A. M. Ferreira, M. G. Freire, and J. A. P. Coutinho, "Enhanced extraction of caffeine from guaraná seeds using aqueous solutions of ionic liquids," *Green Chem.*, pp. 2002–2010, 2013.

- [56] H. Li, L. Pordesimo, and J. Weiss, "High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans," *Food Res. Int.*, pp. 731–738, 2004.

Apêndice A – Procedimento experimental

Otimização das condições de extração através do planejamento experimental

Tabela A.1- Níveis codificados das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial.

Símbolo	Nível				
	Axial	Fatorial	Central	Fatorial	Axial
-	1,682	-1	0	1	1,68
T	24,5	30	38	46	51,4
t	9,5	30	60	90	110
R	0,016	0,050	0,100	0,150	0,184

Tabela A.2- Planejamento Fatorial.

	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

Apêndice B – Dados experimentais da extração de dopamina

Extração sólido-líquido

Tabela B.1- Valores obtidos de teor de dopamina extraída a partir de três tipos de maturação de casca de banana, utilizando metanol a várias concentrações e respectivos desvios padrão.

Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; S/L R=0,1.

Banana	Concentração (m/m%)	Teor extraído (mg/100 g PS)	Desvio Padrão
Verde	100	33,7	1,17
Verde	75	33,0	1,04
Verde	50	28,3	1,35
Semi-madura	100	14,3	0,420
Semi-madura	75	14,3	0,495
Semi-madura	50	13,0	0,038
Madura	100	14,3	2,36
Madura	75	14,9	0,011
Madura	50	14,0	2,19

Tabela B.2- Valores obtidos de teor de dopamina extraída a partir da casca de banana verde, utilizando vários solventes a diferentes concentrações e respectivos desvios padrão. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; S/L R=0,1.

Solvente	Concentração (m/m%)	Teor extraído (mg/100 g PS)	Desvio Padrão
Metanol	100	38,7	1,34
Etanol	100	28,7	1,75
Ácido Lático	100	8,18	1,12
Ácido Lático	75	22,4	0,241
Ácido Lático	50	31,7	1,25
Ácido Lático	25	23,0	0,797
Ácido Glicólico	75	19,1	4,61
Ácido Glicólico	50	23,6	3,87
Ácido Glicólico	25	20,1	1,96
Ácido Cítrico	75	35,2	1,34
Ácido Cítrico	50	58,0	3,26
Ácido Cítrico	25	47,6	1,12
Ácido Acético	100	6,08	1,00
Ácido Acético	75	13,4	1,76
Ácido Acético	50	16,0	0,228
Ácido Acético	25	14,1	0,245
Água	100	23,3	0,243
Água acidificada (pH=3,01)	100	24,5	0,556

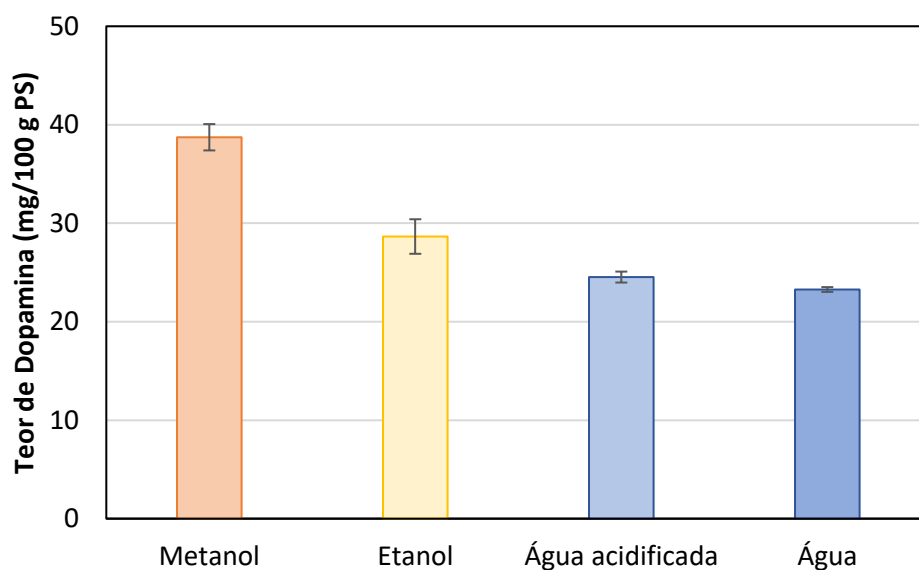


Figura B.1- Representação gráfica da influência da utilização de diferentes solventes utilizados no processo de extração de dopamina a partir da casca de banana verde utilizando solventes orgânicos e água. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; S/L R=0,1, utilizando solventes puros.

Tabela B.3- Valores obtidos de teor de dopamina extraída a partir da mesma biomassa de casca de banana verde ao longo do tempo, utilizando metanol puro e respectivos desvios padrão. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; S/L R=0,1.

Data	Teor extraído (mg/100 g PS)	Desvio Padrão
Novembro 2019	38,7	1,34
Dezembro 2019	18,5	0,88
Janeiro 2020	9,62	0,58

Apêndice C – Dados experimentais da extração de rutina

Extração sólido-líquido

Tabela C.1- Valores obtidos de teor de rutina extraída a partir de três tipos de maturação de casca de banana, utilizando metanol a várias concentrações e respectivos desvios padrão.

Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; S/L R=0,1.

Banana	Concentração (m/m%)	Teor extraído (mg/100 g PS)	Desvio Padrão
Verde	100	10,7	0,324
Verde	75	11,5	0,761
Verde	50	13,5	0,591
Semi-madura	100	22,3	0,350
Semi-madura	75	17,5	0,023
Semi-madura	50	29,1	3,27
Madura	100	25,9	1,29
Madura	75	24,1	4,28
Madura	50	41,9	0,82

Tabela C.2- Valores obtidos de teor de rutina extraída a partir da mesma biomassa de casca de banana madura ao longo do tempo, utilizando metanol puro e respectivos desvios padrão.

Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; S/L R=0,1.

Data	Teor extraído (mg/100 g PS)	Desvio Padrão
Novembro 2019	29,9	1,51
Dezembro 2019	33,1	1,08
Janeiro 2020	28,3	0,872

Tabela C.3- Valores obtidos de teor de rutina extraída a partir da casca de banana madura, utilizando vários solventes a diferentes concentrações e respectivos desvios padrão. Condições de extração: t=60 min; T=25 °C; S/L R=0,1.

Solvente	Concentração (m/m%)	Teor extraído (mg/100 g PS)	Desvio Padrão
Metanol	100	11,8	1,76
Etanol	100	14,6	0,416
Ácido Lático	100	68,4	1,80
Ácido Lático	75	67,0	0,949
Ácido Lático	50	60,6	1,82
Ácido Lático	25	40,0	2,26
Ácido Glicólico	75	55,7	2,02
Ácido Glicólico	50	56,4	1,91
Ácido Glicólico	25	37,8	1,42
Ácido Cítrico	75	82,5	1,87
Ácido Cítrico	50	48,1	0,0175
Ácido Cítrico	25	41,8	1,72
Ácido Acético	100	40,4	1,03
Ácido Acético	75	181,6	15,0
Ácido Acético	50	158,5	2,73
Ácido Acético	25	35,3	1,84
Água	100	5,63	1,64
Água acidificada (pH=3,01)	100	6,32	0,44

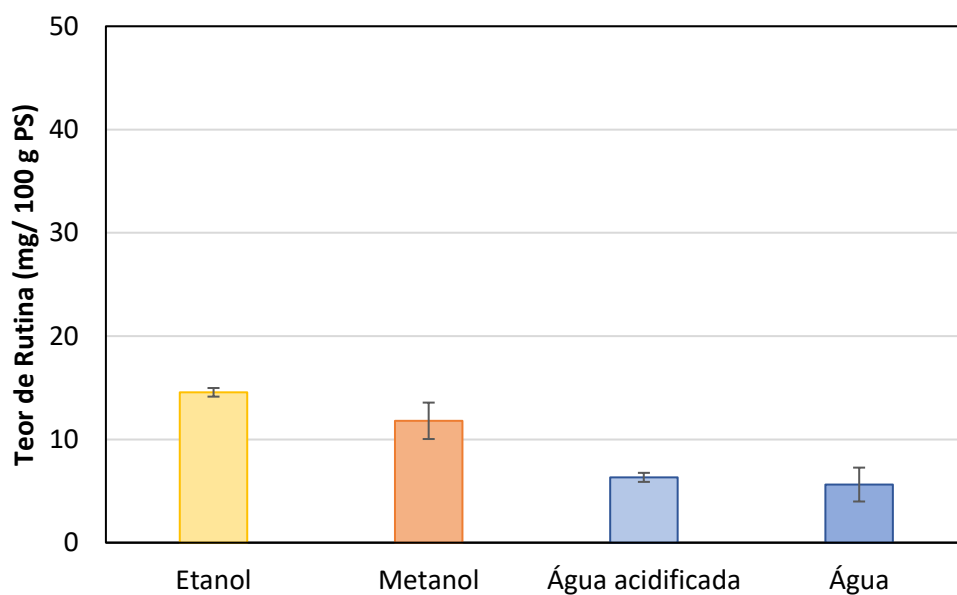


Figura C.1- Representação gráfica da influência da utilização de diferentes solventes utilizados no processo de extração de rutina a partir da casca de banana madura utilizando solventes orgânicos e água. Condições de extração: $t=60$ min; $T=25$ °C; $S/L R=0,1$, utilizando solventes puros.

Otimização das condições de extração através do planejamento experimental

Tabela C.4- Valores obtidos de teor de rutina extraída a partir da casca de banana madura, utilizando ácido acético a diferentes concentrações e desvios padrão. Condições de extração: $t=60$ min; $T=25$ °C; $S/L R=0,1$.

Concentração do solvente (m/m%)	Teor extraído (mg/100 g PS)	Desvio Padrão
100	40,4	1,03
85	177,0	11,67
75	181,6	2,52
65	192,4	0,96
50	158,5	2,73
25	35,3	1,84

Tabela C.5- Valores obtidos de teor de rutina extraída a partir da casca de banana madura, utilizando ácido acético a 65 (m/m) % e as respectivas condições de extração.

Condições	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Razão S/L	Teor extraído (mg/100 g PS)
1	30	30	0,05	219,2
2	46	30	0,05	162,6
3	30	90	0,05	280,3
4	46	90	0,05	117,6
5	30	30	0,15	180,3
6	46	30	0,15	135,2
7	30	90	0,15	171,5
8	46	90	0,15	141,2
9	24	60	0,10	158,0
10	51	60	0,10	186,4
11	38	10	0,10	170,2
12	38	110	0,10	195,4
13	38	60	0,016	148,2
14	38	60	0,18	178,1
15	38	60	0,10	184,6
16	38	60	0,10	172,4
17	38	60	0,10	197,0
18	38	60	0,10	174,3
19	38	60	0,10	178,7
20	38	60	0,10	188,5

Tabela C.6- Coeficientes de regressão do modelo polinomial de segunda ordem previsto para o rendimento de extração de rutina obtido a partir do planeamento experimental.

	Coeficientes de regressão	Desvio Padrão	t-student (10)	p-value
Interceção	164,57	54,1929	3,03676	0,028857
(1)T (°C)(L)	3,28	2,2986	1,42529	0,008925
T (°C)(Q)	-0,11	0,0280	-3,98320	0,010497
(2)t (min)(L)	1,99	0,4801	4,14832	0,213392
t (min)(Q)	0,00	0,0020	-1,45592	0,205186
(3)razão S/L(L)	-1051,09	288,0617	-3,64885	0,014766
razão S/L(Q)	-4235,58	715,5413	-5,91941	0,001961
1L by 2L	-0,03	0,0100	-3,37742	0,019730
1L by 3L	51,68	5,9981	8,61602	0,000348
2L by 3L	-2,76	1,5995	-1,72617	0,144905

Tabela C.7- Tabela da ANOVA para o planeamento fatorial 2³.

	SS	DF	Média	F	p-value
Regressão	10319,58	9	1146,62	23,93	0,000013
Residual	479,09	10	47,91		
Total	10798,67				

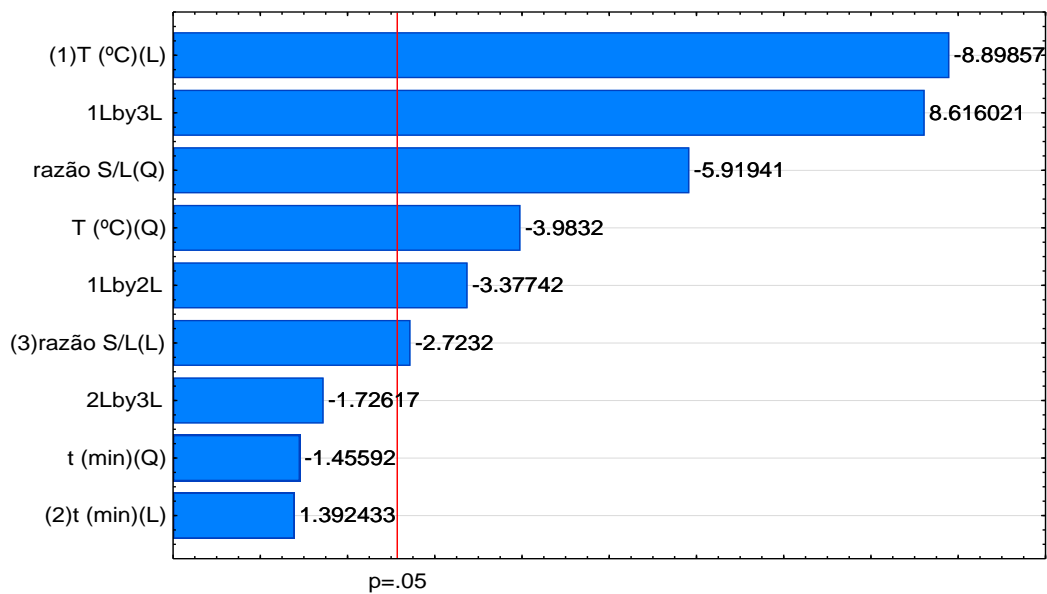


Figura C.2- Diagrama de Pareto do planejamento experimental relativo à influência das variáveis independentes (tempo, temperatura e razão sólido/líquido) no processo de extração de rutina a partir de casca de banana madura, utilizando ácido acético 65 (m/m) % como solvente.

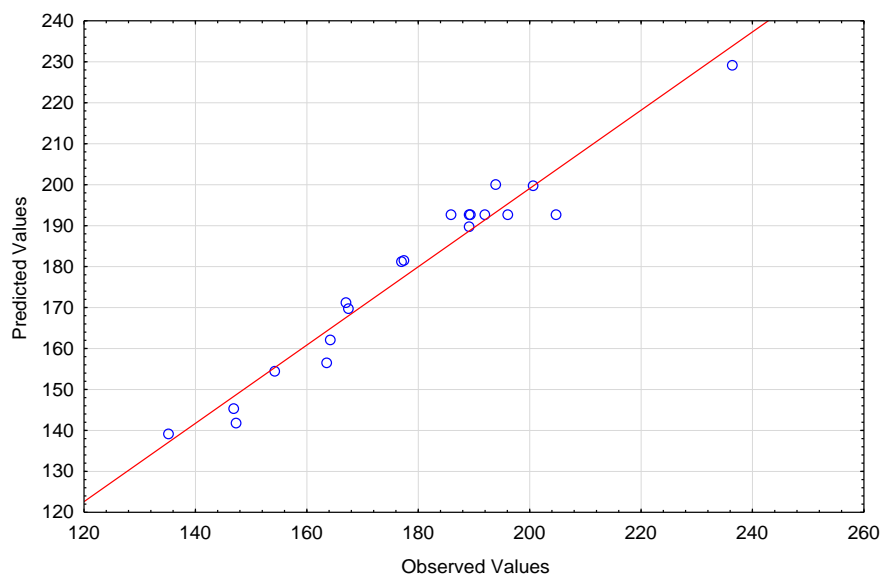


Figura C.3- Valores observados vs valores previstos.

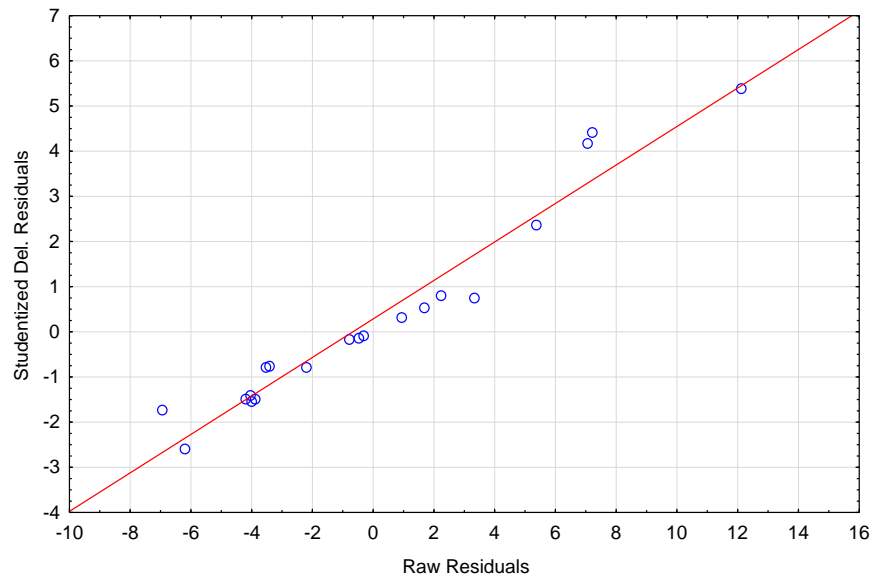


Figura C.4- Distribuição de resíduos.

Tabela C.8- Valores obtidos de teor de rutina extraída a partir da casca de banana madura, utilizando ácido acético a 65 (m/m) % e respectivos desvios padrão.

Condições	Tempo de extração (min)	Teor extraído (mg/100 g PS)	Desvio Padrão
1	110	242,2	11,0
2	80	238,5	4,43
3	50	209,8	3,07

Atividade antioxidante dos extratos

Tabela C.9- Valores obtidos de atividade antioxidante extraída a partir da casca de banana madura, utilizando diferentes solventes com dois tempos de extração às condições ótimas de extração: T=25 °C; S/L R=0,06.

Solvente	Concentração (m /m%)	Tempo de extração (min)	Atividade antioxidante (mg/100 g PS)	Desvio Padrão
Etanol	100	110	34,2	6,98
Metanol	100	110	29,6	5,96
Água	100	110	18,0	3,97
Ácido Acético	65	110	62,6	7,98
Etanol	100	80	34,4	9,90
Metanol	100	80	28,3	1,99
Água	100	80	14,6	7,94
Ácido Acético	65	80	63,1	9,90

Reutilização da biomassa e reciclabilidade do solvente

Tabela C.10- Valores obtidos de teor de rutina extraída a partir da casca de banana madura, utilizando ácido a acético 65 (m/m) % referente à recirculação da biomassa. Condições de extração: t=80 min; T=25 °C; S/L R=0,06.

Ciclo	Teor extraído (mg/100 g PS)
1	241,9
2	0,9391

Tabela C.11- Valores obtidos de teor de rutina extraída a partir da casca de banana madura, utilizando ácido acético a 65 (m/m) % referente à reciclabilidade do solvente. Condições de extração: t=80 min; T=25 °C; S/L R=0,06.

Ciclo	Teor extraído (mg/100 g PS)
1	242,1
2	239,5
3	28,07
4	0