

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Extração ambientalmente amigável de saponinas das folhas
do lúpulo (*Humulus lupulus* L.)**

Giovanna de Barros Franco Spíndola

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Bacharela em Ciências dos Alimentos

**Piracicaba
2024**

Giovanna de Barros Franco Spíndola

**Extração ambientalmente amigável de saponinas das folhas
do lúpulo (*Humulus lupulus* L.)**

Orientador(a):

Prof^a Dr^a **WANESSA MELCHERT MATTOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte
dos requisitos para obtenção do título de Bacharela em
Ciências dos Alimentos

**Piracicaba
2024**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão, pelo amor incondicional, dedicação e incentivo em todas as etapas da minha vida. Vocês são meu alicerce e minha maior motivação, sempre acreditando em mim e me encorajando a perseguir meus sonhos. Esta conquista também pertence a vocês. Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela minha vida, e por me guiar e me fortalecer com sabedoria e resiliência em todos os momentos dessa jornada.

À minha família, expresso minha imensa gratidão. Aos meus pais, Débora e Danilo, e ao meu irmão, Nicolas, por serem meu porto seguro, pelo apoio e incentivo constantes que me motivaram na realização desse sonho. Agradeço ao meu avô Flávio, pelas palavras de sabedoria e exemplo de perseverança. À minha prima Júlia, sou grata pelo companheirismo, me trazendo alegria e encorajamento essenciais nessa trajetória. E aos demais familiares, agradeço pelo carinho e apoio inestimáveis.

Agradeço ao meu namorado, Eduardo, pelo carinho e compreensão, por estar ao meu lado em todos os momentos me incentivando para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Aos meus sogros, Maria Alice e Valter, e aos meus cunhados e sobrinho, Caroline, Mateus e Ravi, por me acolherem com tanto afeto, pelo suporte e motivação constante.

A minha amiga Maryane, pela amizade que a faculdade me proporcionou e que levarei para a vida, minha gratidão pela companhia em tantos momentos cruciais nessa caminhada. Às demais amigas, Anna, Carolina, Caroline C., Ingrid e Thamires, sou igualmente grata pela amizade, companhia e por todo o apoio.

Expresso minha imensa gratidão à minha orientadora, Profa. Dra. Wanessa Melchert Mattos, pela oportunidade e confiança para a realização desse projeto, como também agradeço pela sua sabedoria, paciência e por me guiar com tanta excelência ao longo desta jornada.

Aos membros do Laboratório de Analítica e Química de Alimentos (LAQA) da ESALQ, por todos os momentos compartilhados e por todo o aprendizado. Em especial, agradeço ao MSc. Winston Gomes, pelo seu auxílio e apoio constantes no desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade de São Paulo e à ESALQ, sou grata por me proporcionarem um ambiente acadêmico enriquecedor e por todo o suporte durante minha formação.

Aos membros da banca examinadora, agradeço pela disponibilidade, pelas contribuições e sugestões essenciais para o aprimoramento deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para alcançar esse objetivo, enriquecendo minha trajetória acadêmica e profissional.

EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1 Resíduos agroindustriais	15
2.1.1 Classificação dos resíduos agroindustriais.....	15
2.1.1.1 Resíduos da produção do lúpulo	16
2.1.2 Impacto dos resíduos agroindustriais	17
2.1.3 Métodos para a valorização dos resíduos agroindustriais	18
2.2 Saponinas	19
2.2.1 Aspectos gerais das saponinas	20
2.2.2 Propriedades e aplicações das saponinas.....	22
2.3 Extração de saponinas	24
2.3.1 Pré-tratamento da amostra	24
2.3.2 Métodos de extração.....	24
2.3.2.1 Métodos convencionais	24
2.3.2.2 Tecnologias verdes	25
2.3.2.2.1 Extração assistida por ultrassom	26
2.3.3 Quantificação de saponinas	28
2.4 Química analítica verde	29
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Amostras, reagentes e soluções	31
4.1.1 Obtenção e preparo das amostras.....	31
4.1.2 Desengorduramento das amostras	31
4.2 Extratos.....	32
4.2.1 Tecnologia verde: Extração assistida por ultrassom	32
4.2.2 Metodologia convencional para comparação: Maceração	32
4.3 Determinação de saponinas	32
4.4 Análises estatísticas e planejamentos experimentais	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Otimização.....	35
5.1.1 Planejamento fatorial 2^4 com 3 pontos centrais.....	35

<i>5.1.2 Planejamento fatorial 2^2 com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais.....</i>	<i>37</i>
<i>5.2 Metodologia de comparação.....</i>	<i>40</i>
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
REFERÊNCIAS	42

RESUMO

Extração ambientalmente amigável de saponinas das folhas do lúpulo (*Humulus lupulus* L.)

Os resíduos agroindustriais representam um problema ambiental crescente, inclusive no cultivo do lúpulo (*Humulus lupulus* L.), que gera grandes quantidades de folhas e caules como subprodutos. No entanto, esses resíduos apresentam alto potencial de valorização por conterem compostos de interesse comercial, como saponinas, que são glicosídeos anfifílicos, classificados como triterpênicos ou esteroidais, e apresentam propriedades surfactantes e capacidade de formação de espuma em meio aquoso. Esses compostos estão presentes em mais de 100 famílias de plantas, como também nas folhas do lúpulo. Possuem diversas propriedades, incluindo atividades anticancerígenas, anti-inflamatórias, antivirais, hemolíticas e antimicrobianas, sendo usadas na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia. As saponinas são comumente extraídas por métodos convencionais, porém estes consomem grandes quantidades de solventes tóxicos, longos tempos de extração e emprego de altas temperaturas, que pode levar à degradação de compostos sensíveis. Diante disso, as técnicas de extração conhecidas como limpas ou verdes são preferíveis, por empregarem processos otimizados, minimizando o impacto ambiental por meio da redução do uso de solventes tóxicos e utilização de matérias-primas renováveis. O objetivo do presente trabalho foi o estudo de métodos de extração verdes de saponinas da folha do lúpulo. As eficiências das extrações foram avaliadas pelo método espectrofotométrico da reação da saponina com vanilina em meio fortemente oxidante com o ácido sulfúrico. Para isso, inicialmente foram avaliados diferentes instrumentos (banho Dubnoff, banho ultrassônico e mesa agitadora) e solventes (água e mistura água/etanol) para promover a extração da saponina com as variedades da folha do lúpulo Zeus e Comet, a partir desses resultados o banho ultrassônico, solvente mistura água/etanol e variedade Zeus foram selecionados para realização da otimização dos parâmetros a partir de planejamentos fatoriais, além da comparação da extração verde ideal com o método convencional de maceração. Dentro dos procedimentos estudados, a extração em banho ultrassônico com menor massa de amostra (5 mg) e maior proporção de solvente extrator (100% etanol) apresentou resultados mais eficientes, alcançando rendimento de $49,46 \pm 4,10$ g de saponinas 100 g^{-1} de amostra desengordurada.

Palavras-chave: Compostos bioativos; Extração sustentável; Resíduos agroindustriais; Ultrassom

ABSTRACT

Extraction environmentally friendly of saponins from hop leaves (*Humulus lupulus* L.)

Agro-industrial waste represent a growing environmental problem, including in the cultivation of hops (*Humulus lupulus* L.), which generates large quantities of leaves and stems as byproducts. However, these residues have significant valorization potential due to the presence of commercially valuable compounds such as saponins, which are amphiphilic glycosides classified as triterpenic or steroidal. Saponins exhibit surfactant properties and foam-forming capacity in aqueous solutions. These compounds are present in more than 100 plant families, as well as in hop leaves. They have several properties, including anticancer, anti-inflammatory, antiviral, hemolytic, and antimicrobial activities, making them valuable in the cosmetic, pharmaceutical, and food industries. Saponins are commonly extracted through conventional methods, but they consume large amounts of toxic solvents, long extraction times and high temperatures, which can lead to the degradation of sensitive compounds. Therefore, the techniques known as clean or green extraction are preferable because they employ optimized processes that minimize environmental impact by reducing toxic solvent usage and using renewable raw materials. The objective of this work was to study methods of extracting saponins from hop leaves. Extraction efficiencies were evaluated using the spectrophotometric method of the saponin reaction with vanillin in a strongly oxidizing medium with sulfuric acid. To achieve this, different instruments (Dubnoff bath, ultrasonic bath and orbital shaker) and solvents (water and water/ethanol mixture) to promote saponin extraction were initially tested on Zeus and Comet hop leaf varieties. Based on these results, the ultrasonic bath, water/ethanol solvent mixture, and Zeus variety were selected for parameter optimization using factorial designs, in addition to comparing the optimal green extraction with the conventional maceration method. Among the procedures studied, ultrasonic bath extraction with a smaller sample mass (5 mg) and a higher proportion of extraction solvent (100% ethanol) presented the most efficient results, yielding 49.46 ± 4.10 g saponins 100 g^{-1} of defatted sample.

Keywords: Agro-industrial waste; Bioactive compounds; Sustainable extraction; Ultrasound

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sistema de cultivo da plantação de lúpulo (a) e cones de lúpulo (b) na Fazenda Brava Grande (Fartura - SP).....	16
Figura 2 – Estrutura da saponina esteroideal com 4 cadeias de açúcares.....	20
Figura 3 – Estruturas representativas de sapogenina (a) triterpênica (ácido oleanólico) e (b) esteroideal (diosgenina).....	21
Figura 4 – Exemplo da estrutura de um glicoalcalóide esteroideal (solasodina).....	21
Figura 5 – Mecanismo da extração assistida por ultrassom: (a) o ultrassom atua na célula, (b) ocorre a ruptura celular, (c) os compostos de interesse presentes na célula são liberados.....	27
Figura 6 – Representação dos equipamentos ultrassônicos: banho (a, b) e sonda (c, d).....	27
Figura 7 – Gráfico de pareto com valores de efeito.....	36
Figura 8 – Gráfico de superfície de resposta para os efeitos massa da amostra e volume de etanol.....	38
Figura 9 – Gráfico de resposta da extração de saponinas pelo estudo de ascendência ao máximo.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tecnologias verdes aplicadas para extração de saponinas.....	33
Tabela 2 – Resultados das extrações com tecnologias verdes utilizando diferentes solventes...	34
Tabela 3 – Resultados obtidos pelo planejamento fatorial 2^4 com 3 pontos centrais.....	35
Tabela 4 – Resultados obtidos pelo planejamento fatorial 2^2 com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGREE	<i>Analytical GREEnness Metric Approach and Software</i> (Métrica analítica de sustentabilidade)
AMVI	<i>Analytical Method Volume Intensity</i>
ANOVA	Análise de Variância
CR	<i>Crop Residues</i> (Resíduos de culturas)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
GAPI	<i>Green Analytical Procedure Index</i> (Índice de Procedimento Analítico Verde)
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
HPLC-EAT	<i>HPLC Environmental Assessment Tool</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Ferramenta de Avaliação Ambiental)
NEMI	<i>National Environmental Methods Index</i> (Índice Nacional de Métodos Ambientais)
RPM	Rotações por minuto
TLC	<i>Thin layer chromatography</i> (Cromatografia de camada delgada)
UPLC	<i>Ultra-performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de ultra eficiência)
UV-Vis	Ultravioleta e Visível

1. INTRODUÇÃO

Os resíduos provenientes das atividades agrícolas e agroindustriais estão em constante crescimento devido ao aumento da produção de bens essenciais à vida (TARIQ *et al.*, 2023; TRIPATHI *et al.*, 2019). Dois grupos principais classificam esses resíduos: à base de plantas (incluem folhas, caules e sementes) e de origem animal (JAYATHILAKAN *et al.*, 2012; SHINDE *et al.*, 2022; SINGH *et al.*, 2021). Sem tratamento adequado, esses resíduos agroindustriais causam impactos ambientais, econômicos e sociais cada vez mais significativos (DUHAN, J.; DUHAN, S.; SADH, 2018; FREITAS *et al.*, 2021; KARAK *et al.*, 2015; VARMA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016).

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma das plantas cultivadas que gera grande volume de resíduos durante a colheita. Os cones de lúpulo são utilizados na produção de cerveja (ALMAGUER *et al.*, 2014; GERHÄUSER, 2005a), e esses cones são separados das folhas e caules, que frequentemente são tratados como resíduos e permanecem nas fazendas. Aproximadamente um terço da biomassa total do lúpulo corresponde aos cones, enquanto os outros dois terços consistem de folhas, caules e cones não colhidos (AFONSO *et al.*, 2021; HRNČIČ *et al.*, 2019; KOPEĆ *et al.*, 2022).

Os resíduos agroindustriais, incluindo os resíduos do cultivo do lúpulo, apresentam na composição vasta quantidade de substâncias com alto potencial de valorização, como os compostos bioativos que possuem propriedades antioxidantes e antimicrobianas, contribuindo para o bem-estar e saúde humana, dentre eles estão os fenólicos, saponinas, ácidos orgânicos, fitosteróis e carotenoides (CARBINELL-CAPELLA *et al.*, 2014; CORREIA *et al.*, 2012; SERRANO-LÉON *et al.*, 2018).

As saponinas pertencem ao grupo dos glicosídeos e sua função inclui atuar em interfaces, reduzindo a tensão superficial da água e promovendo a formação de espuma em soluções aquosas (MAN *et al.*, 2010; OAKENFULL, 1981; PRICE; JOHNSON; FENWICK, 1987). Por muitos anos, as saponinas foram consideradas antinutrientes, porém recentemente vêm ganhando destaque devido às diversas propriedades funcionais, sendo amplamente exploradas em várias indústrias, como a alimentícia, cosmética e farmacêutica (GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ; MAZZA, 2007; DAFFODIL; MOHAN; TRESINA, 2016; SHI *et al.*, 2004; SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004).

As propriedades das saponinas incluem suas capacidades como agentes espumantes e emulsificantes (PRICE; JOHNSON; FENWICK, 1987; SPARG; LIGHT;

VAN STADEN, 2004), ação anticancerígena, anti-inflamatória, antiviral, atividade hemolítica e efeito hipocolesterolêmico (MILGATE; ROBERTS, 1995; SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004), bem como atividades antimicrobianas, inseticidas e moluscicidas (SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004), e ação como conservante no controle da deterioração microbiana (MIYAKOSHI *et al.*, 2000; PIORKOWSKI; MCCLEMENTS, 2014; PRICE; JOHNSON; FENWICK, 1987).

Para extração das saponinas podem ser usadas as técnicas convencionais (maceração, Soxhlet e sob refluxo) e as tecnologias verdes (ultrassom, micro-ondas e acelerada por solvente) (HENG *et al.*, 2013). Embora os métodos convencionais ainda sejam os mais utilizados, possuem desvantagens, como grande consumo de solvente, longos tempos e uso de altas temperaturas. Por outro lado, as técnicas de extração verdes minimizam o uso de solventes tóxicos, utilizam matérias-primas renováveis, realizam sínteses químicas menos perigosas e reduzem a poluição, seguindo assim os princípios da química verde (ANASTAS; EGHBALI, 2009; AZMIR *et al.*, 2013; YUSOFF *et al.*, 2022).

A extração assistida por ultrassom tem se destacado pela eficiência, uma vez que requer menores volumes de solvente, reduz o tempo de extração e minimiza a degradação de compostos sensíveis ao calor. O processo baseia-se no fenômeno da cavitação, que rompe a estrutura celular da matriz, facilitando a liberação e extração dos compostos de interesse (DAI; MUMPER, 2010; FU *et al.*, 2021; GIL-MARTÍN *et al.*, 2022).

Para quantificação das saponinas extraídas de materiais vegetais são comumente empregados os métodos espectrofotométricos e cromatográficos (CHEOK; SALMAN; SULAIMAN, 2014). O ensaio de vanilina com ácido sulfúrico, proposto por Hiai *et al.* (1976), é o método mais utilizado para a análise espectrofotométrica, no qual as saponinas oxidadas reagem com a vanilina, enquanto o ácido sulfúrico atua como oxidante, gerando reação colorimétrica que permite a quantificação de saponinas totais.

Neste contexto, o presente estudo avalia e otimiza a extração de saponinas a partir de resíduos agroindustriais gerados pelo cultivo do lúpulo, utilizando tecnologias verdes, como a extração assistida por ultrassom.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Resíduos agroindustriais

O crescimento da população global resulta em demanda crescente por bens essenciais à manutenção da vida, e a agricultura e as agroindústrias são setores primários responsáveis pelo incremento produtivo necessário para suprir essa demanda (TARIQ *et al.*, 2023). No entanto, essas atividades geram volumes significativos de resíduos (TRIPATHI *et al.*, 2019).

2.1.1 Classificação dos resíduos agroindustriais

Os resíduos agrícolas podem ser classificados em dois principais segmentos, à base de plantas e de origem animal. Os resíduos de origem animal são gerados pelos setores de processamento de carnes de peixes, aves, bovinos e suínos, como também do processamento de leite e produtos lácteos. Tais resíduos incluem ossos, tendões, pele, sangue, conteúdo gastrointestinal e órgãos internos, estes variam como o tipo do animal, como também abrange as águas residuais utilizadas nos processos (JAYATHILAKAN *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2021).

Os resíduos à base de plantas podem ser subdivididos em resíduos de campo e resíduos de processo. Os resíduos de campo, também chamados de resíduos de culturas, denominados em inglês como *Crop Residues* (CR), são partes das plantas, como folhas, caules e sementes, que permanecem no campo após a colheita. Esses resíduos podem ser utilizados como ração animal, métodos de melhoria do solo, fertilizantes, além de outras aplicações. Anualmente, são geradas milhões de toneladas desses resíduos, totalizando 5.280 megatoneladas produzidas globalmente no período de 2020-2021 (SHINDE *et al.*, 2022; SINGH *et al.*, 2021).

Os resíduos de processo são aqueles gerados após o processamento e refinamento da matéria-prima, como subprodutos de indústrias açucareiras, moinhos de farinha de grãos e processamento de frutas, dentre eles estão bagaço, melaço, borra, cascas, raízes e sementes (SINGH *et al.*, 2021).

Os resíduos agroalimentares compreendem toda esta cadeia de fornecimento, desde a etapa do campo, da produção à pós-colheita, incluindo as etapas de processamento industrial, distribuição e consumo doméstico (MIRABELLA; CASTELLANI; SALA, 2014). De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO – do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) (FAO, 2019), são gerados cerca de 1,3 bilhão de toneladas de resíduos agroalimentares pela

indústria alimentícia anualmente, o que equivale a um terço do total da produção de alimentos.

2.1.1.1 Resíduos da produção do lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus* L. – Figura 1a) é uma planta perene e trepadeira que pode atingir até 7 metros de altura, gerando quantidade significativa de biomassa. É uma planta amplamente cultivada, em campos comerciais são preferencialmente cultivadas as plantas femininas, que são utilizadas na produção de cerveja. As flores, conhecidas como cones de lúpulo (Figura 1b), são essenciais para desenvolver o aroma e amargor característicos da cerveja, devido à presença das substâncias alfa-ácidos, beta-ácidos e do óleo essencial de lúpulo (ALMAGUER *et al.*, 2014; GERHÄUSER, 2005a). Existem mais de 30 variedades importantes de lúpulo nos Estados Unidos, mais de 40 na Europa e cerca de 48 variedades no Brasil. Essa ampla diversidade de lúpulo inclui as variedades Magnum, Nugget, Columbus, Cascade, Comet, Chinook e Zeus, entre outras (SPÓSITO *et al.*, 2019; BRASIL, 2022).

Figura 1 – Sistema de cultivo da plantação de lúpulo (a) e cones de lúpulo (b) na Fazenda Brava Grande (Fartura - SP).



Fonte: Autora.

Durante a colheita do lúpulo, os cones são separados das folhas e caules, que geralmente são considerados resíduos. Nos últimos anos, os resíduos da indústria cervejeira, como os cones de lúpulo remanescentes após a extração dos ácidos, têm ganhado maior atenção pelo potencial uso na compostagem ou na obtenção de bioprodutos de alto valor agregado (HRNČIČ *et al.*, 2019; KOPEĆ *et al.*, 2022). No

entanto, as folhas e caules gerados durante a colheita, que permanecem nas fazendas, ainda não receberam o mesmo nível de interesse e exploração (AFONSO *et al.*, 2021).

Aproximadamente um terço da biomassa total é composto pelos cones, enquanto os dois terços restantes consistem em folhas, caules e cones não colhidos (HRNČIČ *et al.*, 2019; KOPEĆ *et al.*, 2022). Essa porção residual gera quantidade significativa de biomassa, estimada em cerca de 10 a 15 toneladas por hectare (2,6 kg/planta) (ABRAM *et al.*, 2015). De acordo com as estimativas da FAO em 2022, a área global dedicada ao cultivo de lúpulo foi de cerca de 103.000 hectares, com produção que excedeu 158.000 toneladas. Logo, devido ao aumento expressivo da produção de lúpulo, a quantidade de resíduos advindos dessa cultura aumentou proporcionalmente.

O lúpulo contém diversas propriedades bioativas devido à presença de metabólitos secundários, incluindo compostos fenólicos, alcaloides, ácidos amargos e terpenos. Esses compostos estão associados a propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antivirais (ALONSO-ESTEBAN *et al.*, 2019; HRNČIČ *et al.*, 2019; KARABÍN *et al.*, 2016; KROTTENTHALER, 2009; ROEHRER *et al.*, 2019). Essas substâncias são secretadas principalmente pelas glândulas de lupulina e acumuladas em tricomas glandulares dos cones, mas também podem ser encontrados nas folhas e caules (GERHÄUSER, 2005b; KAVALIER *et al.*, 2011; STEVENS *et al.*, 1997).

Vários estudos demonstram que as folhas de lúpulo podem ser consideradas fonte de moléculas funcionais devido à presença de compostos como fenólicos (IGLESIAS *et al.*, 2021), saponinas (IGLESIAS *et al.*, 2021; OKAFOR *et al.*, 2020), alcaloides, taninos (OKAFOR *et al.*, 2020) e ácidos amargos (KENNELLY; MATTHEWS; MORCOL, 2021). A presença desses compostos evidencia as propriedades antimicrobianas e antioxidantes proveniente das folhas do lúpulo (IGLESIAS *et al.*, 2021; SABBATINI *et al.*, 2024).

Os tipos e quantidade de compostos bioativos na biomassa do lúpulo podem variar devido a diversos fatores, visto que o metabolismo secundário da planta, responsável pela produção desses compostos, é influenciado pelas condições edafoclimáticas ao longo das diferentes fases de crescimento do lúpulo (ABRAM *et al.*, 2015; GREEN, 1997).

2.1.2 Impacto dos resíduos agroindustriais

Os resíduos agroindustriais representam uma preocupação global, com volumes que aumentam a cada ano e que, frequentemente, não recebem o tratamento adequado (DUHAN, J.; DUHAN, S.; SADH, 2018). A maior parte desses resíduos é descartada em

aterros sanitários ou incinerada, o que acarreta sérios impactos ambientais, econômicos e sociais. O descarte inadequado e a queima descontrolada liberam poluentes na atmosfera, comprometendo a qualidade do ar e provocando problemas respiratórios na população, além da contaminação da água devido ao escoamento desses resíduos para dentro de corpos de água (FREITAS *et al.*, 2021; KARAK *et al.*, 2015; VARMA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016).

Além disso, os resíduos agroindustriais tornam-se fonte de proliferação de microrganismos, embora esses organismos sejam fundamentais para o processo de decomposição, o crescimento exacerbado pode gerar problemas significativos. A proliferação excessiva está associada à emissão de gases de efeito estufa, à liberação de subprodutos tóxicos resultantes da degradação, além do aumento de bactérias e fungos patogênicos (FREITAS *et al.*, 2021). São acumulados anualmente cerca de 3,3 bilhões de toneladas de gás carbônico associadas a esses resíduos agroindustriais (CAPANOGLU; NEMLI; TOMAS-BARBERAN, 2022).

Os desafios econômicos e sociais associados aos resíduos agroindustriais também geram impactos alarmantes. Somente o desperdício de alimentos, por exemplo, gera custo de aproximadamente 1 trilhão de dólares por ano, valor que poderia suprir as necessidades nutricionais de milhões de pessoas (CAPANOGLU; NEMLI; TOMAS-BARBERAN, 2022).

2.1.3 Métodos para a valorização dos resíduos agroindustriais

Um elevado potencial de valorização está associado aos resíduos agroindustriais devido à sua rica composição. O aproveitamento adequado desses resíduos pode resultar na produção de uma variedade de produtos valiosos, como nutracêuticos, biocombustíveis, biogás, biopolímeros e biofertilizantes, entre outros. Esses produtos contribuem também para a bioeconomia (CAPANOGLU; NEMLI; TOMAS-BARBERAN, 2022; DUHAN, J.; DUHAN, S.; SADH, 2018).

A compostagem é um dos métodos mais utilizados para o aproveitamento de resíduos agroindustriais. Trata-se de processo controlado, simples e sustentável, no qual materiais orgânicos são decompostos com o auxílio de microrganismos em condições aeróbicas (AYILARA *et al.*, 2020; TARIQ *et al.*, 2023).

A maior parte dos resíduos agroindustriais consiste em polissacarídeos ricos em celulose, hemicelulose e lignina. Além disso, contêm diversos outros nutrientes, como lipídios, pectinas, proteínas e uma variedade de polifenóis. Um produto extraído dos

resíduos é a enzima, que atua como catalisador biológico em indústrias produtoras de cerveja, papel, celulose, panificação e detergentes (HASSAN; JAISWAL; WILLIAMS, 2019; TARIQ *et al.*, 2023).

Outra abordagem para o aproveitamento de resíduos agrícolas é a fermentação em estado sólido (FES), processo biotecnológico no qual microrganismos crescem em substratos sólidos ou materiais insolúveis, com pouca ou nenhuma presença de água livre (BHARGAV *et al.*, 2008).

Biorrefinarias têm como objetivo produzir biocombustíveis, biomateriais e compostos bioativos a partir de resíduos. Exemplo é o bioetanol, uma alternativa renovável que pode substituir os combustíveis fósseis. Além disso, o biogás é outra forma de bioenergia gerada a partir da degradação anaeróbia de resíduos ricos em materiais lignocelulósicos (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2011; NOPHARATANA; PAEPATUNG; SONGKASIRI, 2009; TARIQ *et al.*, 2023).

Aspecto relevante dos resíduos agroindustriais é a presença de compostos bioativos, que possuem atividades biológicas capazes de modular processos metabólicos, promovendo melhores condições de saúde devido as propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Entre esses compostos destacam-se os fenólicos, saponinas, fitosteróis, tocoferóis, carotenoides, ácidos orgânicos, tiosulfonatos e glicosinolatos (CARBINELL-CAPELLA *et al.*, 2014; CORREIA *et al.*, 2012; SERRANO-LÉON *et al.*, 2018). Esses compostos podem ser encontrados em resíduos como a casca e caroço do abacate (MELGAR *et al.*, 2018), cascas da batata, batata-doce, laranja e maracujá (NEGESSE, 2009; SIHOMBING *et al.*, 2015), semente e casca da uva (SHAKER, 2006), folhas do lúpulo (IGLESIAS *et al.*, 2021; OKAFOR *et al.*, 2020), entre outros.

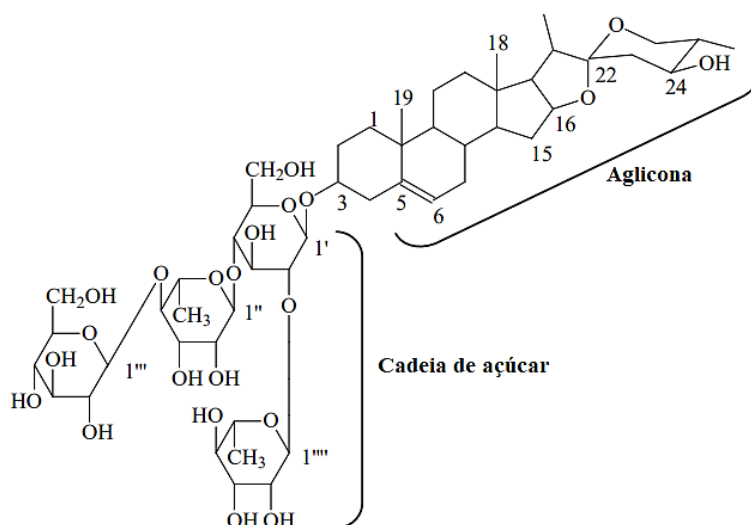
2.2 Saponinas

As saponinas são um grupo de glicosídeos, caracterizadas principalmente pelas propriedades surfactantes, gerando a formação de espuma em soluções aquosas (MAN *et al.*, 2010). Esses compostos desempenham papel crucial na defesa das plantas, atuando como barreira química contra patógenos e herbívoros. São frequentemente encontrados em partes vegetais suscetíveis a ataques fúngicos, bacterianos ou à predação de insetos (AUGUSTIN *et al.*, 2011; BECKER; MUETZEL; WINA *et al.*, 2005).

2.2.1 Aspectos gerais das saponinas

As saponinas realizam atividade de interface, que é a redução da tensão superficial da água. São componentes anfifílicos, ou seja, são hidrofóbicos e hidrofílicos, apresentam uma aglicona na estrutura proveniente de anéis policíclicos, chamada genericamente de sapogenina, ligada a uma ou mais unidades de açúcares, chamadas de gliconas (Figura 2) (OAKENFULL, 1981; PRICE; JOHNSON; FENWICK, 1987).

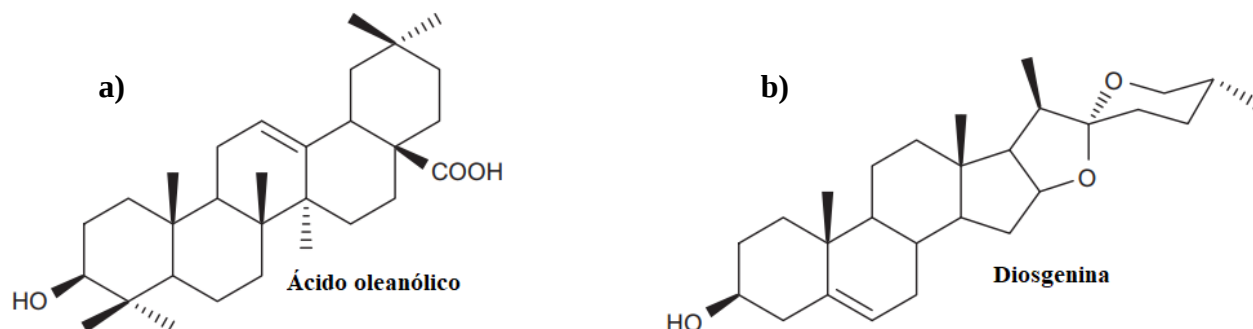
Figura 2 – Estrutura da saponina esteroidal com 4 cadeias de açúcares.



Fonte: Adaptado de Chaieb (2010).

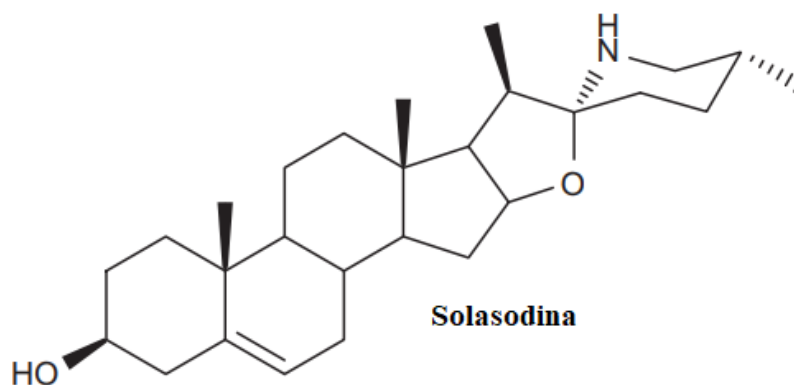
Baseado na estrutura da aglicona, as saponinas podem ser classificadas em dois grupos principais, triterpênicas ou esteroidais (Figura 3). As triterpênicas são formadas por 30 átomos de carbono no total, geralmente distribuídas em 5 anéis, e as esteroidais contêm 27 átomos de carbono, distribuídos em 6 anéis, ambas derivam do 2,3-oxidosqualeno. Alguns autores (HARALAMPIDIS; TROJANOWSKA; OSBOURN, 2002; HOSTETTMANN; MARSTON, 1995) consideram os glicoalcalóides esteroidais (Figura 4) como terceiro grupo de saponinas, por possuírem a mesma estrutura que as esteroidais, diferenciando no grupo de nitrogênio, ao invés do átomo de oxigênio. No entanto, Vincken *et al.* (2007), os classificam como grupo separado e propôs uma classificação mais detalhada das saponinas, baseada na estrutura das sapogeninas, dividindo-as em 11 classes principais e 16 subclasses (HARALAMPIDIS; TROJANOWSKA; OSBOURN, 2002; HOSTETTMANN; MARSTON, 1995; KALINOWSKA *et al.*, 2005; SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004).

Figura 3 – Estruturas representativas de sapogenina (a) triterpênica (ácido oleanólico) e (b) esteroidal (diosgenina).



Fonte: Adaptado de Augustin *et al.* (2011).

Figura 4 – Exemplo da estrutura de um glicoalcalóide esteroidal (solasodina).



Fonte: Adaptado de Augustin *et al.* (2011).

Os açúcares presentes na saponina frequentemente aparecem na forma de oligossacarídeos, em cadeias lineares ou ramificadas, entretanto também podem aparecer na forma de monossacarídeos. Exemplos são açúcares como a glicose, arabinose, xilose, ácido glucurônico, galactose, ramnose, entre outros (MAHATO *et al.*, 1988).

A fração de açúcar está ligada à aglicona através de ligação tipo éster ou éter. As saponinas podem ser classificadas quanto ao número de cadeias desses sacarídeos presentes na molécula, exemplo, quando há apenas uma ligada é chamada de monodesmosídica. Saponinas bidesmosídicas apresentam, além da cadeia de açúcar ligada ao carbono 3, uma cadeia adicional ligada ao carbono 26 ou 28. E por fim, pode ocorrer também a ligação de três cadeias de açúcares em diferentes posições da aglicona, caracterizando as raras saponinas tridesmosídicas. Portanto, observa-se que a grande complexidade da estrutura da saponina ocorre devido a variabilidade da estrutura da

aglicona, da natureza e da posição da ligação dessas cadeias laterais à aglicona (FRANCIS *et al.*, 2002; KALINOWSKA *et al.*, 2005; SCHWARZ, 2003; YÜCEKUTLU; BILDACI, 2008).

A presença das saponinas foi identificada em mais de 100 famílias de plantas silvestres ou cultivadas e em fontes marinhas, como estrelas-do-mar e pepino-do-mar (FRANCIS *et al.*, 2002; HOSTETTMANN; MARSTON, 1995). As saponinas esteroidais são encontradas principalmente em plantas monocotiledôneas (como *Agavaceae*, *Dioscoreaceae* e *Liliaceae*), e as triterpênicas em dicotiledôneas (*Leguminosae*, *Araliaceae* e *Caryophyllaceae*) (SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004). Em grande variedade de alimentos, as saponinas triterpênicas foram detectadas, como soja, feijão, ervilha, beterraba, espinafre, quinoa e chás, enquanto as esteroidais em aveia, pimentão, tomate, batata, alho-poró, cebola, alho e em aspargos (FRANCIS *et al.*, 2002).

Nos resíduos agroindustriais advindos da cultura de alimentos também foram relatados a presença de saponinas, como em folhas da beterraba (CAETANO *et al.*, 2024; MROCZEK *et al.*, 2019), cascas da batata e da batata-doce, casca da laranja (NEGESSE, 2009; SIHOMBING *et al.*, 2015), folhas do maracujá (REGINATTO *et al.*, 2001), cascas do maracujá (SIHOMBING *et al.*, 2015), folhas do lúpulo (IGLESIAS *et al.*, 2021; OKAFOR *et al.*, 2020), entre outros.

A saponina também pode ser encontrada em fontes não alimentares que são empregadas em aplicações industriais e de saúde, como quilaia (*Quillaja saponaria*), feno-grego (*Trigonella foenum-graceum*), alfafa (*Medicago sativa*), castanha da índia (*Aesculus hippocastanum*), alcaçuz (espécies de *Glycyrrhiza*, como *Glycyrrhiza glabra*), saponária (*Saponaria officinalis*), mojave yucca (*Yucca schidigera*), flor mosquitinho (como *Gypsophila paniculata*), salsaparrilha (*Smilax regelii* e outras espécies relacionadas do gênero *Smilax*) e ginseng (*Panax ginseng*) (BALANDRIN, 1996; HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

2.2.2 Propriedades e aplicações das saponinas

Há muitos séculos, as saponinas derivadas do sabão (*Saponaria officinalis* L.) têm sido amplamente utilizadas como detergente doméstico (SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004). As saponinas têm sido historicamente consideradas como antinutrientes, entretanto, nos últimos anos, têm despertado grande interesse devido às múltiplas propriedades funcionais. A crescente demanda por produtos naturais, aliada às características físico-químicas e às comprovações sobre as atividades biológicas,

contribuiu para a expansão do uso desse composto em diversas indústrias, como a alimentícia, cosmética e farmacêutica (GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ; MAZZA, 2007; DAFFODIL; MOHAN; TRESINA, 2016; SHI *et al.*, 2004).

Na indústria alimentícia, as saponinas têm sido exploradas em diversas aplicações, incluindo como conservantes no controle da deterioração microbiana. Pesquisa conduzida por Miyakoshi *et al.* (2000) demonstrou que as saponinas extraídas da *Yucca schidigera* (*Mohave yucca*) apresentaram atividade inibitória contra o crescimento de leveduras deteriorantes, leveduras formadoras de biofilmes e fungos dermatofíticos. Além disso, Li, Baert e Uyttendaele (2013) observaram que saponinas da espécie *Sapindus saponaria*, quando combinadas com tratamento térmico, são eficazes na inativação da bactéria deteriorante *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

A saponina também pode ser utilizada como surfactante natural em alimentos e bebidas. Exemplo é a saponina de Quillaja, que tem sido aplicada como agente emulsificante em formulações de bebidas, substituindo surfactantes sintéticos como os *Tweens* devido à alta estabilidade e eficácia em emulsões (PIORKOWSKI; MCCLEMENTS, 2013; YANG *et al.*, 2013).

Outra aplicação da saponina é como agente espumante em bebidas e confeitaria (MIYAKOSHI *et al.*, 2000; PIORKOWSKI; MCCLEMENTS, 2013; PRICE; JOHNSON; FENWICK, 1987), e também pode ser utilizada suas propriedades de sabor (GRENBY, 1991; HENG *et al.*, 2006; KITAGAWA, 2002). Estudo desenvolvido por Wojciechowski *et al.* (2014) investigou a interação entre a saponina extraída da casca de quillaja e a β -caseína da proteína do leite bovino, para avaliar a atividade de superfície. Os resultados indicaram que a saponina de quillaja atua de forma eficiente como um biossurfactante natural.

As saponinas também apresentam propriedades farmacológicas e medicinais, como ação anticancerígena, anti-inflamatória, antiviral, atividade hemolítica e efeito hipocolesterolêmico (MILGATE; ROBERTS, 1995; SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004). Estudos realizados com as saponinas derivadas da espécie *Allium chinense* evidenciaram resposta eficaz para o tratamento do melanoma e carcinoma de mama (YU *et al.*, 2015). O princípio ativo vegetal derivado das saponinas extraídas do castanheiro-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), conhecido como escina, destaca-se pelas propriedades anti-inflamatórias, apresentando atividades significativas no tratamento de insuficiência venosa crônica (IVC), hemorroidas e edema pós-operatório (SIRTORI, 2001).

Além das aplicações mencionadas, as saponinas possuem outras atividades importantes, como ação inseticida e moluscicida (SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004). As propriedades como agentes espumantes e emulsificantes também são amplamente exploradas, especialmente na indústria cosmética (PRICE; JOHNSON; FENWICK, 1987; SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004).

2.3 Extração de saponinas

A extração de saponinas de diferentes matrizes envolve etapas preliminares, como o pré-tratamento da amostra, seguidas pela aplicação das diversas metodologias de extração.

2.3.1 Pré-tratamento da amostra

Para otimizar a eficiência e remover interferentes na extração de saponinas, algumas técnicas de pré-tratamento são frequentemente aplicadas às amostras. Entre essas técnicas, destaca-se o desengorduramento, geralmente realizado com solvente lipofílico, como acetato de etila ou hexano, que pode ser aplicado tanto antes quanto após a extração principal. Além disso, as técnicas de secagem e a redução do tamanho das partículas da amostra através da moagem também são realizadas (MUIR *et al.*, 2002).

2.3.2 Métodos de extração

Os métodos de extração de saponinas são comumente divididos em dois grupos: convencionais e as tecnologias verdes. As técnicas convencionais incluem métodos como a maceração, Soxhlet e sob refluxo, e as tecnologias verdes são a extração assistida por ultrassom, por micro-ondas e acelerada por solvente (HENG *et al.*, 2013).

Os métodos de extração normalmente utilizam solventes com a água, etanol, metanol, glicerol e surfactantes aquosos ou alcoólicos, entretanto a solubilidade de algumas saponinas em éter, clorofórmio, benzeno, acetato de etila ou ácido acético glacial também foi relatada (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995; KREGIEL *et al.*, 2017).

2.3.2.1 Métodos convencionais

As metodologias convencionais de extração de saponina têm sido utilizadas há décadas, mesmo que possuam limitações como maior tempo de extração e maior consumo de solventes (YUSOFF *et al.*, 2022).

A extração por maceração é uma das técnicas convencionais mais utilizadas. Nesse processo, o material é imerso em solvente específico por um período, muitas vezes sendo um tempo prolongado, para extração do soluto presente na composição do material. A eficácia da maceração depende de dois fatores principais: a solubilidade e a difusão. A taxa de dissolução é controlada pela transferência de massa entre o soluto e o solvente (NAVIGLIO *et al.*, 2019; REICHARDT; WELTON, 2011).

As metodologias de extração de Soxhlet e sob refluxo possuem funcionamento semelhante, envolvendo o aquecimento da solução até o ponto de ebulição e, em seguida, os vapores gerados são condensados e retornam ao frasco original, processo que normalmente envolve longo período de tempo (BART, 2011). No método de refluxo, a matriz é submetida a aquecimento por um período, permitindo que reações químicas ocorram enquanto os vapores condensam e retornam ao frasco, mantendo a temperatura da reação constante (TIAN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2018). No método de Soxhlet a amostra é adicionada em reservatório de vidro, também conhecido como dedal, e o solvente é adicionado ao balão de fundo redondo. O solvente passa repetidamente pelo dedal, extraindo os compostos, sendo constantemente recuperado e retornado ao balão, até o processo atingir a saturação (SEN *et al.*, 2019).

2.3.2.2 Tecnologias verdes

Embora os métodos convencionais de extração ainda sejam os mais utilizados, possuem desvantagens, como grande consumo de solvente, longos períodos de extração e uso de altas temperaturas. Por outro lado, as técnicas de extração verdes minimizam o uso de solventes tóxicos, utilizam matérias-primas renováveis, realizam sínteses químicas menos perigosas e reduzem a poluição (AZMIR *et al.*, 2013; YUSOFF *et al.*, 2022).

A extração assistida por micro-ondas é um método alternativo amplamente utilizado, conhecido pela rapidez e eficiência devido a minimização do tempo de extração e solvente empregado. A técnica se baseia na ruptura da estrutura celular da amostra, resultado do aquecimento da mistura de amostra e solvente, gerado pela energia da radiação de micro-ondas não ionizante (KADERIDES *et al.*, 2019; MARTINEZ; MEIRELES; VEGGI, 2012; ZHENG *et al.*, 2013). A energia térmica é absorvida porque as micro-ondas afetam diretamente as moléculas do dipolo, por meio da condução iônica ou da rotação de dipolos. Esse efeito provoca aumento na rotação dessas moléculas, resultando em aquecimento sem a geração de gradiente térmico no sistema. O aumento da temperatura contribui para a elevação da porosidade da matriz vegetal, o que, por sua

vez, incrementa o coeficiente de difusão de massa, possibilitando maior capacidade de desorção da matriz e absorção de solventes para compostos bioativos (ALARA *et al.*, 2018; CASSOL; NOREÑA; RODRIGUES, 2019; CHAVES *et al.*, 2020).

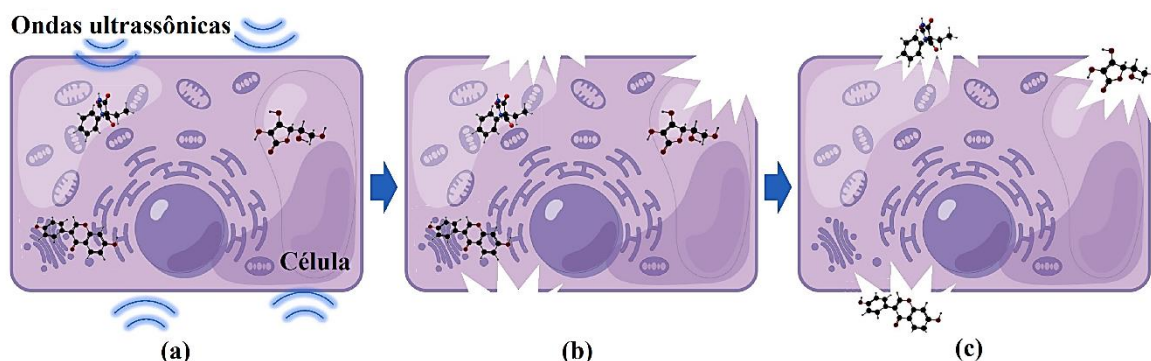
A técnica de extração acelerada por solvente é uma metodologia utilizada para aumentar o rendimento e reduzir o tempo do processo de extração. O material a ser extraído é colocado em recipiente metálico, onde o solvente é introduzido. Em seguida, a temperatura do sistema é elevada para além do ponto de ebulição do solvente, que, devido ao aumento simultâneo da pressão, permanece em estado líquido. Após curto período, a matriz sólida é completamente extraída. O solvente tem grande influência nesse processo, podendo ser substância pura ou mistura, com destaque para a água que apresenta boa relevância. O processo é geralmente realizado em período de 15 a 25 minutos, utilizando volumes reduzidos de solvente, aproximadamente entre 15 a 45 mL. Essa abordagem inovadora é eficaz porque acelera a difusão, permitindo a extração de sólidos utilizando líquidos (CHEOK; SALMAN; SULAIMAN, 2014; DU; HE; XU, 2018; MOLINO *et al.*, 2018).

A extração assistida por ultrassom é uma metodologia verde promissora para a obtenção de compostos bioativos, destaca-se por requerer menos solvente, reduzir o tempo de extração e aumentar o rendimento, além de minimizar a degradação de compostos termossensíveis (FU *et al.*, 2021).

2.3.2.2.1 Extração assistida por ultrassom

A técnica de extração assistida por ultrassom consiste na emissão de ondas sonoras com frequência entre 20 e 2000 kHz, com comprimentos de ondas milimétricas. Os comprimentos de onda são maiores que as moléculas bioativas e macromoléculas, o que impede a absorção direta da energia. A energia gerada pelas ondas provoca oscilações rápidas de pressão, de baixa a alta, resultando na formação de microbolhas de vácuo em diferentes pontos, em fase líquida. Com a repetição desse processo, ocorre o fenômeno da cavitação (Figura 5), no qual essas bolhas acumulam energia até ultrapassarem o limite de resistência, colapsando e gerando explosões. Essas colisões produzem altas forças de cisalhamento e ondas de choque que se propagam pelo meio, rompendo a microestrutura celular e reduzindo o tamanho das partículas. O aumento da área de superfície resultante melhora a difusão e a transferência de massa dos compostos de interesse da matriz para o solvente extrator (DAI; MUMPER, 2010; GIL-MARTÍN *et al.*, 2022).

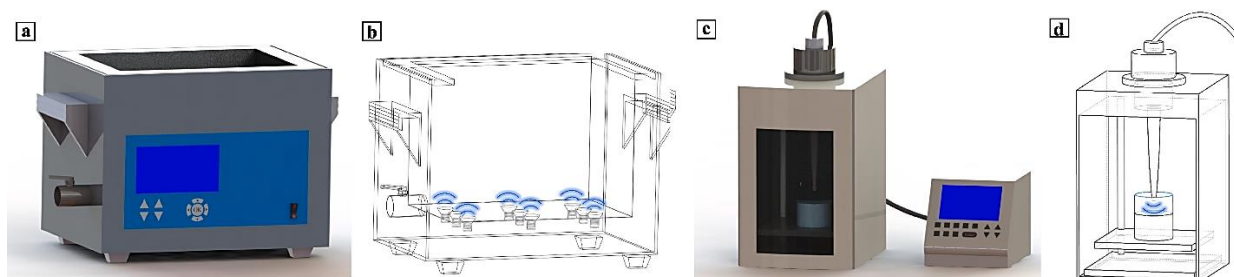
Figura 5 – Mecanismo da extração assistida por ultrassom: (a) o ultrassom atua na célula, (b) ocorre a ruptura celular, (c) os compostos de interesse presentes na célula são liberados.



Fonte: Adaptado de Shen *et al.* (2023).

A extração assistida por ultrassom pode ser realizada de forma simples em laboratório. Atualmente, existem dois principais tipos de equipamentos ultrassônicos amplamente utilizados: o banho e a sonda (Figura 6) (CARREIRA-CASAI *et al.*, 2021). O equipamento do tipo banho (Figura 6a-b), consiste em um tanque de aço inoxidável com um ou mais transdutores ultrassônicos fixados no fundo ou nas quatro paredes do equipamento. A sonda (Figura 6c-d), apresenta um transdutor ligado à sonda que é imersa no reator com a solução alvo (VERRUCK; PRUDENCIO, 2018). Além disso, estes equipamentos ultrassônicos também podem ser classificados em extração direta (sonda) e indireta (banho ultrassônico) (ALIYAMMAHI *et al.*, 2022; CASTELLARIN *et al.*, 2023).

Figura 6 – Representação dos equipamentos ultrassônicos: banho (a, b) e sonda (c, d).



Fonte: Adaptado de Shen *et al.* (2023).

A técnica de extração por ultrassom é valorizada devido ao baixo custo de implementação e operação, além de ser um método sustentável, pois utiliza pequenos

volumes de solvente. Outro benefício é o ciclo de trabalho rápido, o que minimiza a degradação dos compostos, contribuindo para a redução do consumo de energia e a necessidade de altas temperaturas. Esses fatores favorecem a qualidade dos extratos obtidos, tornando o ultrassom uma técnica de alto rendimento e de fácil escalabilidade (FU *et al.*, 2021; NUNES *et al.*, 2018; RAMÍREZ-GARZA; RODRÍGUEZ DE LUNA; SALDÍVAR, 2020; YU *et al.*, 2017).

Essa metodologia apresenta algumas desvantagens, como a limitação na quantidade de amostra que pode ser processada por vez, pois volumes maiores requerem amplas áreas operacionais e o uso de equipamentos em série. Outra desvantagem do banho ultrassônico é a baixa reprodutibilidade, causada pela presença de água, que reduz a dispersão de energia devido à absorção parcial. Para dissipação desse problema, o uso de sondas ultrassônicas tem ganhado destaque (MACHADO *et al.*, 2019; RAMÍREZ-GARZA; RODRÍGUEZ DE LUNA; SALDÍVAR, 2020).

2.3.3 Quantificação de saponinas

A quantificação de saponinas extraídas de materiais vegetais geralmente é realizada por métodos espectrofotométricos e cromatográficos. A principal diferença entre esses dois métodos está no resultado obtido, pois o método espectrofotométrico fornece valor total de saponinas presentes na amostra, sem distinguir os diferentes tipos de saponinas, enquanto o método cromatográfico permite a identificação e quantificação de saponinas específicas (CHEOK; SALMAN; SULAIMAN, 2014).

A técnica espectrofotométrica é amplamente difundida na quantificação de saponinas de materiais vegetais por ser simples, rápido e acessível. O método mais comum para essa análise é o ensaio de vanilina com ácido sulfúrico, proposto por Hiai *et al.* (1976), no qual as saponinas oxidadas reagem com a vanilina, enquanto o ácido sulfúrico atua como oxidante, gerando uma reação colorimétrica ácida para quantificação das saponinas. Em alguns casos, o ácido perclórico é utilizado, por também ser oxidante forte, como realizado nos estudos conduzidos por Chen, Gong e Xie (2007), Li *et al.* (2010) e Wu *et al.* (2001).

Na revisão conduzida por Cheok, Salman e Sulaiman (2014), são apontadas diferenças nas pesquisas de extração de saponinas em matrizes vegetais, como diferenças na escolha dos reagentes, nas condições para o desenvolvimento da reação, nos padrões e nos comprimentos de onda empregados. Quanto as condições para o desenvolvimento da reação, estudos como os de Liu *et al.* (2016), Ncube *et al.* (2011) e Patel *et al.* (2012),

após a realização do procedimento descrito por Hiai *et al.* (1976), submeteram a mistura a aquecimento de 60 °C por 10 minutos para permitir o desenvolvimento completo da reação. Entretanto, outras pesquisas como a de Chen, Gong e Xie (2007) aplicaram condições de 70 °C por 15 minutos, e Li *et al.* (2010) utilizaram por 70 °C por 20 minutos. O comprimento de onda deve ser analisado, pois será característico ao produto formado após a derivatização, que depende do tipo de saponina presente na matriz vegetal (HIAI *et al.*, 1976), os comprimentos geralmente usados para análise situam-se entre 480 e 610 nm, com exceções, como Mostafa *et al.* (2013), que utilizou 473 nm, e Liu *et al.* (2012) que empregou 283 nm (CHEOK; SALMAN; SULAIMAN, 2014).

Outras metodologias espectrofotométricas também podem ser utilizadas, como a análise de sapogeninas esteroides, que visa quantificar exclusivamente esse tipo de composto. Esse método é baseado em uma reação colorimétrica que envolve o uso de anisaldeído ou vanilina, ácido sulfúrico e acetato de etila, com medida no comprimento de onda máximo em 430 nm (BACCOU; LAMBERT; SAUVAIRE, 1977). Outra técnica aplicada é o método hemolítico, que se baseia na reação das saponinas com o reagente sanguíneo, levando à liberação de oxi-hemoglobina, cuja coloração pode ser mensurada por espectrofotometria (BARVE; JAYAKUMAR; LADDHA, 2010; HABICHT *et al.*, 2011).

Métodos cromatográficos são utilizados para a separação e purificação de saponinas, permitindo a identificação de tipos específicos. A separação cromatográfica baseia-se na partição diferencial das saponinas entre as fases móvel e estacionária. Os diferentes constituintes migram com velocidades distintas ao longo da fase estacionária, resultando na separação dos compostos (CHEOK; SALMAN; SULAIMAN, 2014). Os métodos cromatográficos incluem cromatografia de camada delgada (TLC – do inglês *Thin layer chromatography*), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – do inglês *High-performance liquid chromatography*) e cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC – do inglês *Ultra-performance liquid chromatography*) (WANG *et al.*, 2022).

2.4 Química analítica verde

A química analítica verde é uma frente na química analítica que consiste na implementação de métodos ecologicamente corretos para redução dos impactos negativos dos processos analíticos no meio ambiente, comumente chamados de tecnologias verdes (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013). Os procedimentos para tornar os processos químicos mais ecológicos priorizam o uso de solventes mais limpos e menos

prejudiciais ou até a eliminação, além da minimização de reagentes. Também são aplicados métodos energeticamente eficientes, visando a minimização do consumo de energia, evitando derivatização e aplicando substratos de base renovável (CORTÉS; MARTÍNEZ; MIRANDA, 2022; SAJID; PŁOTKA-WASYLKA, 2022; WARDENCKI; NAMIESNIK, 2005).

A preocupação ambiental no campo da química analítica teve início em 1995, com a publicação do editorial na edição especial da revista *Analyst*, que destacou os processos de miniaturização, contenção e substituição de reagentes em métodos analíticos (GUARDIA; RUZICKA, 1995). O conceito e os princípios da química verde foram estabelecidos em 1998 por Anastas e Warner, apresentando recomendações e diretrizes para a comunidade científica para processos químicos verdes. Desde então, diversos autores desenvolveram e discutiram estratégias de química analítica verde em livros científicos (GARRIGUES; GUARDIA, 2020; ARMENTA; GUARDIA, 2011; GUARDIA; GARRIGUES, 2012; KALJURAND; KOEL, 2019).

As métricas de química verde são indicadores qualitativos e quantitativos do impacto dos processos analíticos na saúde humana e no meio ambiente, é uma importante ferramenta utilizada na química analítica verde (CORTÉS; MARTÍNEZ; MIRANDA, 2022; SAJID; PŁOTKA-WASYLKA, 2022).

Diversos estudos científicos propuseram ferramentas para a medição de práticas analíticas mais sustentáveis, como o Índice Nacional de Métodos Ambientais (NEMI – do inglês *National Environmental Methods Index*) (ACS, 2002), o Perfil de Avaliação Verde (do inglês *Green assessment profile*) (RAYNIE; DRIVER, 2009), a Eco Escala Analítica (GAŁUSZKA *et al*, 2012), o Índice de Procedimento Analítico Verde (GAPI – do inglês *Green Analytical Procedure Index*) (PŁOTKA-WASYLKA, 2018), o *Analytical Method Volume Intensity* (AMVI) ((HARTMAN *et al.*, 2011), *Analytical GREEnness Metric Approach and Software* (AGREE) (PENA-PEREIRA; WOJNOWSKI; TOBISZEWSKI, 2020), *HPLC Environmental Assessment Tool* (HPLC-EAT) (GABER *et al.*, 2011), entre outras.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo explorar métodos de extração ambientalmente amigáveis de saponinas no resíduo agroindustrial proveniente do cultivo de lúpulo.

3.2 *Objetivos específicos*

- a) Estudar e otimizar diferentes métodos ambientalmente benignos de extração de saponina;
- b) Quantificar as saponinas extraídas por método espectrofotométrico;
- c) Comparar os resultados obtidos com método convencional de extração de saponina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Amostras, reagentes e soluções*

Os equipamentos e reagentes utilizados para o desenvolvimento estavam disponíveis no Laboratório de Analítica e Química de Alimentos da ESALQ/USP. Para as análises foram empregados água deionizada (18,2 M Ω cm a 25 °C) e reagentes de grau analítico: ácido sulfúrico, etanol absoluto, metanol, saponina e vanilina. No preparo das amostras foram empregados: balança analítica (Mettler Toledo, modelo ME104), moinho de facas (Tecnal, modelo TE-631/4), extrator de lipídios (Tecnal, modelo TE-044), estufa com circulação e renovação de ar (Tecnal, modelo TE-394/2-MP), mesa agitadora com movimento orbital (Quimis, modelo Q225M), banho Dubnoff (Quimis, modelo Q226M1), banho ultrassônico (Unique, modelo USC-1450, frequência 25 kHz) e centrífuga refrigerada (Quimis, modelo Q222RT).

4.1.1 *Obtenção e preparo das amostras*

Amostras da folha do lúpulo das variedades Zeus e Comet foram adquiridas com o produtor Brava Terra, que realiza o plantio na fazenda Brava Grande na cidade de Fartura, no interior de São Paulo. As folhas foram submetidas a secagem em estufa com circulação e renovação de ar por 24 h a 60 °C, trituradas e padronizadas em peneira (20 mesh) e acondicionadas em sacos plásticos, vedadas e protegidas da luz dentro de refrigerador.

4.1.2 *Desengorduramento das amostras*

Inicialmente realizou-se o desengorduramento das amostras através da extração por Soxhlet, conforme definido pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Ao final, as amostras desengorduradas foram submetidas a secagem na estufa para evaporação total do

solvente, acondicionadas em dessecador de sílica gel e armazenadas em tubo tipo Falcon®, vedadas e protegidas da luz.

4.2 Extratos

Para a obtenção dos extratos das folhas de lúpulo das variedades Zeus e Comet foram aplicadas duas metodologias: a extração assistida por ultrassom, considerada tecnologia verde, e a extração por maceração, método convencional utilizado para fins de comparação.

4.2.1 Tecnologia verde: Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom foi realizada a partir do proposto por Iglesias *et al.* (2021), com condições otimizadas. Foram utilizadas 5 mg de amostra das folhas de lúpulo de ambas as variedades, adicionadas em tubos do tipo Falcon® de 50 mL, juntamente com 40 mL de etanol absoluto. Os tubos foram submetidos ao banho ultrassônico por 10 minutos. Em seguida, os extratos foram centrifugados a 6000 rpm por 10 minutos a 25 °C.

4.2.2 Metodologia convencional: Maceração

A extração foi realizada conforme o proposto por Lee *et al.* (2018), com algumas adaptações. Foram utilizadas 0,5 g de amostra das folhas de lúpulo de ambas as variedades, adicionadas em tubos tipo Falcon® de 50 mL, juntamente com 10 mL da solução de metanol 70% (v/v), e mantidas no banho Dubnoff com agitação, a 25 °C, por 12 horas. Após esse período, os extratos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos a 25 °C. Após, os extratos foram diluídos utilizando uma alíquota de 500 µL em 10 mL de metanol 70% (v/v).

4.3 Determinação de saponinas

Conforme proposto por Hiai *et al.* (1976), e complementado pelo estudo de Liu *et al.* (2016), além da inclusão de algumas adaptações, as saponinas foram determinadas por método colorimétrico com leitura no espectrofotômetro UV-Vis, (AGILENT, modelo Cary 60), nos comprimentos de onda 547 nm (para água e etanol) e 600 nm (para solução de metanol 70%, v/v).

Alíquota de 250 µL dos extratos foi transferida para tubo tipo Falcon® de 15 mL com adição de 250 µL do reagente vanilina-etanol 8% (m/v), com os tubos imersos em

banho de gelo, foram adicionados 2000 µL de ácido sulfúrico 77% (v/v). Após, os tubos foram aquecidos a 60 °C por 15 minutos em banho Dubnoff. A curva de calibração foi construída na faixa de 50 - 1000 mg L⁻¹ de saponina.

4.4 Análises estatísticas e planejamentos experimentais

As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. As otimizações experimentais foram realizadas utilizando os planejamentos fatoriais 2⁴ com 3 pontos centrais e 2² com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais, como também a ascendência ao máximo. As análises estatísticas aplicadas foram ANOVA (Análise de Variância), teste de Tukey e teste de falta de ajuste do modelo, com nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$). O software utilizado foi o Statistica 14.0.1 (Versão Estudantil), complementado pelo Microsoft Excel (2021) e OriginPro® 2022 (Versão Estudantil).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliação das tecnologias verdes propostas para extração de saponinas foram realizados os procedimentos baseados no estudo de Iglesias *et al.* (2021), com algumas adaptações, conforme descrito na Tabela 1, para as duas variedades de folha do lúpulo, Zeus e Comet.

Tabela 1 – Tecnologias verdes aplicadas para extração de saponinas.

Tipo de Extração	Proporção amostra e solvente (m/v)	Solvente extrator	Procedimento de extração
Banho Dubnoff	3,5% (0,35 g de amostra para 10 mL do solvente extrator)	Solvente 1 – Água	As amostras e solventes foram adicionados em tubos tipo Falcon® de 15 mL e levados ao banho aquecido (50 °C) com agitação por 20 minutos. Os extratos foram centrifugados a 6000 rpm por 10 minutos, a 25 °C.
Banho ultrassônico		Solvente 2 – Mistura Água/Etanol (50:50%, v/v)	As amostras e solventes foram adicionados em tubos tipo Falcon® de 15 mL e levados ao banho ultrassônico por 20 minutos. Após, os extratos foram centrifugados a 6000 rpm por 10 minutos, a 25 °C.
Mesa agitadora			As amostras e solventes foram adicionados em tubos tipo Falcon® de 15 mL e levados a mesa agitadora a 200 rpm por 20 minutos. Após, os extratos foram centrifugados a 6000 rpm por 10 minutos, a 25 °C.

Fonte: Autora.

Os respectivos resultados referentes as metodologias de extração propostas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados das extrações com tecnologias verdes utilizando diferentes solventes.

Variedade da folha do lúpulo	Tipo de extração	Solvente Extrator	Resultado Saponinas Totais (g 100 g ⁻¹ de amostra desengordurada)
Comet	Banho Dubnoff	Água	0,34 ± 0,08
		Mistura Água/Etanol (50:50%, v/v)	5,7 ± 0,2
	Banho ultrassônico	Água	0,31 ± 0,05
		Mistura Água/Etanol (50:50%, v/v)	18,2 ± 1,1
	Mesa agitadora	Água	0,26 ± 0,02
		Mistura Água/Etanol (50:50%, v/v)	6,8 ± 1,1
Zeus	Banho Dubnoff	Água	0,18 ± 0,04
		Mistura Água/Etanol (50:50%, v/v)	6,3 ± 1,1
	Banho ultrassônico	Água	0,180 ± 0,003
		Mistura Água/Etanol (50:50%, v/v)	19,4 ± 3,3
	Mesa agitadora	Água	0,11 ± 0,01
		Mistura Água/Etanol (50:50%, v/v)	7,6 ± 1,0

Fonte: Autora.

Os resultados demonstraram que as extrações realizadas no banho ultrassônico, utilizando a mistura água/etanol como solvente extrator, foram mais eficientes na obtenção de saponinas na folha do lúpulo para ambas as variedades, Zeus (19,4 ± 3,3) e Comet (18,2 ± 1,1). As análises estatísticas, ANOVA e o teste de Tukey de três fatores (variedade, solvente e equipamento de extração), mostraram que os dois melhores resultados obtidos são estatisticamente equivalentes a nível de confiança de 95%.

Os elevados rendimentos de extração obtidos com o uso do banho ultrassônico podem estar relacionados à capacidade do ultrassom de romper as paredes celulares da matriz vegetal, facilitando maior difusão dos compostos bioativos (VINATORU, 2001).

Referente a resposta da eficácia do solvente extrator, demais estudos, como o conduzido por Navarro del Hierro *et al.* (2018), apresentam respostas semelhantes, demonstrando que a mistura água/etanol e também o etanol absoluto, quando utilizados como solventes, proporcionam extração de saponinas mais eficiente em comparação com a água pura em banho ultrassônico, essa resposta sugere que solventes com menor polaridade que a água podem aumentar os resultados obtidos das extrações de saponinas. Outra explicação para essa eficiência pode ser atribuída à lei da semelhança e

intermiscibilidade, que afirma que, quanto mais próximas as polaridades do solvente e do soluto, maior a probabilidade de melhor desempenho na extração (HADIDI; IBARZ; PAGAN, 2020).

5.1 Otimização

Com base nos resultados iniciais, foi realizado estudo de otimização utilizando planejamentos fatoriais, focando na utilização da mistura água/etanol como solvente extrator, o equipamento de ultrassom e a variedade Zeus.

5.1.1 Planejamento fatorial 2^4 com 3 pontos centrais

O planejamento fatorial completo 2^4 com 3 pontos centrais foi aplicado com o objetivo de avaliar o efeito das variáveis: proporção da mistura água/etanol (70/30, 50/50 e 30/70 %, v/v), tempo de extração no ultrassom (10, 20 e 30 minutos), tempo de centrifugação (10, 20 e 30 minutos) e massa da amostra de folha de lúpulo (0,20; 0,35 e 0,50 g). Os experimentos foram realizados de forma aleatória para evitar erros sistemáticos e os respectivos teores de saponinas totais ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ de amostra desengordurada) encontrados são apresentados na Tabela 3. Além disso, o gráfico de Pareto (Figura 7) foi gerado com base nos resultados, e o modelo não demonstrou falta de ajuste ($p = 0,13$).

Tabela 3 – Resultados obtidos pelo planejamento fatorial 2^4 com 3 pontos centrais.

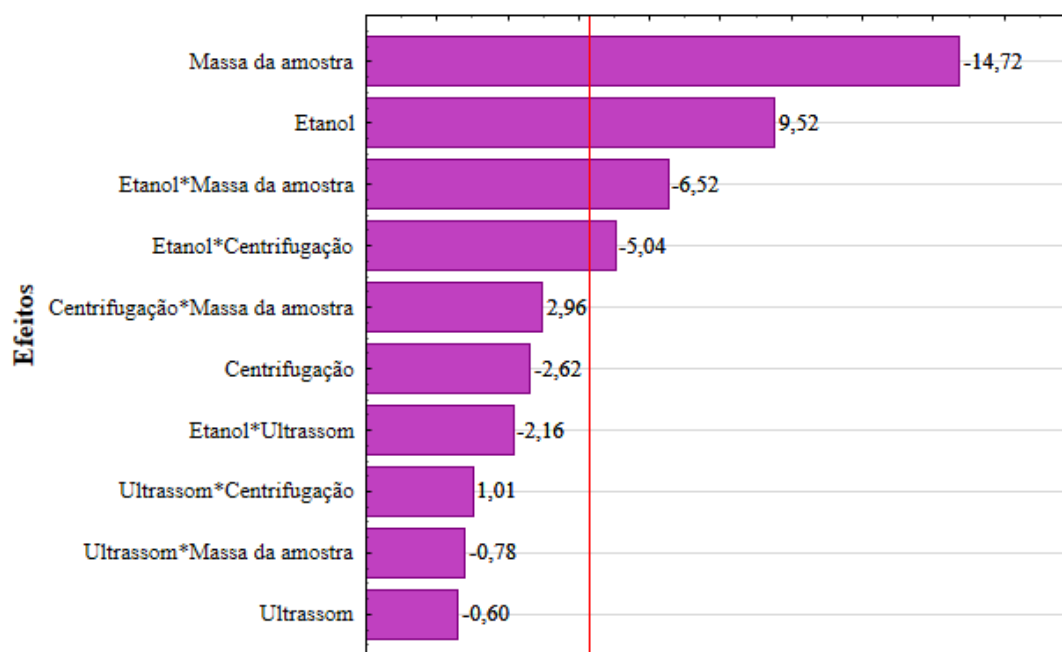
(continua)

Variáveis				Resultado Saponinas Totais
Água/Etanol (%, v/v)	Ultrassom (minutos)	Centrifugação (minutos)	Massa da amostra (g)	($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ de amostra desengordurada)
50/50	20	20	0,3508	2,307
70/30	10	10	0,2028	1,712
30/70	30	30	0,5012	1,303
30/70	10	10	0,5008	1,605
70/30	10	30	0,5011	1,570
70/30	10	10	0,5011	1,128
50/50	20	20	0,3506	1,705
70/30	30	10	0,5010	0,7580
30/70	10	20	0,2022	3,722
70/30	30	30	0,5009	1,108
30/70	30	30	0,2024	4,006

Variáveis				Resultado Saponinas Totais
Água/Etanol (%, v/v)	Água/Etanol (%, v/v)	Água/Etanol (%, v/v)	Água/Etanol (%, v/v)	(g 100 g ⁻¹ de amostra desengordurada)
70/30	30	10	0,2020	2,764
70/30	30	30	0,2026	2,968
30/70	10	30	0,5010	1,622
70/30	10	30	0,2021	2,219
30/70	10	10	0,2021	6,945
30/70	30	10	0,5009	1,897
30/70	30	10	0,2029	4,970
50/50	20	20	0,3505	1,868

Fonte: Autora.

Figura 7 – Gráfico de pareto com valores de efeito.



Fonte: Autora.

O gráfico de pareto (Figura 7) demonstrou que as variáveis que causaram efeito foram a massa da amostra e a proporção de água/etanol, assim como as interações, incluindo a interação da proporção água/etanol com o tempo de centrifugação. Com base nos resultados obtidos, observa-se que a melhor extração apresenta as seguintes condições: mistura água/etanol (30/70%, v/v), 10 minutos de ultrassom, 10 minutos de centrifugação e 0,2 g de amostra. Alinhado com esses resultados, é possível inferir que

conforme o volume do solvente etanol aumenta e a massa da amostra diminui, maior quantidade de saponinas é extraída, enquanto que as variáveis de tempo submetido no ultrassom e na centrífuga não possuem grande efeito na resposta.

Os resultados obtidos demonstraram o efeito negativo da massa, isso pode ser atribuído ao maior volume de solvente utilizado quando a massa é reduzida, que promove dissolução mais eficaz dos compostos bioativos, resultando em aumento significativo no rendimento de extração das saponinas (CHEN; LI; YAO, 2005; VINATORU, 2001). Conforme discutido anteriormente, novamente esses resultados permitem inferir que solventes de polaridade menor que a da água podem aumentar a eficiência na extração de saponinas. Isso explica o aumento nos rendimentos de extração com o incremento da proporção de etanol na solução (NAVARRO DEL HIERRO *et al.*, 2018).

Além disso, a extração utilizada trata-se da forma indireta de uso do banho ultrassônico, conforme apresentado anteriormente na Figura 6 (a, b), nessa metodologia pouco material vegetal pode ser extraído. Isso se deve ao fato de que, quando o material vegetal se encontra altamente concentrado, a transferência da energia ultrassônica é limitada, dificultando a dissolução completa dos componentes bioativos. Portanto, ao reduzir a quantidade de massa da amostra, extração mais eficiente das saponinas é observada, uma vez que há maior proporção de solvente disponível para facilitar o processo de extração (CHEN; LI; YAO, 2005; VINATORU, 2001).

5.1.2 Planejamento fatorial 2^2 com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais

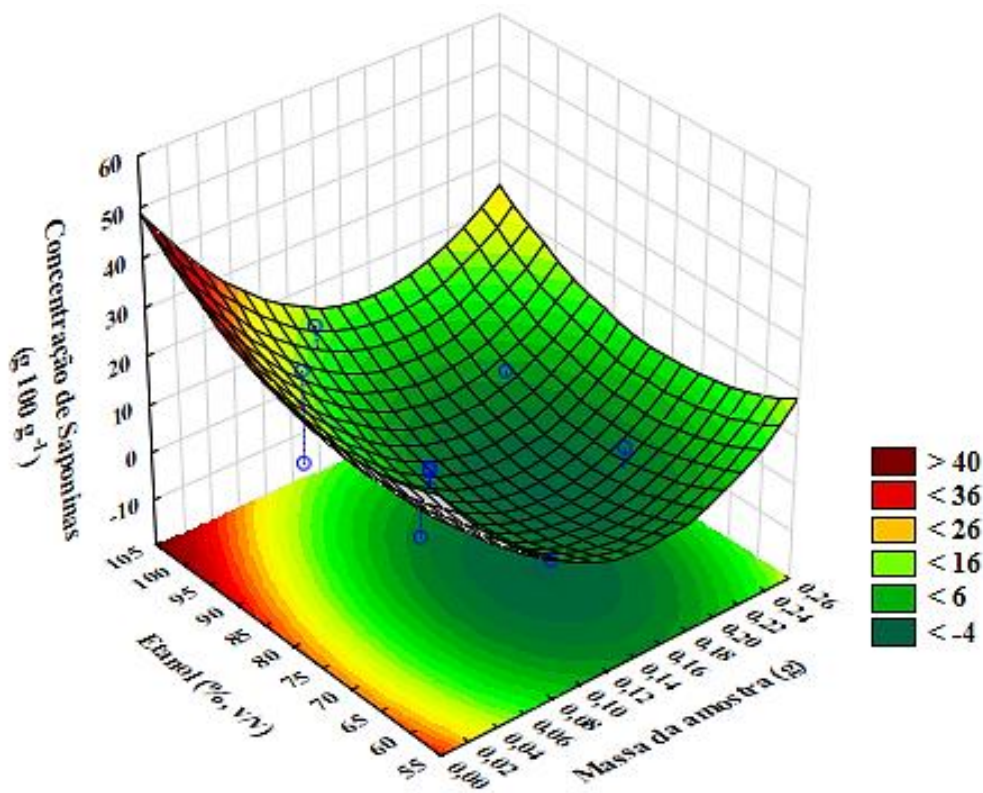
Para avaliação das variáveis: massa da amostra (0,01; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,24 g) e proporção de etanol (60; 70; 80; 90 e 100%, v/v) foi empregado planejamento fatorial 2^2 com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais. O tempo de permanência no ultrassom e na centrífuga foi mantido constante em 10 minutos em todos os experimentos, pois essas variáveis não apresentaram efeito significativo no planejamento experimental anterior. Os experimentos foram realizados de forma aleatória para evitar erros sistemáticos e os respectivos teores de saponinas ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ de amostra desengordurada) encontrados são apresentados na Tabela 4. Com esses resultados foi possível gerar o gráfico de superfície de resposta (Figura 8).

Tabela 4 – Resultados obtidos pelo planejamento fatorial 2² com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais.

Massa da amostra (g)	Água/Etanol (% v/v)	Resultado Saponinas Totais (g 100 g ⁻¹ de amostra desengordurada)
0,0506	10-90	3,063
0,0506	30-70	4,799
0,1007	100	17,49
0,1002	20-80	3,826
0,0107	20-80	35,28
0,2002	30-70	3,309
0,1007	40-60	1,636
0,2406	20-80	1,261
0,1002	20-80	3,670
0,2004	10-90	3,247
0,1001	20-80	-0,6357

Fonte: Autora.

Figura 8 – Gráfico de superfície de resposta para os efeitos massa da amostra e volume de etanol.



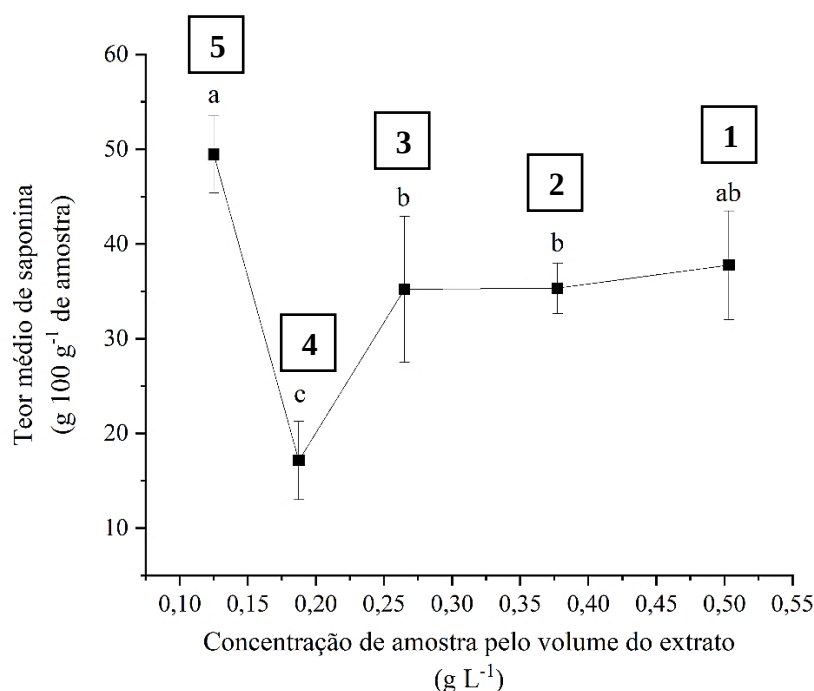
Fonte: Autora.

O gráfico de superfície de resposta (Figura 8) demonstra que à medida que a massa da amostra diminui e o volume de etanol aumenta, a quantidade de saponinas totais extraídas foram maiores. O melhor rendimento de extração ($35,28 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de amostra desengordurada) foi alcançado utilizando $0,01 \text{ g}$ de amostra e solução de etanol a 80% (v/v) como solvente extrator.

Conforme mencionado anteriormente, a resposta obtida ocorre devido a maior disponibilidade de solvente, aumentando a dissolução dos compostos bioativos, além da utilização de pouca quantidade de amostra permitir extração mais eficiente ao utilizar a forma indireta da metodologia de ultrassom. Como também é possível inferir que solventes de polaridade menor que a da água, como o etanol, podem aumentar a eficiência na extração de saponinas (CHEN; LI; YAO, 2005; NAVARRO DEL HIERRO *et al.*, 2018; VINATORU, 2001).

Como a superfície de resposta não apresentou a região ótima, realizou-se o estudo de ascensão ao máximo, para avaliar as variáveis em condições extremas, a massa da amostra ($0,02$; $0,015$; $0,01$; $0,0075$ e $0,005 \text{ g}$) e a proporção de etanol (80 ; 85 ; 90 ; 95 e 100% , v/v). Novamente o tempo de permanência no ultrassom e na centrifuga foi mantido constante em 10 minutos em todos os experimentos. Os resultados desses experimentos estão apresentados na Figura 9.

Figura 9 – Gráfico de resposta da extração de saponinas pelo estudo de ascensão ao máximo.



Fonte: Autora.

De acordo com a análise estatística ANOVA e Tukey (Figura 9), ao nível de significância de 95%, o experimento 5, com concentração de $0,125 \text{ g L}^{-1}$, que utilizou a menor massa de amostra (5 mg) e a maior proporção de etanol (100%), apresentou uma média significativamente diferente ($49 \pm 4 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de amostra desengordurada) em relação aos demais experimentos. Apenas o experimento 1, com concentração de $0,503 \text{ g L}^{-1}$ e média de $38 \pm 6 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de amostra desengordurada, apresentou semelhança estatística com o experimento 5.

Os resultados obtidos reforçam que ao diminuir a massa, a disponibilidade de solvente aumenta, promovendo maior dissolução dos compostos. Além disso, na forma indireta do ultrassom, ao utilizar pouca massa de amostra, a extração é mais eficiente. E ao utilizar o etanol, que tem menor polaridade que a água, melhor é a extração (CHEN; LI; YAO, 2005; NAVARRO DEL HIERRO *et al.*, 2018; VINATORU, 2001).

5.2 Metodologia de comparação

Com a finalidade de comparação dos resultados com a tecnologia verde aplicada (ultrassom), foi utilizada a metodologia convencional de extração de saponinas por maceração. A metodologia foi aplicada à variedade Zeus, utilizando-se a solução de metanol a 70% (v/v) como solvente extrator por 12 horas. O rendimento médio obtido foi de $4,6 \pm 0,2 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de amostra desengordurada.

Ao avaliar os resultados no teste t-Student de amostras dependentes, houve diferença estatística (valor de $p = 0,003$), em que a extração com etanol absoluto e ultrassom ($49 \pm 4 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de amostra desengordurada) apresentou-se consideravelmente mais eficiente do que a extração por maceração com metanol 70% ($4,6 \pm 0,2 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de amostra desengordurada).

Os resultados obtidos podem ser explicados pela polaridade dos solventes utilizados nas extrações. Embora o metanol e o etanol sejam solventes orgânicos e polares, a mistura de metanol com água aumenta o índice de polaridade, resultando em valor superior ao do etanol absoluto. Sendo o índice de polaridade do metanol 70% igual a 6,27, enquanto o do etanol absoluto é de 5,2 (MUSA *et al.*, 2011). Assim, o metanol a 70% apresenta polaridade mais intensa que o etanol absoluto, o que pode reduzir a eficiência na extração das saponinas devido à natureza anfifílica dessas moléculas. Além disso, conforme discutido anteriormente, solventes com menor polaridade tendem a aumentar a eficiência da extração, o que justifica o melhor desempenho do etanol absoluto em termos de rendimento (NAVARRO DEL HIERRO *et al.*, 2018).

Outra explicação para esses resultados é que a extração assistida por ultrassom apresentou maior disponibilidade de solvente devido à menor massa de amostra utilizada, promovendo assim dissolução mais eficiente dos compostos bioativos e, conseqüentemente, aumento no rendimento das saponinas extraídas, em comparação com a extração por maceração, que utilizou quantidade maior de massa (CHEN; LI; YAO, 2005; VINATORU, 2001). No entanto, a proporção massa/solvente na maceração exigiria estudo mais aprofundado, o que não foi possível neste trabalho, pois a técnica de maceração foi utilizada apenas para fins de comparação.

A partir desses resultados é possível inferir que a extração assistida por ultrassom é uma tecnologia promissora e eficiente, estando mais próxima dos princípios da química verde. Este processo utilizou etanol, solvente verde, ambientalmente preferível devido ao custo relativamente baixo e à possibilidade de ser obtido a partir de fontes renováveis, incluindo açúcares, amidos e lignocelulósicos (CAPELLO; FISCHER; HUNGERBÜHLER, 2007; LU *et al.*, 2002). Além disso, a extração por ultrassom oferece um tempo de processamento reduzido, enquanto a maceração exige tempo prolongado, o ultrassom atinge resultados superiores em poucos minutos, tornando o processo mais rápido e eficiente, além de proporcionar economia de energia.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu otimizar as melhores condições para a extração de saponinas das folhas de lúpulo, empregando o banho ultrassônico, utilizando menor quantidade de amostra (5 mg) e o uso de solvente verde (etanol absoluto).

Esses dados ressaltam que a extração assistida por ultrassom em conjunto com etanol é um método sustentável e altamente eficiente, destacando-se pela simplicidade e elevado rendimento. Além disso, alinhado aos princípios da química verde, o uso de etanol como solvente extrator agrega valor ao processo, uma vez que é considerado solvente verde, o que minimiza o impacto ambiental e contribui para a sustentabilidade. A extração também apresenta a vantagem de ser um processo rápido e de baixo consumo energético. Em comparação com metodologias convencionais, como a maceração, a extração por ultrassom oferece vantagens significativas devido aos aspectos apresentados.

A técnica se mostra promissora para a valorização dos resíduos agroindustriais a partir da extração de compostos bioativos, promovendo a economia circular, reduzindo o impacto ambiental e promovendo a sustentabilidade.

REFERÊNCIAS

- ABRAM, V.; ČEH, B.; VIDMAR, M.; HERCEZI, M.; LAZIĆ, N.; BUCIK, V.; MOŽINA, S. S.; KOŠIR, I. J.; KAČ, M.; DEMŠAR, L.; POKLAR ULRIH, N. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 124–134, 2015.
- AFONSO, S.; ARROBAS, M.; PEREIRA, E. L.; RODRIGUES, M. Â. Recycling nutrient-rich hop leaves by composting with wheat straw and farmyard manure in suitable mixtures. **Journal of Environmental Management**, v. 284, 2021.
- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I.; AZHARI, N. H. Vernonia cinerea leaves as the source of phenolic compounds, antioxidants, and anti-diabetic activity using microwave-assisted extraction technique. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 533–544, 2018.
- ALMAGUER, C.; SCHÖNBERGER, C.; GASTL, M.; ARENDT, E. K.; BECKER, T. Humulus lupulus - a story that begs to be told. A review. **J. Institute of Brewing & Distilling**, v. 120, n. 4, p. 289–314, 2014.
- ALONSO-ESTEBAN, J. I.; PINELA, J.; BARROS, L.; ĆIRIĆ, A.; SOKOVIĆ, M.; CALHELHA, R. C.; TORIJA-ISASA, E.; DE CORTES SÁNCHEZ-MATA, M.; FERREIRA, I. C. F. R. Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 134, p. 154–159, 2019.
- ALYAMMAHI, J.; RAMBABU, K.; THANIGAIVELAN, A.; BHARATH, G.; HASAN, S. W.; SHOW, P. L.; BANAT, F. Advances of non-conventional green technologies for phyto-saccharides extraction: current status and future perspectives. **Phytochemistry Reviews**, v. 22, n. 4, p. 1067–1088, 2022.
- ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green Chemistry: Theory and Practice**. 1998.
- ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301–312, 2009.
- AUGUSTIN, J. M.; KUZINA, V.; ANDERSEN, S. B.; BAK, S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 72, n. 6, p. 435–457, 2011.
- AYILARA, M. S.; OLANREWaju, O. S.; BABALOLA, O. O.; ODEYEMI, O. Waste Management through Composting: Challenges and Potentials. **Sustainability**, v. 12, n. 11, p. 4456, 2020.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.
- BACCOU, J. C.; LAMBERT, F.; SAUVAIRE, Y. Spectrophotometric method for the determination of total steroidal saponin. **Analyst**, v. 102, n. 1215, p. 458–465, 1977.
- BALANDRIN, M. F. **Commercial Utilization of Plant-Derived Saponins: An Overview of Medicinal, Pharmaceutical, and Industrial Applications**. V. 404, p. 1–14, 1996.
- BART, H. J. Extraction of Natural Products from Plants - An Introduction. **Industrial Scale Natural Products Extraction**, p. 1–25, 2011.

- BARVE, K. H.; LADDHA, K. S.; JAYAKUMAR, B. Extraction of Saponins from Safed Musli. **Pharmacognosy Journal**, v. 2, n. 13, p. 561–564, 2010.
- BELLATO SPÓSITO, M.; VERALDI ISMAEL, R.; MORAIS DE ALCÂNTARA BARBOSA, C.; LUIZ TAGLIAFERRO, A. A cultura do lúpulo. **ESALQ – Divisão de Biblioteca.**, ed. 68, 2019.
- BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state fermentation: An overview. **Chem. Biochem. Eng.**, v. 22, n. 1, p. 49–70, 2008.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA (MAPA). SECRETARIA DE AGRICULTURA FAMILIAR E COOPERATIVISMO. **Lúpulo no Brasil: perspectivas e realidades**. 2022.
- CAETANO, G.; DE, R.; MACHADO, M.; RIBEIRO, B. D.; MARRUCHO, I. M. Ultrasound-Assisted Extraction of Saponins from Beet Leaves for Soil Decontamination. **ACS Sustainable Resource Management**, v. 1, n. 3, p. 539–547, 2024.
- CAPANOGLU, E.; NEMLI, E.; TOMAS-BARBERAN, F. Novel Approaches in the Valorization of Agricultural Wastes and Their Applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 6787–6804, 2022.
- CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 927–934, 2007.
- CARBINELL-CAPELLA, J. M.; BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. Quality parameters, bioactive compounds and their correlation with antioxidant capacity of commercial fruit-based baby foods. **Food Science and Technology International**, v. 20, n. 7, p. 479–487, 2014.
- CARREIRA-CASAS, A.; OTERO, P.; GARCIA-PEREZ, P.; GARCIA-OLIVEIRA, P.; PEREIRA, A. G.; CARPENA, M.; SORIA-LOPEZ, A.; SIMAL-GANDARA, J.; PRIETO, M. A. Benefits and Drawbacks of Ultrasound-Assisted Extraction for the Recovery of Bioactive Compounds from Marine Algae. **International Journal of Environmental Research and Public Health** v. 18, n. 17, 2021.
- CASSOL, L.; RODRIGUES, E.; ZAPATA NOREÑA, C. P. Extracting phenolic compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. calyx using microwave assisted extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 133, p. 168–177, 2019.
- CASTELLARIN, I.; HIGUERA COELHO, R.; ZUKOWSKI, E.; PONCE, N. M. A.; STORTZ, C.; GERSCHENSON, L. N.; FISSORE, E. N. Effect of ultrasonic pretreatments on the characteristics of pectin extracted from Salustiana orange cultivated in Argentina. **Journal of Food Process Engineering**, v. 46, n. 6, 2023.
- CHAIIEB, I. Saponins as Insecticides: A Review. **Tunisian Journal of Plant Protection**, v. 5, n.1, p. 39-50, 2010.
- CHAVES, J. O.; DE SOUZA, M. C.; DA SILVA, L. C.; LACHOS-PEREZ, D.; TORRES-MAYANGA, P. C.; MACHADO, A. P. da F.; FORSTER-CARNEIRO, T.; VÁZQUEZ-ESPINOSA, M.; GONZÁLEZ-DE-PEREDO, A. V.; BARBERO, G. F.; ROSTAGNO, M. A. Extraction of Flavonoids From Natural Sources Using Modern Techniques. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, 2020.
- CHEN, Y.; XIE, M. Y.; GONG, X. F. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 162–170, 2007.

- CHEOK, C. Y.; SALMAN, H. A. K.; SULAIMAN, R. Extraction and quantification of saponins: A review. **Food Research International**, v. 59, p. 16–40, 2014.
- CORREIA, R. T.; BORGES, K. C.; MEDEIROS, M. F.; GENOVESE, M. I. Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. **Food Science and Technology International**, v. 18, n. 6, p. 539–547, 2012.
- DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 2010.
- DEUBLEIN, D.; STEINHAUSER, A. Biogas from Waste and Renewable Resources: An Introduction. **Wiley & Sons**, 2011.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **FAOSTAT**. 2022. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data>>.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). State of Food and Agriculture - Moving forward on food loss and waste reduction. 2019.
- FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 6, p. 587–605, 2002.
- FREITAS, L. C.; BARBOSA, J. R.; DA COSTA, A. L. C.; BEZERRA, F. W. F.; PINTO, R. H. H.; CARVALHO JUNIOR, R. N. de. From waste to sustainable industry: How can agro-industrial wastes help in the development of new products? **Resources, Conservation and Recycling**, v. 169, p. 105466, 2021.
- FU, X.; WANG, D.; BELWAL, T.; XIE, J.; XU, Y.; LI, L.; ZOU, L.; ZHANG, L.; LUO, Z. Natural deep eutectic solvent enhanced pulse-ultrasonication assisted extraction as a multi-stability protective and efficient green strategy to extract anthocyanin from blueberry pomace. **LWT – Food Science and Technology**, v. 144, 2021.
- GABER, Y.; TÖRNVALL, U.; KUMAR, M. A.; ALI AMIN, M.; HATTI-KAUL, R. HPLC-EAT (Environmental Assessment Tool): A tool for profiling safety, health and environmental impacts of liquid chromatography methods. **Green Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2021–2025, 2011.
- GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z. M.; KONIECZKA, P.; NAMIEŚNIK, J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 61–72, 2012.
- GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. de la. Challenges in green analytical chemistry. **Royal Society of Chemistry**, 2020.
- GERHÄUSER, C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 13, p. 1941–1954, 2005a.
- GERHÄUSER, C. Broad spectrum antiinfective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, n. 9, p. 827–831, 2005b.
- GIL-MARTÍN, E.; FORBES-HERNÁNDEZ, T.; ROMERO, A.; CIANCIOSI, D.; GIAMPIERI, F.; BATTINO, M. Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. **Food Chemistry**, v. 378, p. 131918, 2022.

- GREEN, F. Union recognition and paid holiday entitlement. **British Journal of Industrial Relations**, v. 35, n. 2, p. 243–255, 1997
- GRENBY, T. H. Intense sweeteners for the food industry: an overview. **Trends in Food Science & Technology**, v. 2, n. C, p. 2–6, 1991.
- GUARDIA, M. de la; ARMENTA, S. Green Analytical Chemistry: Theory and Practice. Elsevier, v. 57, 2011.
- GUARDIA, M. de la; GARRIGUES, S. Handbook of Green Analytical Chemistry. **Wiley & Sons**, 2012.
- GUARDIA, M. de la; RUZICKA, J. Towards environmentally conscientious analytical chemistry through miniaturization, containment and reagent replacement. **Analyst**, v. 120, n. 2, 1995.
- GUCLU-USTUNDAG, Ö.; MAZZA, G. Saponins: Properties, Applications and Processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 231–258, 2007.
- HABICHT, S. D.; KIND, V.; RUDLOFF, S.; BORSCH, C.; MUELLER, A. S.; PALLAUF, J.; YANG, R. Y.; KRAWINKEL, M. B. Quantification of antidiabetic extracts and compounds in bitter gourd varieties. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 172–176, 2011.
- HADIDI, M.; IBARZ, A.; PAGAN, J. Optimisation and kinetic study of the ultrasonic-assisted extraction of total saponins from alfalfa (*Medicago sativa*) and its bioaccessibility using the response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125786, 2020.
- HARALAMPIDIS, K.; TROJANOWSKA, M.; OSBOURN, A. E. Biosynthesis of Triterpenoid Saponins in Plants. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 75, p. 31–49, 2002.
- HARTMAN, R.; HELMY, R.; AL-SAYAH, M.; WELCH, C. J. Analytical Method Volume Intensity (AMVI): A green chemistry metric for HPLC methodology in the pharmaceutical industry. **Green Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 934–939, 2011.
- HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. Lignocellulosic Biorefineries in Europe: Current State and Prospects. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 231–234, 2019.
- HE, Q.; DU, B.; XU, B. Extraction Optimization of Phenolics and Antioxidants from Black Goji Berry by Accelerated Solvent Extractor Using Response Surface Methodology. **Applied Sciences**, v. 8, n. 10, p. 1905, 2018.
- HENG, L.; VINCKEN, J. P.; VAN KONINGSVELD, G.; LEGGER, A.; GRUPPEN, H.; VAN BOEKEL, T.; ROOZEN, J.; VORAGEN, F. Bitterness of saponins and their content in dry peas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 8, p. 1225–1231, 2006.
- HENG, M. Y.; TAN, S. N.; YONG, J. W. H.; ONG, E. S. Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 1–10, 2013.
- HIAI, S.; OURA, H.; ODAKA, Y.; NAKAJIMA, T. A colorimetric estimation of Ginseng saponins. **Planta Medica**, v. 28, n. 4, p. 363–369, 1976.
- HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Saponins. **Cambridge University**, 1995.

HRNČIČ, M. K.; ŠPANINGER, E.; KOŠIR, I. J.; KNEZ, Ž.; BREN, U. Hop Compounds: Extraction Techniques, Chemical Analyses, Antioxidative, Antimicrobial, and Anticarcinogenic Effects. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 257, 2019.

IGLESIAS, A.; GIMENEZ MARTINEZ, P.; RAMIREZ, C.; MITTON, G.; MEROI AR CERITO, F. R.; FANGIO, M. F.; CHURIO, M. S.; FUSELLI, S.; FANOVICH, A.; EGUARAS, M.; MAGGI, M. Valorization of hop leaves for development of eco-friendly bee pesticides. **Apidologie**, v. 52, n. 1, p. 186–198, 1 fev. 2021.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. **Secretaria da Saúde - Governo do Estado de São Paulo**, 2008

JAYATHILAKAN, K.; SULTANA, K.; RADHAKRISHNA, K.; BAWA, A. S. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: A review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 278–293, 2012.

KADERIDES, K.; PAPAOIKONOMOU, L.; SERAFIM, M.; GOULA, A. M. Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 137, p. 1–11, 2019.

KALINOWSKA, M.; ZIMOWSKI, J.; PĄCZKOWSKI, C.; WOJCIECHOWSKI, Z. A. The formation of sugar chains in triterpenoid saponins and glycoalkaloids. **Phytochemistry Reviews**, v. 4, n. 2–3, p. 237–257, 2005.

KARABÍN, M.; HUDCOVÁ, T.; JELÍNEK, L.; DOSTÁLEK, P. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 3, p. 542–567, 2016.

KARAK, T.; SONAR, I.; NATH, J. R.; PAUL, R. K.; DAS, S.; BORUAH, R. K.; DUTTA, A. K.; DAS, K. Struvite for composting of agricultural wastes with termite mound: Utilizing the unutilized. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 49–59, 2015.

KAVALIER, A. R.; LITT, A.; MA, C.; PITRA, N. J.; COLES, M. C.; KENNELLY, E. J.; MATTHEWS, P. D. Phytochemical and morphological characterization of hop (*Humulus lupulus* L.) cones over five developmental stages using high performance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry, ultrahigh performance liquid chromatography photodiode array detection, and light microscopy techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4783–4793, 2011.

KITAGAWA, I. Licorice root. A natural sweetener and an important ingredient in Chinese medicine. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 7, p. 1189–1198, 2002.

KOEL, M.; KALJURAND, M. Green Analytical Chemistry. **Royal Society of Chemistry**, ed. 2, Londres, 2019.

KOPEĆ, M.; MIERZWA-HERSZTEK, M.; GONDEK, K.; WOLNY-KOŁADKA, K.; ZDANIEWICZ, M.; JAROSZ, R. Biological activity of composts obtained from hop waste generated during the brewing. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 4, p. 1271–1279, 2022.

KROTTENTHALER, M. Hops. **Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets**, p. 85–104, 2009.

LI, D.; BAERT, L.; UYTENDAELE, M. Inactivation of food-borne viruses using natural biochemical substances. **Food Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 1–9, 2013.

- LI, H.; CHEN, B.; YAO, S. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 12, n. 4, p. 295–300, 2005.
- LI, J.; ZU, Y. G.; FU, Y. J.; YANG, Y. C.; LI, S. M.; LI, Z. N.; WINK, M. Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 4, p. 637–643, 2010.
- LIU, Y. W.; ZHU, X.; LU, Q.; WANG, J. Y.; LI, W.; WEI, Y. Q.; YIN, X. X. Total saponins from Rhizoma Anemarrhenae ameliorate diabetes-associated cognitive decline in rats: Involvement of amyloid-beta decrease in brain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 194–200, 2012.
- LIU, Y.; LI, Z.; XU, H.; HAN, Y. Extraction of Saponin from *Camellia oleifera* Abel Cake by a Combination Method of Alkali Solution and Acid Isolation. **Journal of Chemistry**, 2016.
- LU, J.; BOUGHNER, E. C.; LIOTTA, C. L.; ECKERT, C. A. Nearcritical and supercritical ethanol as a benign solvent: polarity and hydrogen-bonding. **Fluid Phase Equilibria**, v. 198, n. 1, p. 37–49, 2002.
- MACHADO, A. P. D. F.; SUMERE, B. R.; MEKARU, C.; MARTINEZ, J.; BEZERRA, R. M. N.; ROSTAGNO, M. A. Extraction of polyphenols and antioxidants from pomegranate peel using ultrasound: influence of temperature, frequency and operation mode. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 9, p. 2792–2801, 2019.
- MAHATO, S. B.; SARKAR, S. K.; PODDAR, G. Triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3037–3067, 1988.
- MAN, S.; GAO, W.; ZHANG, Y.; HUANG, L.; LIU, C. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 703–714, 2010.
- MARTÍNEZ, J.; CORTÉS, J. F.; MIRANDA, R. Green Chemistry Metrics, A Review. **Processes**, v. 10, n. 7, p. 1274, 2022.
- MELGAR, B.; DIAS, M. I.; CIRIC, A.; SOKOVIC, M.; GARCIA-CASTELLO, E. M.; RODRIGUEZ-LOPEZ, A. D.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. R. F. Bioactive characterization of *Persea americana* Mill. by-products: A rich source of inherent antioxidants. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 212–218, 2018.
- MILGATE, J.; ROBERTS, D. C. K. The nutritional & biological significance of saponins. **Nutrition Research**, v. 15, n. 8, p. 1223–1249, 1995.
- MIRABELLA, N.; CASTELLANI, V.; SALA, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 65, p. 28–41, 2014.
- MIYAKOSHI, M.; TAMURA, Y.; MASUDA, H.; MIZUTANI, K.; TANAKA, O.; IKEDA, T.; OHTANI, K.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. Antiyeast steroidal saponins from *Yucca schidigera* (Mohave Yucca), a new anti-food-deteriorating agent. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 3, p. 332–338, 2000.
- MOHAN, V. R.; TRESINA, P. S.; DAFFODIL, E. D. Antinutritional Factors in Legume Seeds: Characteristics and Determination. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 211–220, 2016.

MOLINO, A.; RIMAURO, J.; CASELLA, P.; CERBONE, A.; LAROCCA, V.; CHIANESE, S.; KARATZA, D.; MEHARIYA, S.; FERRARO, A.; HRISTOFOROU, E.; MUSMARRA, D. Extraction of astaxanthin from microalga *Haematococcus pluvialis* in red phase by using generally recognized as safe solvents and accelerated extraction. **Journal of Biotechnology**, v. 283, p. 51–61, 2018.

MORCOL, T. B.; MATTHEWS, P. D.; KENNELLY, E. J. Differences in Leaf Chemistry and Glandular Trichome Density between Wild Southwestern American Hop (*Humulus neomexicanus*) and Commercial Hop Cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 27, p. 7798–7814, 2021.

MOSTAFA, A.; SUDISHA, J.; EL-SAYED, M.; ITO, S. I.; IKEDA, T.; YAMAUCHI, N.; SHIGYO, M. Aginoside saponin, a potent antifungal compound, and secondary metabolite analyses from *Allium nigrum* L. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 2, p. 274–280, 2013.

MROCZEK, A.; KAPUSTA, I.; STOCHMAL, A.; JANISZOWSKA, W. MS/MS and UPLC-MS profiling of triterpenoid saponins from leaves and roots of four red beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars. **Phytochemistry Letters**, v. 30, p. 333–337, 2019.

MUIR, A. D.; PATON, D.; BALLANTYNE, K.; AUBIN, A. A. Process for recovery and purification of saponins and sapogenins from quinoa (*Chenopodium quinoa*). **US Patent 6,355,249**. 2002.

MUSA, K. H.; ABDULLAH, A.; JUSOH, K.; SUBRAMANIAM, V. Antioxidant Activity of Pink-Flesh Guava (*Psidium guajava* L.): Effect of Extraction Techniques and Solvents. **Food Analytical Methods**, v. 4, n. 1, p. 100–107, 2011.

National Environmental Methods Index. Disponível em: <<https://www.nemi.gov/home/>>.

NAVARRO DEL HIERRO, J.; HERRERA, T.; GARCÍA-RISCO, M. R.; FORNARI, T.; REGLERO, G.; MARTIN, D. Ultrasound-assisted extraction and bioaccessibility of saponins from edible seeds: quinoa, lentil, fenugreek, soybean and lupin. **Food Research International**, v. 109, p. 440–447, 2018.

NAVIGLIO, D.; SCARANO, P.; CIARAVOLO, M.; GALLO, M. Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): A Powerful and Greener Alternative to the Latest Solid-Liquid Extraction Techniques. **Foods**, v. 8, n. 7, p. 245, 2019.

NCUBE, B.; NGUNGE, V. N. P.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. A comparative study of the antimicrobial and phytochemical properties between outdoor grown and micropropagated *Tulbaghia violacea* Harv. plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 3, p. 775–780, 2011.

NEGESSE, T. Nutrient composition, volatile fatty acids production, digestible organic matter and anti-nutritional factors of some agro-industrial by-products of Ethiopia. **SINET: Ethiopian Journal of Science**, v. 32, n. 2, p. 149–156, 2009.

NUNES, M. A.; ALVES, R. C.; COSTA, A. S. G.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; PUGA, H. Olive pomace phenolics extraction: Conventional vs emergent methodologies. **WASTES - Solutions, Treatments and Opportunities**, p. 395–402, 2018.

OAKENFULL, D. Saponins in food - A review. **Food Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 19–40, 1981.

OKAFOR, V. N.; ANYALEBECHI, R. I.; OKAFOR, U. W.; OKONKWO, C. P.; OBIEFUNA, J. N.; OBIADI, M. C. Phytochemical Constituents of Extracts of Hops and

Some Potential Nigerian Hop Substitutes: A Comparative Study in Beer Brewing. **International Journal of Biological and Chemical Research**, v.1, 2020.

PAEPATUNG, N.; SONGKASIRI, W.; NOPHARATANA, A. Bio-methane potential of biological solid materials and agricultural wastes. **Asian Journal on Energy and Environment**, p. 19-27, 2009.

PATEL, P. K.; PATEL, M. A.; VYAS, B. A.; SHAH, D. R.; GANDHI, T. R. Antiuro lithiatic activity of saponin rich fraction from the fruits of *Solanum xanthocarpum* Schrad. & Wendl. (Solanaceae) against ethylene glycol induced urolithiasis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 1, p. 160–170, 2012.

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

PIORKOWSKI, D. T.; MCCLEMENTS, D. J. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 5–41, 2014.

PŁOTKA-WASYLKA, J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. **Talanta**, v. 181, p. 204–209, 2018.

PRICE, K. R.; JOHNSON, I. T.; FENWICK, G. R. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 27–135, 1987.

RAYNIE, D.; DRIVER, J. L. Green assessment of chemical methods. **13th Green Chemistry and Engineering Conference**, Washington, 2009.

REGINATTO, F. H.; KAUFFMANN, C.; SCHRIPSEMA, J.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEF, E. P. Steroidal and Triterpenoidal Glucosides from *Passiflora alata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 1, p. 32–36, 2001.

REICHARDT, C.; WELTON, T. Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry - **Wiley-VCH**, v. 4, 2011.

RODRÍGUEZ DE LUNA, S. L.; RAMÍREZ-GARZA, R. E.; SERNA SALDÍVAR, S. O. Environmentally Friendly Methods for Flavonoid Extraction from Plant Material: Impact of Their Operating Conditions on Yield and Antioxidant Properties. **The Scientific World Journal**, v. 2020, n. 1, 2020.

ROEHRER, S.; STORK, V.; LUDWIG, C.; MINCEVA, M.; BEHR, J. Analyzing bioactive effects of the minor hop compound xanthohumol C on human breast cancer cells using quantitative proteomics. **PLOS ONE**, v. 14, n. 3, p. 1, 2019.

SABBATINI, G.; MARI, E.; ORTORE, M. G.; DI GREGORIO, A.; FATTORINI, D.; DI CARLO, M.; GALEAZZI, R.; VIGNAROLI, C.; SIMONI, S.; GIORGINI, G.; GUARRASI, V.; CHIANCONE, B.; LETO, L.; CIRLINI, M.; DEL VECCHIO, L.; MANGIONE, M. R.; VILASI, S.; MINNELLI, C.; MOBBILI, G. Hop leaves: From waste to a valuable source of bioactive compounds – A multidisciplinary approach to investigating potential applications. **Heliyon**, v. 10, n. 18, p. e37593, 2024.

SADH, P. K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2018.

SAJID, M.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Green analytical chemistry metrics: A review. **Talanta**, v. 238, 2022.

SCHWARZ, M. W. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. **Wiley Online Library**, 2003.

SEN, K.; SINGH CHOUHAN, K.; TANDEY, R.; MEHTA, R.; MANDAL, V. Impact of microwaves on the extraction yield of phenolics, flavonoids, and triterpenoids from centella leaves: An approach toward digitized robust botanical extraction. **Pharmacognosy Magazine**, v. 15, n. 64, p. 267, 2019.

SERRANO-LEÓN, J. S.; BERGAMASCHI, K. B.; YOSHIDA, C. M. P.; SALDAÑA, E.; SELANI, M. M.; RIOS-MERA, J. D.; ALENCAR, S. M.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J. Chitosan active films containing agro-industrial residue extracts for shelf life extension of chicken restructured product. **Food Research International**, v. 108, p. 93–100, 2018.

SHAKER, E. S. Antioxidative effect of extracts from red grape seed and peel on lipid oxidation in oils of sunflower. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 8, p. 883–892, 2006.

SHEN, L.; PANG, S.; ZHONG, M.; SUN, Y.; QAYUM, A.; LIU, Y.; RASHID, A.; XU, B.; LIANG, Q.; MA, H.; REN, X. A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 101, 2023.

SHI, J.; ARUNASALAM, K.; YEUNG, D.; KAKUDA, Y.; MITTAL, G.; JIANG, Y. Saponins from Edible Legumes: Chemistry, Processing, and Health Benefits. **Journal of Medicinal Food**, v. 7, n. 1, p. 67–78, 2004.

SHINDE, R.; SHAHI, D. K.; MAHAPATRA, P.; SINGH, C. S.; NAIK, S. K.; THOMBARE, N.; SINGH, A. K. Management of crop residues with special reference to the on-farm utilization methods: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 181, 2022.

SIHOMBING, J. R.; DHARMA, A.; CHAIDIR, Z.; ALMAHDY; FACHRIAL, E.; MUNAF, E. Phytochemical screening and antioxidant activities of 31 fruit peel extract from Sumatera, Indonesia. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, p. 190–196, 2015.

SINGH, R.; DAS, R.; SANGWAN, S.; ROHATGI, B.; KHANAM, R.; PEERA, S. K. P. G.; DAS, S.; LYNGDOH, Y. A.; LANGYAN, S.; SHUKLA, A.; SHRIVASTAVA, M.; MISRA, S. Utilisation of agro-industrial waste for sustainable green production: a review. **Environmental Sustainability**, v. 4, n. 4, p. 619–636, 2021.

SIRTORI, C. R. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 3, p. 183–193, 2001.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2–3, p. 219–243, 2004.

STEVENS, J. F.; IVANCIC, M.; HSU, V. L.; DEINZER, M. L. Prenylflavonoids from *Humulus lupulus*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 8, p. 1575–1585, 1997.

TARIQ, A.; BHAWANI, S. A.; MOHEMAN, A.; ALOTAIBI, K. M. Introduction to agro-industrial waste. **Extraction of Natural Products from Agro-industrial Wastes: A Green and Sustainable Approach**, p. 1–18, 2023.

TIAN, B.; QIAO, Y.; TIAN, Y.; XIE, K.; LI, D.. Effect of heat reflux extraction on the structure and composition of a high-volatile bituminous coal. **Applied Thermal Engineering**, v. 109, p. 560–568, 2016.

- TRIPATHI, N.; HILLS, C. D.; SINGH, R. S.; ATKINSON, C. J. Biomass waste utilisation in low-carbon products: harnessing a major potential resource. **Climate and Atmospheric Science** 2019 2:1, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2019.
- VARMA, V. S.; YADAV, J.; DAS, S.; KALAMDHAD, A. S. Potential of waste carbide sludge addition on earthworm growth and organic matter degradation during vermicomposting of agricultural wastes. **Ecological Engineering**, v. 83, p. 90–95, 1 2015.
- VEGGI, P. C.; MARTINEZ, J.; MEIRELES, M. A. A. Fundamentals of Microwave Extraction. **Food Engineering Series**, p. 15–52, 2012.
- VERRUCK, S.; PRUDENCIO, E. S. Ultrassom na indústria de alimentos: aplicações no processamento e conservação. **Atena Editora**, p. 25-30, 2018.
- VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 3, p. 303–313, 2001.
- VINCKEN, J. P.; HENG, L.; DE GROOT, A.; GRUPPEN, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. **Phytochemistry**, v. 68, n. 3, p. 275–297, 2007
- WANG, B.; DONG, F.; CHEN, M.; ZHU, J.; TAN, J.; FU, X.; WANG, Y.; CHEN, S. Advances in Recycling and Utilization of Agricultural Wastes in China: Based on Environmental Risk, Crucial Pathways, Influencing Factors, Policy Mechanism. **Procedia Environmental Sciences**, v. 31, p. 12–17, 2016.
- WANG, Y.; MA, Y.; TAO, L.; ZHANG, X.; HAO, F.; ZHAO, S.; HAN, L.; BAI, C. Recent Advances in Separation and Analysis of Saponins in Natural Products. **Separations**, v. 9, n. 7, p. 163, 2022.
- WARDENCKI, W.; CURYŁO, J.; NAMIEŚNIK, J. Green chemistry - Current and future issues. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 14, n. 4, p. 389–395, 2005.
- WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production - A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8093–8105, 2005.
- WOJCIECHOWSKI, K.; KEZWON, A.; LEWANDOWSKA, J.; MARCINKOWSKI, K. Effect of β -casein on surface activity of Quillaja bark saponin at fluid/fluid interfaces. **Food Hydrocolloids**, v. 34, p. 208–216, 2014.
- WU, J.; LIN, L.; CHAU, F. T. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 4, p. 347–352, 2001.
- YANG, Y.; LESER, M. E.; SHER, A. A.; MCCLEMENTS, D. J. Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin (Q-Naturale®). **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p. 589–596, 2013.
- YU, Q.; LI, C.; DUAN, Z.; LIU, B.; DUAN, W.; SHANG, F. Ultrasonic microwave-assisted extraction of polyphenols, flavonoids, triterpenoids, and Vitamin C from *Clinacanthus nutans*. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 35, n. 1, p. 89–94, 2017.
- YU, Z.; ZHANG, T.; ZHOU, F.; XIAO, X.; DING, X.; HE, H.; RANG, J.; QUAN, M.; WANG, T.; ZUO, M.; XIA, L. Anticancer Activity of Saponins from *Allium chinense* against the B16 Melanoma and 4T1 Breast Carcinoma Cell. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, n. 1, 2015.

YÜCEKUTLU, A. N.; BILDACI, I. Determination of plant saponins and some of Gypsophila species: A review of the literature. **Hacettepe J. Biol. & Chem**, p. 129-135, 2008.

YUSOFF, I. M.; MAT TAHER, Z.; RAHMAT, Z.; CHUA, L. S. A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. **Food Research International**, v. 157, p. 111268, 2022.

ZHANG, M.; ZENG, G.; PAN, Y.; QI, N. Difference research of pectins extracted from tobacco waste by heat reflux extraction and microwave-assisted extraction. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 359–363, 2018.

ZHENG, X.; XU, X.; LIU, C.; SUN, Y.; LIN, Z.; LIU, H. Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions. **Separation and Purification Technology**, v. 104, p. 17–25, 2013.