



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA  
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO**

**FRANCISCA MANUELA SANTOS DA SILVA**

**FRACIONAMENTO DO EXTRATO DE CASCA DE MANGA (*Mangifera indica L.*) CV.  
TOMMY ATKINNS PARA OBTENÇÃO DE MANGIFERINA POR HPLC-UV/VIS  
PREPARATIVO**

**FORTALEZA  
2019**

FRANCISCA MANUELA SANTOS DA SILVA

FRACIONAMENTO DO EXTRATO DE CASCA DE MANGA (*Mangifera indica L.*) CV.  
TOMMY ATKINS PARA OBTENÇÃO DE MANGIFERINA POR HPLC-UV/VIS  
PREPARATIVO

Monografia apresentada ao Curso de Química Bacharelado da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química com habilitação em Química Industrial.

Orientadora Pedagógico: Prof. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

Orientador Profissional: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S58f Silva, Francisca Manuela Santos da.  
Fracionamento do extrato de casca de manga (*Mangifera indica L.*) cv. Tommy Atkins para obtenção de mangiferina por HPLC-UV/VIS preparativo / Francisca Manuela Santos da Silva. – 2019.  
44 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.  
Coorientação: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito.

1. Mangiferina. 2. *Mangifera indica L.* 3. Compostos fenólicos. 4. Cromatografia. I. Título.  
CDD 540

---

FRANCISCA MANUELA SANTOS DA SILVA

FRACIONAMENTO DO EXTRATO DE CASCA DE MANGA (*Mangifera indica L.*) CV.  
TOMMY ATKINS PARA OBTENÇÃO DE MANGIFERINA POR HPLC-UV/VIS  
PREPARATIVO

Monografia apresentada ao Curso de Química Bacharelado da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química com habilitação em Química Industrial.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo (Orientador Pedagógico)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro (Examinador)  
Embrapa Agroindústria Tropical

---

Dr. Ito Liberato Barroso Neto (Examinador)  
Centro Universitário Christus (Unichristus)

A Deus, aos meus pais Maria e Francisco, ao meu irmão Fernando, às minhas primas Rosangela, Solange e Suely, ao André, aos meus tios Socorro e Edinaldo, às minhas amigas Catarina, Raíssa, Renata, Natalia e Thiciane, aos Profs. Valder e Geancarlo, ao Bruno, ao Ito e ao Eduardo e a todos os colegas e amigos do grupo LBA.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por permitir sempre que eu tivesse um novo dia para começar e que de alguma forma mostrou que eu não estava sozinha.

Aos meus pais, Francisco A. V. da Silva, e principalmente minha mãe, Maria Santos que sempre me apoiou e nunca me deixou desistir me dando força sempre, dizendo que eu ia conseguir e por me guiar pela vida.

Ao meu irmão, Fernando Santos, pela paciência inconstante, pelos momentos de alegria, pelas brigas também (rsrsrsrs) e principalmente por ser o melhor irmão do mundo.

Às minhas primas e amigas Rosangela V. da Silva, Solange V. da Silva e Suely V. da Silva pelo jeito único de cada uma me dizer que tudo daria e continuará dando certo. Pelos inúmeros momentos de descontração, pelas gargalhadas, pelas noites de muita comida, por me escutarem.

Aos meus tios Socorro V. da Silva e Edinaldo da Silva por serem sempre maravilhosos comigo e me tratarem como a quarta filha (rsrsrsrs) e por terem me dado as melhores primas que se poderia ter.

Ao André Sousa que do jeito dele me dizia que tudo daria certo. E mesmo com toda implicância eu sei que esse é o jeito dele dizer que está torcendo por mim.

Aos meus orientadores Profa. Dra. Nágila Maria P. S. Ricardo do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará e Prof. Dr. Edy Sousa de Brito pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical pela orientação para realização deste trabalho.

Ao Prof. Valder Nogueira do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, meu orientador durante toda a iniciação científica, por me receber em seu laboratório e ter me mantido nele durante estes anos.

Aos Drs. Bruno Lopes, Ito L. Barroso Neto e Eduardo B. Salviano por me ensinarem tudo que aprendi no Laboratório de Biofísica Aplicada e por sempre acreditarem em mim.

Ao Prof. Geancarlo Zanatta do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará que me ajudou bastante nos últimos meses com as conversas sobre o curso, sobre o futuro na carreira acadêmica, etc.

Às minhas amigas da UFC, Catarina Lavor, Raíssa C. Oliveira, Renata Costa, Natalia Gomes e Thiciane Almeida, pelo jeito único de ser de cada uma, por me aceitarem em suas vidas, porque amigos são a família que escolhemos. Pelos inúmeros momentos de idas ao shopping, pela paciência em me escutar, pelo enorme apoio, pelas conversas sem sentido e

com sentido, pelos almoços no RU, pelos domingos de muita pipoca com brigadeiro e refrigerante na casa da Catarina ou da Raíssa, pelos momentos de estudos, pelos momentos pós prova em que nada na vida parecia fazer sentido, enquanto o resultado não saía e quando saía também, por todos os momentos inclusive os que ainda nem tivemos (rsrsrs).

Aos amigos, Matheus Victor, Marilia Mota e Carlos José pelas conversas, apoio e brincadeiras malucas.

À Stefane Nunes pela ajuda em conseguir a primeira bolsa de iniciação científica.

À D. Socorro Costa, ao Detlev Costa, a Raquel Costa e a Roberta Costa, por me receberem várias vezes em sua casa para o almoço durante algum semestre da vida.

Ao LBA por todo o conhecimento que adquiri nesses quatro anos e aos amigos e colegas do grupo.

À Embrapa Agroindústria Tropical e a todos do Laboratório Multisuários de Química de Produtos Naturais por terem me recebido para realização deste trabalho, principalmente ao Oiram Filho, Ana Sheila, Gladys Santos, Cristine Vidal, Juliana Sales, Lorena Mara e Paulo Riceli.

E por fim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

“Há apenas duas maneiras de viver a vida.  
Uma, é como se nada fosse um milagre. A  
outra, é como se tudo fosse.”

- Albert Einstein

## RESUMO

A manga (*Mangifera indica L.*) pertencente à família *Anarcadiaceae* é um dos frutos mais cultivados no mundo. A atividade agroindustrial gera altas quantidades de resíduos que podem ser utilizados para recuperação de compostos bioativos com importantes aplicabilidades para as indústrias de fármacos, cosméticos, alimentícia, por exemplo, tornando-se uma alternativa para reverter os impactos ambientais e econômicos proveniente da geração de resíduos. Portanto, o objetivo desse trabalho é o fracionamento do extrato de casca de manga para obtenção de compostos fenólicos como a mangiferina (xantona) e outro metabólitos. O extrato metanólico de casca de manga foi obtido no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais situado na Embrapa Agroindústria Tropical através de extração por Soxleht e concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida, sendo posteriormente liofilizado. A separação cromatográfica do extrato em HPLC-DAD analítico foi conduzida em modo exploratório utilizando uma coluna cromatográfica de fase-reversa Shimadzu Shim-pack CLC-ODS (M) C<sub>18</sub> (250 mm x 4.6 mm). A fase móvel utilizada foi composta de metanol e água, ambos acidificados com ácido trifluoracético 0,05% (v/v), em um gradiente de eluição com análise cromatográfica de 60 minutos. O fracionamento foi realizado em escala preparativa, utilizando uma coluna cromatográfica de fase reversa Waters SunFire Prep C<sub>18</sub> OBD (100 mm x 19 mm), empregando o mesmo método da escala analítica com análise cromatográfica de 45 minutos. Em ambas as análises os cromatogramas foram monitorados em um comprimento de onda de 280 nm. A confirmação estrutural da mangiferina e de outros metabólitos secundários foi realizada por UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> mediante as fórmulas moleculares e os valores de *m/z* obtidos a partir de espectros de alta resolução, observados nos cromatogramas com picos de maior intensidade, por meio do software Mass Lynx (Water Corporation).

**Palavras-chave:** Mangiferina. *Mangifera Indica L.* Compostos fenólicos. Cromatografia.

## ABSTRACT

Mango (*Mangifera indica L.*) belonging to the *Anarcadiaceae* family is one of the most cultivated fruits in the world. Agroindustrial activity generates high amounts of waste that can be used for recovery of bioactive compounds with important applications for the pharmaceutical, cosmetic and food industries, for example, becoming an alternative to revert the environmental and economic impacts from waste generation. Therefore, the objective of this work is the fractionation of mango bark extract to obtain phenolic compounds such as mangiferin (xanthone) and other metabolites. The methanolic extract of mango peel obtained in the Laboratório Multusuário de Química de Produtos Naturais located at Embrapa Agroindústria Tropical by Soxleht extraction and concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure, and then lyophilized. The chromatographic separation of the analytical HPLC-DAD extract was conducted in the exploratory mode using a Shimadzu Shim-pack CLC-ODS (M) C18 (250 mm x 4.6 mm) phase-reversed chromatography column. The mobile phase used was composed of methanol and water, both acidified with 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid, in an elution gradient with 60 minutes chromatographic analysis. Fractionation was performed on a preparative scale using a Waters SunFire Prep C18 OBD reverse phase chromatographic column (100 mm x 19 mm) using the same analytical scale method with a 45 minutes chromatographic analysis. In both analyzes the chromatograms were monitored at a wavelength of 280 nm. The structural confirmation of mangiferin and other secondary metabolites performed by UPLC-QTOF-MSE using the molecular formulas and m/z values obtained from high-resolution spectra, observed in the chromatograms with higher intensity peaks, by means of Mass Lynx software (Waters Corporation).

**Keywords:** *Mangifera indica L.* Phenolic compounds. Mangiferin. Chromatography.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Representação fotográfica da planta <i>Mangifera indica L.</i> .....	18
Figura 2	- Representação fotográfica de mangas da variedade Tommy Atkins.....	19
Figura 3	- Representação estrutural de flavonoides mais comumente encontrados A: catequinas e B: antocianinas.....	21
Figura 4	- Representação estrutural da mangiferina .....	23
Figura 5	- Representação esquemática de sistema de extração por Soxhlet .....	25
Figura 6	- Representação fotográfica de sistema de HPLC-UV/VIS preparativo .....	29
Figura 7	- Perfil cromatográfico do extrato de casca de manga ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) obtido por HPLC-DAD analítico em coluna cromatográfica de fase-reversa Shimadzu Shim-pack CLC – ODS (M) C18 (250 mm x 4.6 mm), monitorado a 280 nm e análise cromatográfica realizada em 60 minutos.....	31
Figura 8	- Perfil cromatográfico do extrato de casca de manga ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) obtido em escala preparativa em coluna cromatográfica de fase reversa Waters SunFire Prep C18 OBD (100 mm x 19 mm), monitorado a 280nm e análise cromatográfica realizada em 45 minutos.....	32
Figura 9	- Perfil cromatográfico em modo de ionização negativo do extrato de casca de manga obtido por UPLC-QToF-MSE contendo ácido quínico (1), mangiferina (2), ácido elágico (3), galato de metila (4) e ácidos anacárdicos trieno (5), dieno (6), monoeno (7) e o livre de insaturações (8) e cromatográfica realizada em 20 minutos.....	33
Figura 10	- Perfil cromatográfico das frações 1, 2 e 3 do extrato de casca de manga (ECM) obtido em sistema Waters Acquity UPLC acoplado a um analisador de massas de alta resolução Time-of-Flight (TOF) Waters equipado com uma interface electrospray (ESI) e cromatográfica realizada em 20 minutos.....	36
Figura 11	- Perfil cromatográfico das frações 4, 5 e 6 do extrato de casca de manga (ECM) obtido em sistema Waters Acquity UPLC acoplado a	

um analisador de massas de alta resolução Time-of-Flight (TOF) Waters equipado com uma interface electrospray (ESI) e cromatográfica realizada em 20 minutos.....	37
Figura 12 - Perfil cromatográfico das frações 7, 8 e 9 do extrato de casca de manga (ECM) obtido em sistema Waters Acquity UPLC acoplado a um analisador de massas de alta resolução Time-of-Flight (TOF) Waters equipado com uma interface electrospray (ESI) e análise cromatográfica realizada em 20 minutos.....	38
Figura 13 - Perfil cromatográfico das frações 10 e 11 do extrato de casca de manga (ECM) obtido em sistema Waters Acquity UPLC acoplado a um analisador de massas de alta resolução Time-of-Flight (TOF) Waters equipado com uma interface electrospray (ESI) e análise cromatográfica realizada em 20 minutos.....	39

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Classes de compostos fenólicos encontrados na natureza.....	21
Tabela 2 – Técnicas de extração de compostos fenólicos.....	22
Tabela 3 – Técnicas de identificação de compostos fenólicos.....	23
Tabela 4 – Conteúdo total de mangiferina e de compostos fenólicos na casca de manga de 14 cultivares procedentes de áreas cultivadas em diferentes países.....	24
Tabela 5 – Identificação de compostos de extrato de casca manga ( <i>Mangifera indica L.</i> ) em perfil cromatográfico obtido por UPLC-QToF-MS <sup>E</sup> .....	34

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AcAn	Ácido anacárdico
CV	Variedade
DAD	Diode Array Detector
ECM	Extrato de casca de manga
ESI	Electrospray Ionization
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MCP	Multichannel Plate
MS <sup>E</sup>	Mass spectrometry
QToF	Quadropole Time of Flight
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV/VIS	Ultravioleta/visível

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	15
<b>2 OBJETIVO.....</b>	17
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	17
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	17
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	18
<b>3.1 Manga .....</b>	18
<b>3.2 Compostos fenólicos .....</b>	20
<b>3.3 Mangiferina .....</b>	23
<b>3.4 Extração por Soxhlet.....</b>	25
<b>3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) .....</b>	26
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	27
<b>4.1 Obtenção do Extrato de Casca da Manga .....</b>	27
<b>4.2 Desenvolvimento de Método Cromatográfico em HPLC-DAD Analítico .....</b>	27
<b>4.3 Desenvolvimento de Método Cromatográfico em HPLC-UV/VIS Preparativo.....</b>	28
<b>4.4 Confirmação Estrutural da Mangiferina via UPLC – QTOF - MS<sup>E</sup>.....</b>	29
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	31
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	40
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	41

## 1 INTRODUÇÃO

A manga é proveniente da planta de nome *Mangifera indica L.*, pertencente à família *Anarcadiaceae*, nativa do sudoeste da Ásia, mais precisamente da Índia (VETUCCI; BERALDO; CALDERAN, 2016). O Brasil é o sétimo colocado no ranking mundial de produção e exportação desse fruto, com destaque para a região Nordeste, principalmente a Bahia, segundo os dados do Anuário Brasileiro de Fruticultura (KIST, 2018). A variedade Tommy Atkins originária do sudoeste dos Estados Unidos é a mais produzida e comercializada, uma vez que pode ser colhida o ano inteiro (FONSECA, 2014).

A manga é muito apreciada *in natura*, sendo também comercializada como conteúdo de sucos, néctares, sorvetes, etc. Os resíduos provenientes da comercialização da manga geram grande impacto ambiental e comercial. As cascas são resíduos gerados e compõem de 12 a 15% o peso da fruta e sementes com as amêndoas em seu interior formam de 15 a 25% desse peso (MIRGHANI *et al.*, 2009).

Com o grande volume de resíduos gerados após o processamento industrial da manga tem-se buscado maneiras de utilizar esses resíduos e assim diminuir os prejuízos. Uma maneira seria a recuperação dos compostos bioativos presentes nos extratos desses resíduos, principalmente das cascas onde se concentra a maior quantidade desses compostos. Por possuir propriedades antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos e anti-inflamatório já é uma fonte natural reconhecida por promover saúde a aplicações tecnológicas (ARBOS *et al.*, 2015).

Além de carotenoides, a manga contém compostos fenólicos como a mangiferina (xantona), que se encontra em maior quantidade (CAVALCANTE, 2018). São esses compostos responsáveis pelas muitas propriedades existentes na manga. A conversão dos resíduos em matéria prima para obtenção de produtos com o uso da mangiferina, por exemplo, seria uma maneira de recuperar esses bioativos. Na busca por compostos que possam agir isoladamente ou sinergicamente com outros compostos, empreenderam-se estudos e técnicas com o objetivo de encontrar antioxidantes naturais e diminuir o uso de antioxidantes sintéticos (AZEVEDO, 2006).

As técnicas para obtenção de extratos vegetais com o objetivo de se extrair compostos bioativos podem ser a extração por Soxhlet, a de micro-ondas assistidas, a extração por refluxo térmico, a extração cromatográfica e a extração assistida por ultrassom (IMRAN *et al.*, 2016). Neste trabalho a técnica utilizada foi a extração por Soxhlet por ser uma técnica convencional e de alto rendimento, por causa da renovação contínua do solvente e pela matriz

estar dentro do Soxhlet. Com a obtenção do extrato é realizada a cromatografia, a qual permite a obtenção de cromatogramas constituídos de picos referentes aos compostos presentes na amostra. A área e a altura sobre o pico são proporcionais a concentração de cada composto. Esta técnica consiste de uma fase móvel que arrasta os constituintes da amostra injetada, percolando a fase estacionária. Ao final, o detector converte o sinal de cada componente em um pico que juntos formam o cromatograma. Esta pode ser analítica ou preparativa, na qual a analítica é utilizada para quantificação e/ou identificação e a segunda objetiva a purificação e/ou fracionamento de compostos.

Um fator a ser levado em consideração é o solvente utilizado na extração da casca da manga. Apesar de a água ser um ótimo solvente inorgânico, essa não é capaz de extrair compostos de alto peso molecular, já que estes são insolúveis na mesma, o que torna necessário a utilização de outros solventes, como os alcoólicos, que são bastante utilizados em virtude de suas diferentes polaridades (CAPELLINI, 2013).

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Fracionamento do extrato de casca de manga variedade Tommy Atkins para obtenção de mangiferina por HPLC-UV/VIS preparativo.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Identificar os metabólitos secundários;
- Desenvolver método exploratório para separação da mangiferina

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Manga

A manga é um fruto do tipo drupa, variando de 5 a 20 centímetros, de formas alongada, ovoide ou arredondada. Quando madura sua casca pode apresentar-se esverdeada, com manchas pretas, róseas ou amarelas. Apresenta polpa suculenta de coloração amarelada na maioria das variedades, e fibrosa em algumas. O caroço em seu interior é achatado e de variados tamanhos (SEBRAE, 2016). É um fruto oriundo da planta de nome *Mangifera indica Linnaeus*, pertencente à família *Anarcadiaceae*. De porte arbóreo e copa frondosa (Figura 1) esta planta é nativa do sudoeste da Ásia, mais precisamente da Índia (VETUCCI; BERALDO; CALDERAN, 2016).

**Figura 1.** Representação fotográfica da planta *Mangifera indica L.*



**Fonte:** Árvore frutífera manga.

Sendo um dos frutos mais produzidos mundialmente, a manga possui produção estimada em 27 milhões de toneladas por ano. A manga é a segunda mais importante fruta tropical do mundo e ainda é a quinta maior em produção, ficando atrás apenas da banana, uva, maçã e laranja (BATISTA, 2013).

No Brasil, a manga possui posição de destaque dentre as 25 espécies de frutas produzidas e exportadas, colocando o país como 7º colocado em produção e exportação no

mundo. Em 2017, foram 84.106 hectares de área colhida, com 1.547,606 toneladas em produção, chegando a 18,4 toneladas por hectare (FAO, 2017). A maior produção de manga é no Nordeste, sendo a Bahia o maior produtor, com 21.370 hectares de área colhida da fruta e volume de 353.689 toneladas e em segundo lugar está Pernambuco, com 230.381 toneladas, segundo os dados do Anuário Brasileiro de Fruticultura (KIST, 2018).

A variedade Tommy Atkins de origem norte americana, Flórida, possui casca espessa e avermelhada (Figura 2) é a que dentre muitas outras tem maior destaque na produção e comercialização, com disponibilidade o ano inteiro, torna-se a manga de maior exportação no mundo (FONSECA, 2014). É uma variedade que possui resistência ao transporte e de fácil aceitação pelo consumidor (AGRA, 2006).

**Figura 2.** Representação fotográfica de mangas da variedade Tommy Atkins.



**Fonte:** Manga Tommy Atkins.

A manga é mais consumida *in natura*, ou seja, não processada, porém sua polpa é utilizada na indústria para produção de sucos, néctares, geleias, sorvetes, etc. (CAVALCANTE, 2018). Deste modo, os resíduos provenientes da utilização da polpa são produzidos em altas quantidades e isso gera prejuízos para empresas e meio ambiente (PEDRASSOLLI; JUNIOR; PANDOLFI, 2015). O processamento industrial de polpa de manga no Brasil gera altas quantidades de subprodutos como cascas e amêndoas. Os resíduos produzidos somam de 28 a 43% do total do fruto após beneficiamento (GIORDANI JUNIOR *et al*, 2014).

O aproveitamento desses resíduos vem trazendo um novo olhar para estes subprodutos, pois trazem vantagens econômicas e ambientais o que chama a atenção das indústrias e comunidade científica (TREIN *et al.*, 2016). De modo que, este aproveitamento é feito de maneira a recuperar compostos bioativos que podem ser importantes para as indústrias farmacêutica, alimentar e cosmética na obtenção de novos produtos.

### **3.2 Compostos fenólicos**

A presença de compostos fenólicos e outros componentes bioativos possuem a capacidade de influenciar positivamente na saúde. Estes poder ser utilizados como aditivos alimentares e nutracêuticos, nutrientes que proporcionam benefícios à saúde (CAVALCANTE, 2018). A casca da manga contém teores significativos de nutrientes como fibras, proteínas e minerais, estes estão mais presentes na casca do que na polpa (MARQUES *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos como as xantonas e os flavonoides, por exemplo, são encontrados em vegetais e frutas, além dos carotenoides e terpenos, e são identificados em folhas, frutos, caule e raízes. Conhecidos por apresentarem propriedades benéficas à saúde, como antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, etc. (CAVALCANTE, 2018). São um dos maiores grupos encontrados em plantas, fazendo parte do metabolismo secundário dessas, com fundamental importância no crescimento e reprodução. Possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (SARTORI, 2012).

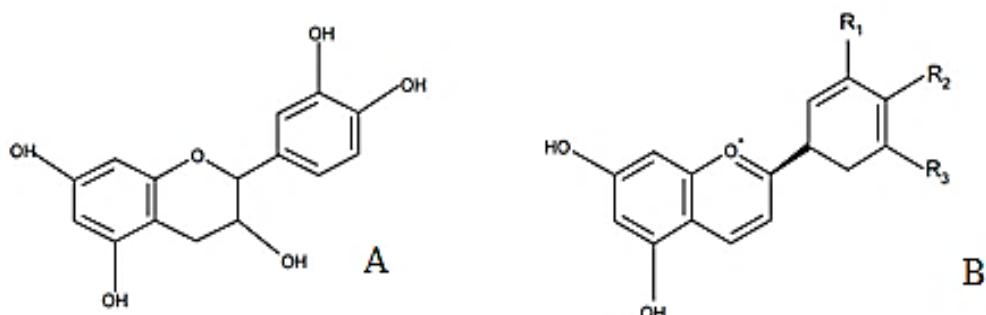
A diversidade de combinações é dividida em classes (Tabela 1) de acordo com o esqueleto principal que forma o anel benzênico e a cadeia substituinte compõem os compostos fenólicos encontrados na natureza como ácidos e ésteres (ácido gálico), flavonóis (catequina) (Figura 3a), antocianinas (Figura 3b), flavonóis (queracetina), heterosídeos flavonóis (*3-O-galactosil-rhamnetina*), heterosídeo xantônico (mangiferina), etc. (CANUTO, 2009).

**Tabela 1.** Classes de compostos fenólicos encontrados na natureza.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinona	C6
Ácidos hidroxibenzóicos	C6 – C1
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C6 – C2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C6 – C3
Nafitoquinonas	C6 – C4
Xantonas	C6 – C1 – C6
Estilbenos, antoquinonas	C6 – C1 – C6
Flavonóides, isoflavanóides	C6 – C3 – C6
Lignanas, neolignanas	(C6 – C3) n
Bioflavonóides	(C6 – C3) 2
Ligninas	(C6 – C3) n
Taninos condensados	(C6 – C3 – C6) n
Taninos hidrolisáveis	(C6 – C1) n

**Fonte:** Cavalcante, 2018.

**Figura 3.** Representação estrutural de flavonoides mais comumente encontrados. A: catequinas e B: antocianinas.



**Fonte:** Silva *et al.* 2010.

A ação desses compostos fenólicos como agentes redutores ocorre devido a sua estrutura química, que permite a doação de elétrons ou prótons aos radicais livres, cessando a oxidação, convertendo-os em produtos mais estáveis (ARAÚJO, 2014).

O sistema de defesa da planta é responsável pela produção desses metabólitos que agem contra a radiação ultravioleta e a ação ou agressão de patógenos. Para o ser humano que não produz esses metabólitos é necessário que faça ingestão de fontes desses compostos (CAVALCANTE, 2018).

A Tabela 2 reúne alguns dos trabalhos dedicados ao estudo da presença de compostos fenólicos em produtos vegetais, com foco na metodologia utilizada para a extração dos compostos anterior à sua identificação e quantificação.

**Tabela 2.** Técnicas de extração de compostos fenólicos.

Solução extratora	Tempo de extração	Temperatura de extração	Outras informações	Referência
Etanol	-	-	Soxleht seguido por purificação em coluna cromatográfica de sílica e carvão ativado (1:0,5)	FURLONG <i>et al.</i> , 2003
Etanol	06 h	-	Soxleht, Purificação por partição com éter de petróleo e acetona seguida por precipitação com acetato de chumbo.	FURLONG <i>et al.</i> , 2003
Metanol	-	Ambiente	Agitação magnética, partição com hexano e clarificação com hidróxido de bário e sulfato de zinco	FURLONG <i>et al.</i> , 2003
Éter etílico	1 h	Ambiente	Agitação magnética e filtração a vácuo	BROINIZI <i>et al.</i> , 2007
Metanol	8 h	-	Soxleht, seguido por filtração	MAHMOUDI <i>et al.</i> , 2016
Água bidestilada	-	Ambiente	Centrifugação a 1000 rpm	JASSAL E SHARMA, 2019
Metanol	24 h	Ambiente	Imerso em frasco com solvente, seguido de incubadora por 6 h e imóvel por 18 h	JASSAL E SHARMA, 2019
Acetona	24 h	Ambiente	Imerso em frasco com solvente, seguido de incubadora por 6 h e imóvel por 18 h	JASSAL E SHARMA, 2019

**Fonte:** Autora.

Técnicas de identificação, tipos de detectores, tipos de colunas, eluentes/gás de arraste empregados com o objetivo de se identificar compostos fenólicos em alguns estudos feitos encontrados na literatura são mostrados na Tabela 3.

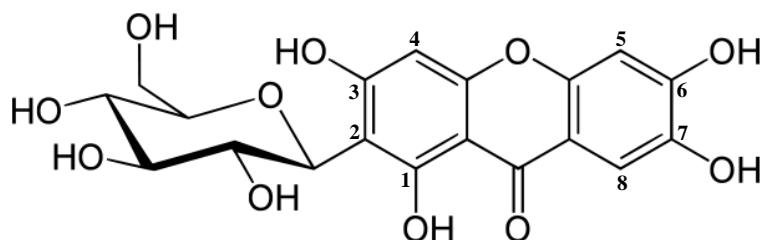
**Tabela 3.** Técnicas de identificação de compostos fenólicos.

Técnica	Detector	Coluna	Eluente/Gás de arraste	Referência
Cromatografia Gasosa	Ionização por chama	Sílica fundida DBS (30 m x 0,25 mm)	Hélio	BROINIZI <i>et al.</i> , 2007
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	UV/VIS com varredura L-7455 espectral de 200 a 500nm	Bondclone® C <sub>18</sub> (3,9 x 300 mm)	Metanol e Água (35:65 v/v) com 0,5% de ácido acético	DUTRA e HOFFMANN-RIBANI, 2010
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	Arranjo diodo	Shimpack CLC-ODS C <sub>18</sub> (150 x 4,6 mm)	Solvante A (ácido fórmico) e Solvante B (metanol) com ácido fórmico (99:1 v/v)	ARAÚJO, 2014
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	UV/VIS com comprimento de onda de 290 nm	Thermo Scientific C-18 (250 x 4,6 mm)	Solvante A (ácido acético 3%) e Solvante B (Acetonitrila)	RUIZ-MONTAÑEZ, 2014

**Fonte:** Autora.

### 3.3 Mangiferina

A mangiferina é uma xantona que tem fundamental importância na inferência do crescimento e inibição de má-formação da planta. A sua estrutura molecular 2-C-β-D-glicopiranósil-1,3,6,7-tetrahidroxixantona é mostrada na Figura 4. Estudos no ramo da farmacologia e cosméticos visam sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, hipoglicemiante e imunomodulatória (CANUTO, 2009).

**Figura 4.** Representação estrutural da mangiferina.

**Fonte:** Brito *et al.*, 2012.

Em estudos de compostos fenólicos em casca de manga Tommy Atkins, Araújo *et al.*, (2014) relataram que a quantidade extraída foi de 2,88 mg de mangiferina por grama de matéria seca. A espécie *Mangifera pajang* K. apresentou um teor de mangiferina superior (cerca de 4,8mg/g de peso seco) ao encontrado na espécie *Mangifera indica* L. evidenciando que as espécies de *Mangifera* possuem diferentes níveis de quantidade de mangiferina (HASSAN *et al.*, 2011).

Após estudos de Berardini *et al.*, (2005a) nos frutos de 14 cultivares procedentes de áreas cultivadas em diferentes países a mangiferina foi encontrada em altos teores nas cascas de manga das variedades Tommy Atkins e Chock Anan, cerca de 1.300 mg/kg, como mostra a Tabela 4. Na polpa, foram detectados apenas traços dessa substância.

**Tabela 4.** Conteúdo total de mangiferina e de compostos fenólicos na casca de manga de 14 cultivares procedentes de áreas cultivadas em diferentes países.

Cultivar/País de origem	Mangiferina (mg/kg matéria seca)	Compostos fenólicos totais (mg/kg matéria seca)
Tommy Atkins (Brasil)	4444,0	1263,2
Manilla (Tailândia)	1058,1	43,5
Ngowe (Quênia)	2953,8	775,8
R2E2 (Austrália)	399,4	82,9
Kent (Brasil)	2342,0	,13,9
José (La Réunion- departamento ultramarino francês)	4860,2	983,6
Mini-mango (Colômbia)	2442,5	449,9
Haden (Peru)	2936,4	11,2
Heidi (Peru)	2897,8	108,9
Kaew (Tailândia)	588,5	313,9
Mon Due Gao (Tailândia)	354,4	68,0
Maha Chanok (Tailândia)	2120,2	973,9
Nam Dokmai (Tailândia)	458,6	78,1
Chock Anan (Tailândia)	1728,7	1297,1

**Fonte:** Adaptado de Berardini *et al.*, 2005a.

Estudos in vivo com extrato de manga para atividade da mangiferina concluíram que o composto possui promissora atividade biológica como antioxidante, quimio-preventiva, entre outras. A mangiferina é um eficiente quelante de radical livre assim como outros antioxidantes conhecidos quando em contato com os radicais peroxi e hidroxi. De modo que sua eficácia é comprovada por ela agir oxidando os radicais, convertendo-se em espécies menos reativas (AZEVEDO, 2006).

A mangiferina exibe papel imunoprotetor como efeito sobre o sistema imune (MURUNGANANDAN *et al.*, 2005a). Potencialmente controla a diabetes, concluindo a presença de propriedades antidiabéticas, antihiperlipidêmica e antiaterogênica, indicando efeito benéfico em tratamento de diabetes mellitus em ratos (MURUNGANANDAN *et al.*, 2005b).

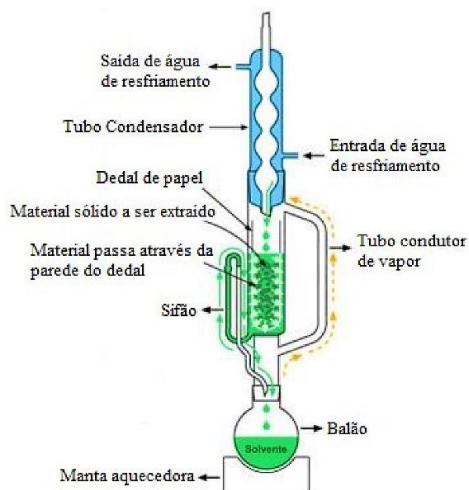
A mangiferina pode ser encontrada em formulações de fitoterápicos, cosméticos ou suplemento alimentar. O princípio da medicina tradicional chinesa é o uso de preparados vegetais para tratamentos, visando aumento da ação terapêutica. O Zi-shen-pill é um desses preparados que utiliza a mangiferina como um dos principais componentes, sendo ele utilizado para tratamento de doenças da próstata e infecções urinárias, com resultados satisfatórios após um período de tratamento (DAI *et al.*, 2004). Outros preparados que contém a mangiferina são Shiau-feng-saan e Dang-guei-nian-tong-tang (JONG *et al.*, 2005).

### 3.4 Extração por Soxhlet

Bastante utilizada em escala laboratorial a extração por Soxhlet é feita com matrizes sólidas, como é o caso dos extratos vegetais. Apesar de ser antiga, ainda é um método de referência quando comparada com novos métodos de extração (SANTOS, 2013). Além dessa, ainda existem as técnicas de micro-ondas assistidas, extração por refluxo térmico, extração cromatográfica e extração assistida por ultrassom (IMRAN *et al.*, 2016).

A extração por Soxhlet consiste num sistema formado por um balão de destilação, num suporte de dedal acoplado a um condensador (Figura 5). O pó da matriz é colocado em um envelope feito de papel de filtro e colocado dentro do suporte do dedal que entra em contato com o solvente fresco condensado do balão de destilação. A extração ocorre na câmara do dedal. Quando o líquido atinge o nível de transbordamento no dedal, o líquido se move através do sifão de volta para o reservatório, transportando os solutos extraídos para o líquido no balão de destilação (SHIRSATH, 2017).

**Figura 5.** Representação esquemática de sistema de extração por Soxhlet.



**Fonte:** Costa *et al.*, 2017.

A extração ocorre de forma contínua de maneira tal que a matriz é imersa no solvente, recebendo calor até que o solvente alcance a ebulição a uma pressão reduzida ou a pressão atmosférica. O material orgânico é extraído de acordo com a afinidade e polaridade do solvente utilizado. Posteriormente esse solvente é evaporado e tem-se novamente uma matriz sólida. A extração é de alto rendimento, por causa da renovação contínua do solvente e pela matriz estar dentro do Soxhlet. Ao final é necessária uma etapa de eliminação do solvente. Pode acontecer de características físico-químicas serem modificadas devido a alta temperatura a qual a matriz é submetida (SANTOS, 2013).

### **3.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – High Performance Liquid Chromatography)**

Considerada um método físico-químico de separação, a cromatografia é composta por uma fase móvel e outra estacionária, de maneira tal que a amostra para análise é injetada na entrada da coluna e a fase móvel é bombeada de acordo com especificações do operador como, por exemplo, a taxa de vazão do solvente utilizado e o tempo de corrida. Então dessa maneira a fase móvel passa pela coluna, percorrendo a fase estacionária arrastando a amostra através de interações físico-químicas. Ao final da coluna tem-se um detector que gera sinais interpretados na forma de um cromatograma. Nesse cromatograma a área e a altura dos picos formados são proporcionais a concentração do analito em questão (JIN *et al.*, 2008; NOGUEIRA *et al.*, 2011).

Dependendo da finalidade desejada, a cromatografia líquida pode ser analítica ou preparativa. De modo que a primeira é utilizada para quantificação e/ou identificação e a segunda para purificação e/ou fracionamento de compostos. A escala analítica é utilizada para testes preliminares quando deseja-se saber quais parâmetros melhor se adequam para a análise e com isso ser utilizada em maiores escalas de isolamento. Nesse caso se utiliza uma quantidade maior de amostra (LANÇAS, 2009). Na cromatografia preparativa as amostras que contém vários e diferentes compostos são separadas de forma a se conseguir a mais alta pureza, tendo assim uma melhor capacidade na taxa de recuperação dos compostos quando comparada a cromatografia analítica (OIRAM FILHO, 2017).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do Extrato de Casca da Manga

O extrato de casca de manga utilizado para a obtenção de mangiferina foi obtido através do método de extração por Soxhlet, descrito por Cavalcante (2018) e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Edy Sousa de Brito pesquisador do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais situado na Embrapa Agroindústria Tropical. O extrato metanólico foi colocado em evaporador rotativo da marca BUCHI® modelo R215, a 40°C sob pressão reduzida e rotação de 100 rpm até a remoção do solvente orgânico. Em seguida o extrato foi armazenado no ultra freezer de marca ColdLab® modelo CL200-86V a -80°C para observar se ocorria congelamento da amostra. Na amostra congelada, então continha somente água e este foi posteriormente liofilizado em liofilizador de marca LIOTOP® modelo K105 nas condições de temperatura igual a -104 °C e pressão igual a 214 µmHg, por 48 horas, para remoção da água.

### 4.2 Desenvolvimento de Método Cromatográfico em HPLC-DAD Analítico

O cromatógrafo Shimadzu LC-20AB Prominence é acoplado a um detector de arranjo de diodo Shimadzu SPD-M20A Prominence e com um autosampler Shimadzu SIL-20AC Prominence (Quioto, Japão). O controle instrumental da análise e o processamento dos dados foram tratados com o uso do software Shimadzu LC Solution.

O método foi conduzido de maneira exploratória em uma análise de 60 minutos, onde o sistema cromatográfico foi composto por uma coluna cromatográfica de fase-reversa Shimadzu Shim-pack CLC – ODS (M) C<sub>18</sub> (250 mm x 4.6 mm x 5 µm). A fase móvel utilizada foi composta de metanol (solvente B) e água (solvente A), ambos acidificados com ácido trifluoracético 0,05% (v/v), em um gradiente de eluição, de 5 % a 95 % de solvente B de 0 a 48 minutos, 100 % de solvente B durante o intervalo de tempo entre 48 minutos a 54 minutos e 5% de solvente B no intervalo de 54 minutos até 60 minutos. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, à temperatura de 30°C e com volume de injeção da amostra de 20 µL. Os cromatogramas foram monitorados a um comprimento de onda de 280 nm.

#### 4.3 Desenvolvimento de Método Cromatográfico em HPLC-UV/VIS Preparativo

O método cromatográfico foi conduzido usando uma coluna cromatográfica de fase reversa Waters SunFire Prep C<sub>18</sub> OBD (100 mm x 19 mm x 5 µm). A fase móvel utilizada foi composta de metanol (solvente B) e água (solvente A), ambos acidificados com ácido trifluoracético 0,05% (v/v), em um gradiente de eluição, de 5% a 70% de solvente B de 0 a 35 minutos, de 70% a 100% de solvente B de 35 minutos a 37 minutos, 100% de solvente B em um intervalo de tempo de 37 minutos a 43 minutos e 5% de solvente B no intervalo de 43 minutos a 45 minutos. O tempo total de análise cromatográfica foi de 45 minutos, fluxo de eluição de 8 mL min<sup>-1</sup>, à temperatura de 25°C, volume de injeção de 1 mL e concentração de 200 mg mL<sup>-1</sup>. Os cromatogramas foram monitorados a um comprimento de onda de 280 nm. O fracionamento da separação cromatográfica foi conduzido em coletor automático da marca Waters Fraction Collector III (Dublin, Leinster, Irlanda). Foram executadas coletas das 11 frações de toda corrida cromatográfica, onde as frações F1 corresponde ao tempo entre 2 e 5 minutos, F2 entre 5 e 8 minutos, F3 entre 8 e 11 minutos, F4 entre 11 e 14 minutos, F5 entre 14 e 17 minutos, F6 entre 17 e 20 minutos, F7 entre 20 e 23 minutos, F8 entre 23 e 26 minutos, F9 entre 26 e 29 minutos, F10 entre 29 e 32 minutos e F11 como fração final, entre 32 até 45 minutos. Na Figura 6 é possível observar a representação do sistema de HPLC-UV/VIS preparativo.

O volume de injeção foi calculado de acordo com as equações (GUILLARME, N. *et al.*, 2007; AUBIN e CLEARY, 2009) abaixo e otimizado em função do equipamento, onde o volume de injeção foi descrito de acordo com as equações 1.

$$V_{inj2} = V_{inj1} \cdot \frac{dc_2^2}{dc_1^2} \cdot \frac{L_2}{L_1} \quad (1)$$

Onde,  $V_{inj2}$  é a carga de injeção da escala preparativa,  $V_{inj1}$  é a carga de injeção da escala analítica,  $dc_2$  o diâmetro interno da coluna preparativa,  $dc_1$  o diâmetro interno da coluna analítica,  $L_2$  o comprimento da coluna preparativa e  $L_1$  o comprimento da coluna analítica. A vazão de eluição foi calculada de acordo com a Equação 2 descrita abaixo e ajustado em função de fatores de viabilidade de execução e econômicos, expresso na equação.

$$Q_2 = Q_1 \cdot \frac{dc_2^2}{dc_1^2} \cdot \frac{dp_1}{dp_2} \quad (2)$$

Onde,  $Q_2$  é a vazão de eluição do sistema preparativo,  $Q_1$  é a vazão de eluição do sistema analítico,  $dc_2$  o diâmetro interno da coluna preparativa,  $dc_1$  o diâmetro interno da coluna analítica,  $dp_1$  o diâmetro da partícula no analítico e  $dp_2$  o diâmetro da partícula no

preparativo. Para o fracionamento dos compostos presentes na casca da manga foram executadas 3 corridas ( $n=3$ ) e cada fração foi analisada por cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas.

**Figura 6.** Representação fotográfica do sistema de HPLC-UV/VIS preparativo.



**Fonte:** Mendes, 2019.

#### 4.4 Confirmação Estrutural da Mangiferina via UPLC – QTOF - MS<sup>E</sup>

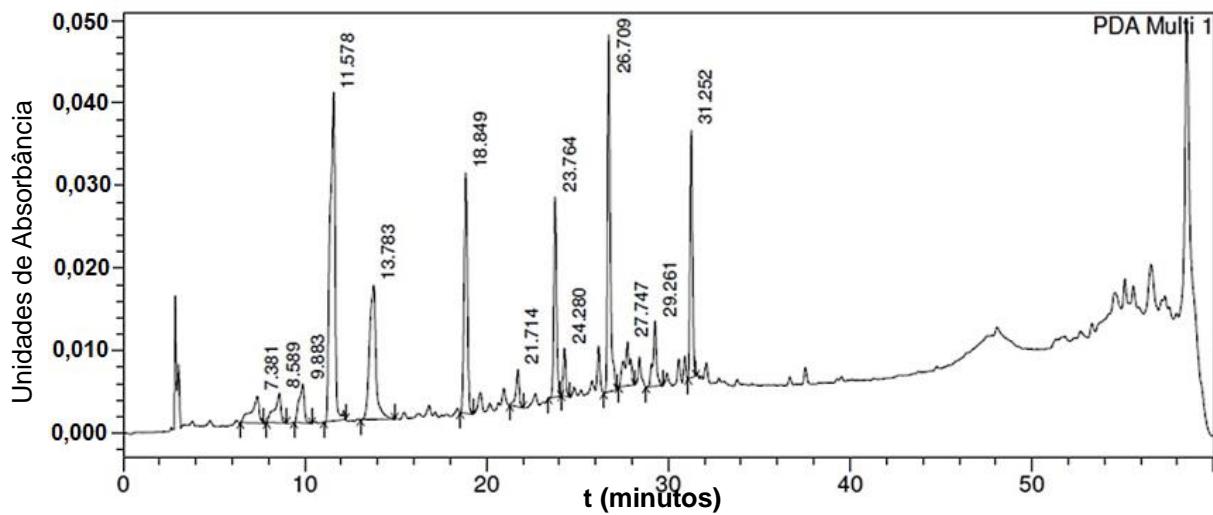
Para que a identificação relativa dos compostos presente em cada fração fosse realizada com exatidão no sistema HPLC-DAD, foi realizada análise em um sistema Waters Acquity UPLC acoplado a um analisador de massas de alta resolução Time-of-Flight (TOF) Waters equipado com uma interface electrospray (ESI) para realizar a identificação inequívoca dos compostos presente nas frações. As separações foram realizadas em coluna C<sub>18</sub> Waters Acquity UPLC (150 mm x 2,1 mm x 1,7  $\mu\text{m}$ ). O perfil dos metabólitos contidos nas frações foi obtido inicialmente por um gradiente exploratório, sendo a fase móvel composta por: H<sub>2</sub>O (solvente A) e acetonitrila (B), cada uma destas contendo ácido fórmico 0,1% (v/v). As amostras foram submetidas ao seguinte gradiente: 2 – 95 % do solvente (B) em 20 minutos a uma vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup>. A análise das frações foi conduzida

em modo de ionização negativo no intervalo de 100 – 1200 Da. As condições da fonte ESI foram definidas da seguinte forma: tensão capilar 2800 V, tensão do cone 40 V, temperatura da fonte 120 °C, temperatura de solvatação 330 °C, fluxo de gás do cone de 20 L h<sup>-1</sup>, o fluxo do gás de dessolvatação 600 L h<sup>-1</sup>, e MCP (do inglês multichannel plate), fazendo referência a um prato com multicanais – detector a 1900 V. A identificação estrutural dos metabólitos presentes nas frações foram feitas mediante as fórmulas moleculares e os valores de *m/z* obtidos a partir de espectros de alta resolução, observados nos picos cromatográficos de maior intensidade, por meio do software MassLynx (Water Corporation).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato metanólico de casca de manga foi injetado em HPLC-DAD analítico para observação do perfil cromatográfico (Figura 7), determinando quais parâmetros melhor se adequam a análise no HPLC-UV/VIS preparativo e as condições para um controle de qualidade. Nessa análise a coluna cromatográfica contém uma fase estacionária de caráter apolar. Assim, no cromatograma é observado que a ordem de eluição ocorre de modo que os compostos saem em sequência decrescente de polaridade, de maneira tal que os compostos que saem ao final da corrida são compostos mais apolares, permanecendo mais tempo retidos na coluna, portanto apresentam maior tempo de retenção ( $t_R$ ), saindo somente quando a força de eluição é aumentada em uma proporção de solvente de 100% de metanol. Assim, determinou-se a coleta de 11 frações com intervalo de 3 minutos entre as coletas no HPLC-UV/VIS preparativo com tempo total de análise cromatográfica de 45 minutos. Na escala analítica a coluna cromatográfica utilizada é maior do que na escala preparativa, por isso o tempo de análise cromatográfica no analítico foi de 60 minutos, enquanto que o tempo de análise cromatográfica no preparativo foi de 45 minutos.

**Figura 7.** Perfil cromatográfico do extrato de casca de manga ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) obtido por HPLC-DAD analítico em coluna cromatográfica de fase-reversa Shimadzu Shim-pack CLC – ODS (M) C<sub>18</sub> (250 mm x 4.6 mm), monitorado a 280 nm e análise cromatográfica realizada em 60 minutos.

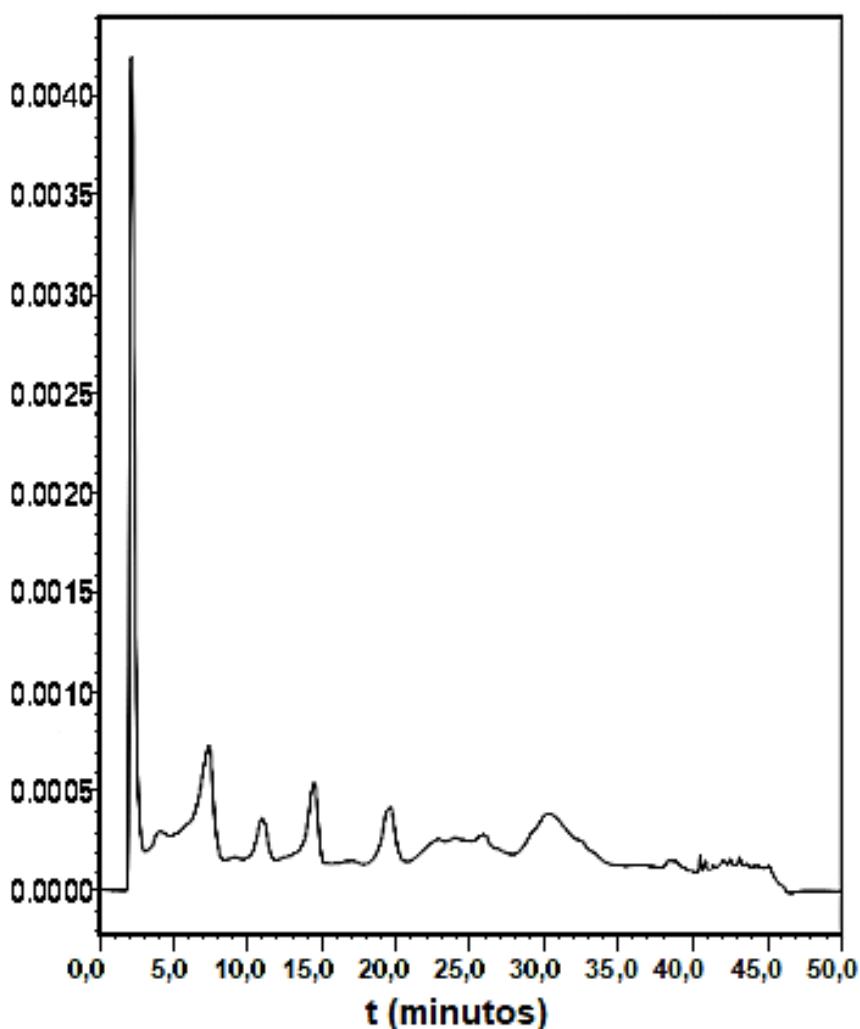


**Fonte:** Dados da pesquisa.

Na Figura 8 tem-se o perfil cromatográfico por HPLC-UV/VIS preparativo do extrato de casca de manga após o ajuste de escala, onde é possível observar que ocorre semelhança

com o perfil cromatográfico do HPLC-DAD analítico da Figura 7, anteriormente, contudo existe um pico de alta intensidade com tempo de retenção de 2 minutos, que é o pico da inflexão do solvente, e a eluição segue com a saída dos compostos nos quais os picos apresentam baixa intensidade devido a baixa concentração de amostra injetada no preparativo. Então, seria necessário aumentar a carga de injeção da amostra para os picos aparecerem com maior intensidade. Pois mesmo que os dois sistemas apresentem teoricamente o mesmo detector, a proporção de volume de injeção da amostra e tamanho da coluna na escala analítica é maior do que a do que na escala preparativa, por isso tem-se uma melhor visualização dos picos no analítico. Logo, o melhor seria injetar as frações no analítico e fazer uma comparação do perfil do extrato com o perfil obtido das frações. Avaliando o perfil cromatográfico

**Figura 8.** Perfil cromatográfico do extrato de casca de manga ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) obtido em escala preparativa em coluna cromatográfica de fase reversa Waters SunFire Prep C<sub>18</sub> OBD (100 mm x 19 mm), monitorado a 280nm e análise cromatográfica realizada em 45 minutos.

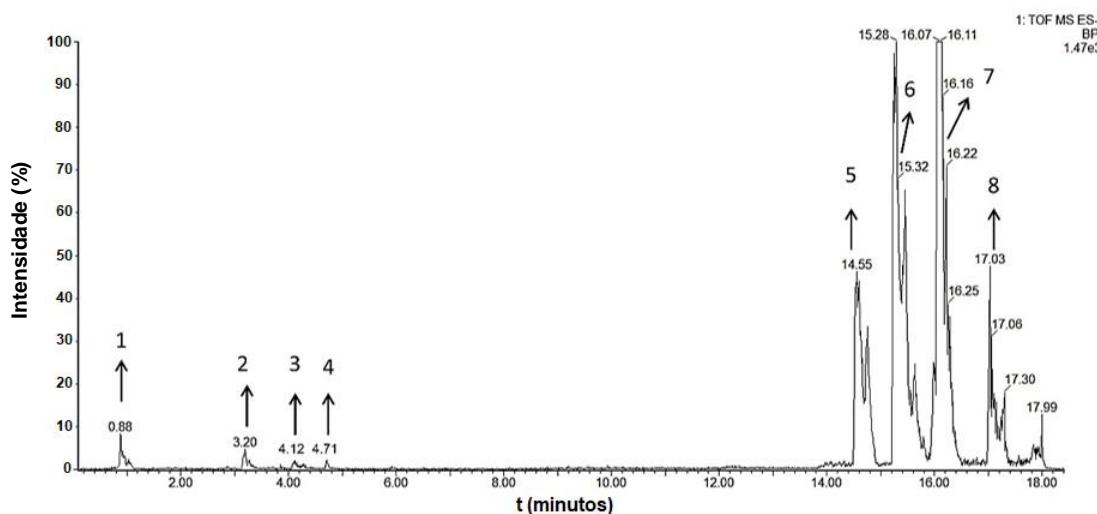


**Fonte:** Dados da pesquisa.

A identificação por UPLC-QToF-MS<sup>E</sup> dos compostos foi realizada através das massas moleculares e seus respectivos fragmentos em MS<sup>E</sup>. Pelo perfil cromatográfico (Figura 9) do extrato de casca de manga foram confirmados a presença de ácido quínico ( $t_R = 0.89$  min); mangiferina ( $t_R = 3.20$  min); ácidos anacárdicos trieno ( $t_R = 14.55$  min), dieno ( $t_R = 15.28$  min), monoeno ( $t_R = 16.07$  min) e ácido anacárdico livre de saturações ( $t_R = 17,03$ min). A Tabela 5 mostra a identificação dos compostos no extrato de acordo com suas massas e seus fragmentos de ionização. A mangiferina foi identificada a partir de sua massa  $[M-H]^-$  421.0795, e os íons fragmentos de  $m/z$  331.0521 e 301.0375 (DORTA *et al.*, 2014).

Os ácidos fenólicos são estruturas capazes de se ligar entre si ou com outros compostos, os quais uma combinação entre o ácido caféico com um álcool-ácido cíclico como o ácido quínico que é a mais importante dessas, origina o ácido clorogênico, sendo este utilizado na indústria cosmética para tratamento da pele por sua ação antioxidante (SOARES, 2002).

**Figura 9.** Perfil cromatográfico em modo de ionização negativo do extrato de casca de manga obtido em sistema Waters Acquity UPLC acoplado a um analisador de massas de alta resolução Time-of-Flight (TOF) Waters equipado com uma interface electrospray (ESI), contendo ácido quínico (1), mangiferina (2), ácido elágico (3), galato de metila (4) e ácidos anacárdicos trieno (5), dieno (6), monoeno (7) e o livre de insaturações (8) e análise cromatográfica realizada em 20 minutos.



**Fonte:** Dados da pesquisa.

Embora, o pico referente a mangiferina (Pico 2) não seja intenso, ou seja, sua concentração aparentemente seja baixa, o perfil cromatográfico no HPLC-DAD analítico prova que essa concentração não é baixa, o que ocorre é que os ácidos anacárdicos

apresentam alta intensidade e o pico referente a mangiferina é mostrado com menor intensidade.

**Tabela 5.** Identificação de compostos de extrato de casca manga (*Mangifera indica L.*) em perfil cromatográfico obtido por UPLC-QToF-MS<sup>E</sup>.

Pico no.	t <sub>R</sub> min	[M-H] <sup>-</sup> Observado	[M-H] <sup>-</sup> Calculado	Ions Fragmento (m/z )	Formula empírica	Ppm (Erro)	Nome	Referência
1	0.89	191,0546	191,0556	-	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	-5.2	Ácido Quínico	Gómez-Caravaca <i>et al.</i> , 2016
2	3.20	421,0795	421,0771	331,0521; 301,0375	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>11</sub>	5.7	Mangiferina	Dorta <i>et al.</i> , 2014
3	4.12	300,9978	300,9984	-	C <sub>14</sub> H <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	-2.0	Ácido Elágico	Gómez-Caravaca <i>et al.</i> , 2016; Dorta <i>et al.</i> , 2014
4	4.71	183,0270	183,0293	-	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>5</sub>	-11.5	Galato de metila	Dorta <i>et al.</i> , 2014
5	14.55	341,2115	341,2117	297,2227	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> O <sub>3</sub>	-0.6	Ácido Anacárdico (15:3)	Oiram Filho <i>et al.</i> , 2017
6	15.28	343,2244	343,2273	299,2357	C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> O <sub>3</sub>	-8.4	Ácido Anacárdico (15:2)	Oiram Filho <i>et al.</i> , 2017
7	16.07	345,2410	345,2430	301,2470	C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> O <sub>3</sub>	-5.8	Ácido Anacárdico (15:1)	Oiram Filho <i>et al.</i> , 2017
8	17.03	347,2590	347,2586	303,2692	C <sub>22</sub> H <sub>35</sub> O <sub>3</sub>	1.2	Ácido Anacárdico (15:0)	Oiram Filho <i>et al.</i> , 2017

**Fonte:** Dados da pesquisa.

O ácido quínico em estudo realizado por Gómez-Caravaca *et al.* (2016) apresentou-se com tempo de retenção, 1,01. Dorta *et al.* (2014) e Berardini *et al.* (2004) verificaram em estudos que a mangiferina apresentou tempo de retenção, 3,28. Para o ácido elágico Dorta *et al.* (2014) e Berardini *et al.* (2004) obtiveram tempo de retenção, 4,08. Dorta *et al.* (2014) verificaram em estudos que o galato de metila apresentou tempo de retenção, 3,17. Os ácidos anacárdicos apresentaram para o trieno t<sub>R</sub> = 9,81 min; dieno t<sub>R</sub> = 10,56 min e monoeno t<sub>R</sub> = 11,47 min em estudos realizados por Mendes (2019) e Oiram Filho *et al.* (2017) verificaram que os AcAn trieno apresentou t<sub>R</sub> = 9,81 min; dieno t<sub>R</sub> = 10,56 min e monoeno t<sub>R</sub> = 11,47,

Analisando os perfis cromatográficos das Figuras 10, 11, 12 e 13 nas frações 1, 2, 3, 4 e 5 não foi possível realizar identificações de compostos, pois a intensidade dos picos era

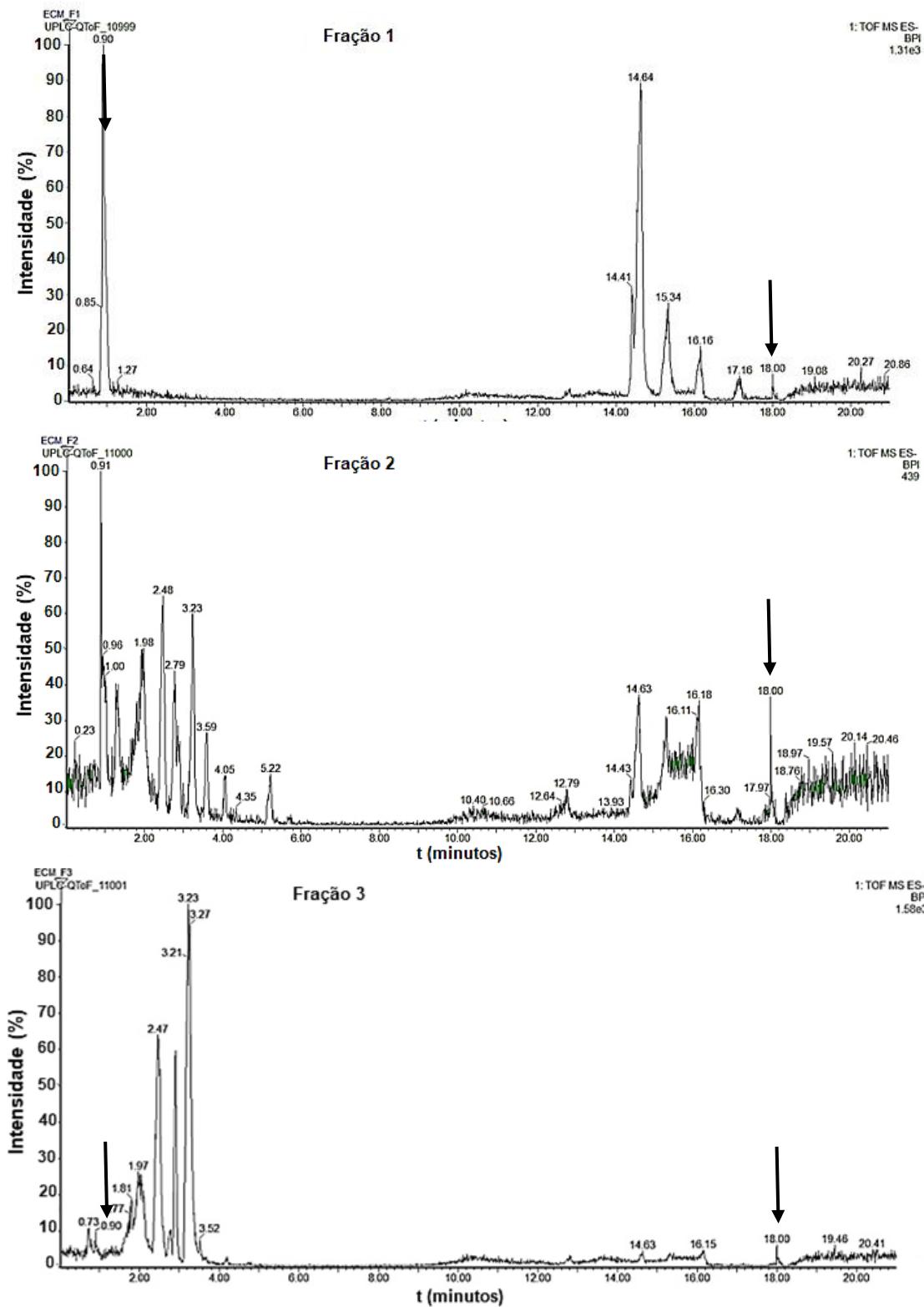
muito baixa ou porque o padrão de ionização observado não era similar a nenhum padrão de ionização na literatura. Nas outras frações foram identificados a mangiferina ( $t_R = 3.54$  min) na fração 6; galato de mangiferina ( $t_R = 3.81$  min) na fração 7; quercetina-*O*-hexosídeo ( $t_R = 4.35$  min) na fração 8; quercetina-*O*-pentosídeo ( $t_R = 4.52$  min) na fração 9; tetra-*O*-galoil-glicosídeo ( $t_R = 3.73$  min), penta-*O*-galoil-glicosídeo ( $t_R = 4.36$  min) e o rhamnetin-*O*-hexosídeo ( $t_R = 5.84$  min) na fração 10 e os ácidos anacárdicos trieno, dieno, monoeno e o livre de insaturações na fração 11.

Estudos com a casca de manga de três variedades, verificou-se a presença de compostos galatos e galotaninos, tais como ácido gálico, tetra-*O*-galoil-glicosídeo, penta-*O*-galoil-glicosídeo e digalato de metila. O tetra-*O*-galoil-glicosídeo no estudo mencionado apresentou-se em dois possíveis tempos de retenção, 3.90 e 3.98, (Dorta *et al.*, 2014). O penta-*O*-galoil-glicosídeo foi detectado por Dorta *et al.* (2014), Gómez-Caravaca *et al.* (2016) e Berardini *et al.* (2004) como tempo de retenção, 4,33.

Geralmente, os flavonoides como a quercetina são encontrados nas plantas, principalmente na forma de *O*-glicosídeos, e geralmente com o açúcar ligado ao grupo hidroxila na posição C3 ou C7. A estrutura química dos flavonoides e seus metabólitos predizem a atividade biológica desses compostos, pois sua estrutura básica pode ser modificada por glicosilação, esterificação, hidroxilação e outras alterações, mudando a polaridade, a toxicidade e o transporte intracelular (ARAUJO, 2014).

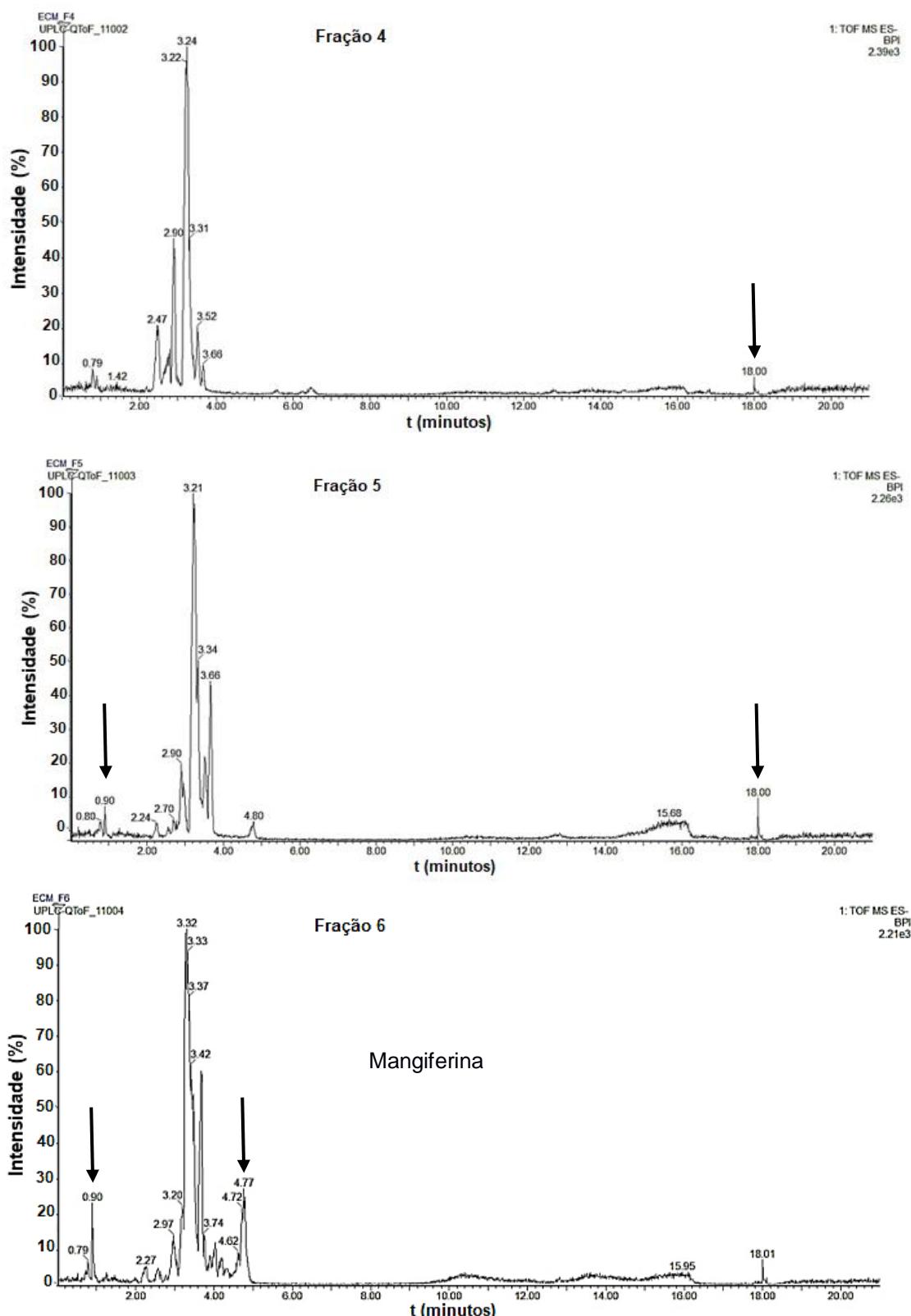
O tempo de retenção do composto pode diferir entre a análise do extrato e o tempo de retenção da fração que contém determinado composto, como é o caso da mangiferina que apresenta  $t_R = 3.20$  min quando se observa o cromatograma do extrato e  $t_R = 3.54$  min para o cromatograma da fração na qual foi identificada.

**Figura 10.** Perfil cromatográfico das frações 1, 2 e 3 do extrato de casca de manga (ECM) obtido em sistema Waters Acquity UPLC acoplado a um analisador de massas de alta resolução Time-of-Flight (TOF) Waters equipado com uma interface electrospray (ESI) e análise cromatográfica realizada em 20 minutos.



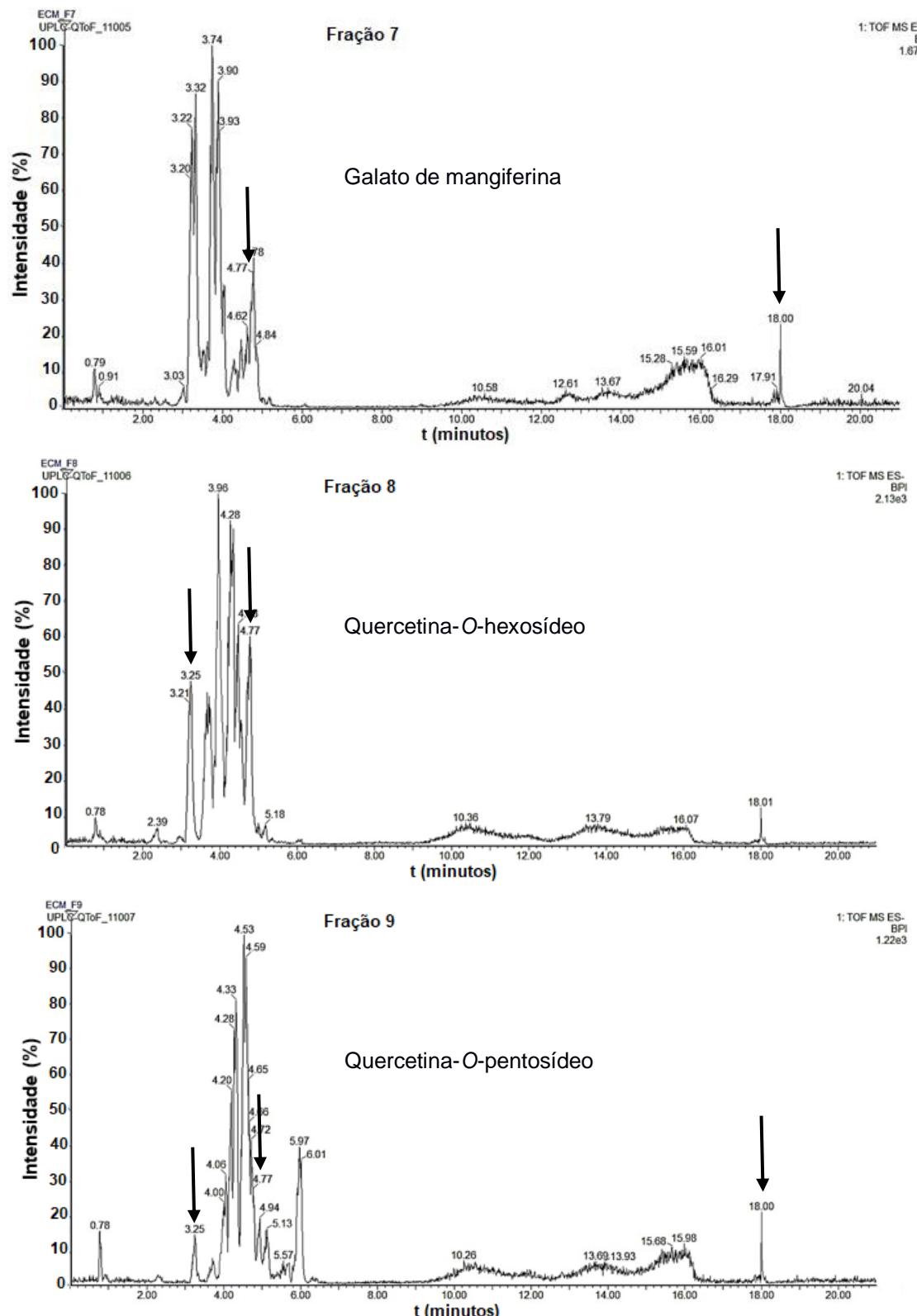
**Fonte:** Dados da pesquisa.

**Figura 11.** Perfil cromatográfico das frações 4, 5 e 6 do extrato de casca de manga (ECM) obtido em sistema Waters Acquity UPLC acoplado a um analisador de massas de alta resolução Time-of-Flight (TOF) Waters equipado com uma interface electrospray (ESI) e análise cromatográfica realizada em 20 minutos.



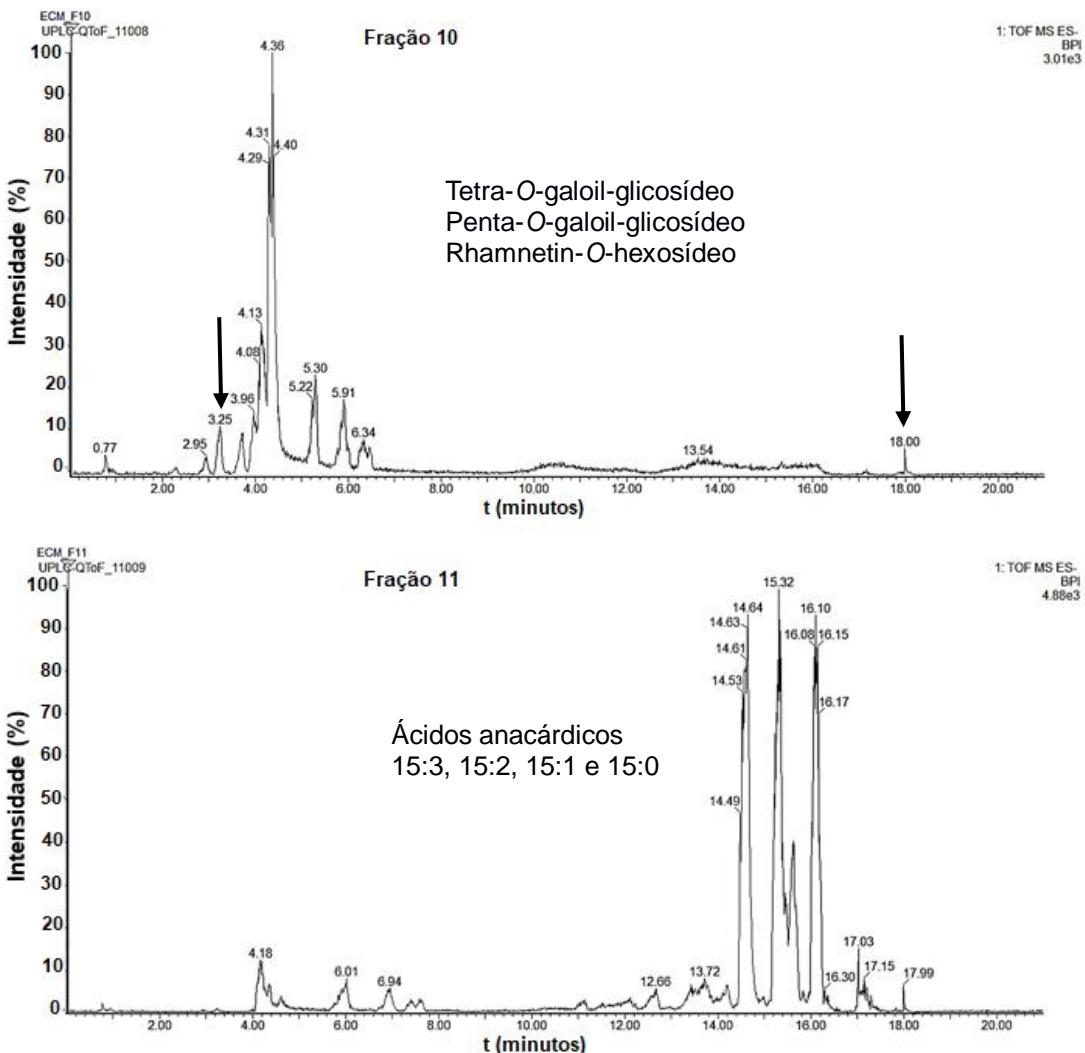
**Fonte:** Dados da pesquisa.

**Figura 12.** Perfil cromatográfico das frações 7, 8 e 9 do extrato de casca de manga (ECM) obtido em sistema Waters Acquity UPLC acoplado a um analisador de massas de alta resolução Time-of-Flight (TOF) Waters equipado com uma interface electrospray (ESI) e análise cromatográfica realizada em 20 minutos.



**Fonte:** Dados da pesquisa.

**Figura 13.** Perfil cromatográfico das frações 10 e 11 do extrato de casca de manga (ECM) obtido em sistema Waters Acquity UPLC acoplado a um analisador de massas de alta resolução Time-of-Flight (TOF) Waters equipado com uma interface electrospray (ESI) e análise cromatográfica realizada em 20 minutos.



**Fonte:** Dados da pesquisa.

Nos perfis cromatográficos estão indicados por setas alguns dos picos de compostos não identificados que são visualizados em mais de uma fração, isso ocorre pela alta sensibilidade do UPLC-QToF-MS<sup>E</sup> que mesmo os compostos se apresentando em baixas concentrações, esses ainda são detectados. Portanto, pode ocorrer de um composto estar presente em mais de uma fração.

## 6 CONCLUSÃO

O perfil cromatográfico obtido em escala preparativa apresentou perfil similar ao perfil cromatográfico em escala analítica, no entanto observou-se picos de baixa intensidade, devido a baixa concentração de amostra injetada. Portanto, seria necessário aumentar a carga de injeção da amostra para os picos aparecerem com maior intensidade. Ainda seria importante injetar as frações no analítico, obtendo perfil cromatográfico e compará-lo ao perfil cromatográfico completo do extrato para uma melhor visualização dos picos, na tentativa de mostrar que a amostra contém uma quantidade considerável dos compostos.

A mangiferina e seus respectivos íons fragmentos foram identificados na fração 6 do extrato de casca manga. O pico característico da mangiferina apresentou baixa intensidade para o perfil cromatográfico do extrato por UPLC-QToF-MS<sup>E</sup> devido à alta intensidade dos picos de ácidos anacárdicos, porém ainda é possível confirmar a presença dessa, e assim, posteriormente, com a realização de várias injeções em HPLC-UV/VIS preparativo é possível obter quantidade de material suficiente para isolamento e quantificação da mangiferina através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Outros metabólitos foram identificados, por exemplo, ácidos fenólicos e orgânicos como o ácido quínico; flavonoides como a quecertina e a quercetina glicolisada; flavonóis como o rhamnetin-*O*-hexosídeo; galatos e galotaninos como o tetra-*O*-galoil-glicosídeo, o penta-*O*-galoil-glicosídeo e estes possuem potencial utilização por indústrias farmacêuticas, cosméticas, químicas e de alimentos. Este é um resultado importante do ponto de vista tecnológico, tendo em vista que, os resíduos, são geralmente descartados durante o beneficiamento de manga. Os subprodutos usados como matéria-prima para obter compostos de alto valor agregado têm fundamental importância para diminuir danos ambientais.

## REFERÊNCIAS

**AGRA, N. G. Secagem e Liofilização de Manga: Características físico-químicas, nutricionais e sensoriais.** 2006. 148 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2006.

ARAÚJO, C. R.; BOTELHO, P. S.; SILVA, T. M. S.; MACIEL, M. I. S.; MELO, E. A.; RYAN, S.; SMITH, R. Phenolic compounds and metals in Tommy Atkins Mango (*Mangifera indica L.*) peels. **The Natural Products Journal.** v. 4, n. 1, p. 2-7, 2014.

ARBOS, K. A.; STEVANI, P. C.; CASTANHA, R. F. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoas de frutos de manga. **Ceres**, v. 60, n. 2, 2015.

**Árvore Frutífera Manga - *Mangifera indica L.*** Disponível em:  
<http://atacadaodasarvores.com.br/plantas/23/arvore-frutifera-manga.html>. Acesso em: 19 maio 2019.

AUBIN, A.; CLEARY, R. **Analytical HPLC to preparative HPLC: scale sp techniques using a natural product extract.** Disponível em:  
<https://www.jove.com/video/2885/analytical-hplc-to-preparative-hplc-scale-up-techniques-using-natural>. Acesso em: 22 jun. 2019.

AZEVEDO, A. C. S. **Estudo das enzimas oxidativas e presença de compostos bioativos em mangas (*Mangifera indica L.*) produzidas no Brasil.** 2006. 186 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, 2006.

BATISTA, C. E. A. **Diversidade genética molecular em germoplasma de mangueira.** 2013. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2013.

BERARDINI, N.; FEZER, R.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Screening of mango (*Mangifera indica L.*) cultivars for their contents of flavonol *o*- and xanthone *c*-glycosides, anthocyanins and pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton**, v. 53, p. 1563-1570, 2005a.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale L.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007

CANUTO. K. M. **Propriedades Químicas e Farmacológicas de Mangiferina: Um Composto Bioativo de Manga (*Mangifera indica L.*).** Técnico Petrolina: EMBRAPA-Semi-árido, 2009. Disponível em:  
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/152169/1/SDC218.pdf>. Acesso: 22 maio 2019.

- CAPELLINI, M. C. **Extração de Óleo de farelo de arroz utilizando solventes alcoólico: Avaliação de alterações na fração proteica e na composição do óleo.** 2013. 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- CAVALCANTE, M. M. S. **Extração de polifenóis, mangiferina e pectina da casca de manga (*Mangifera indica l.*) cv. Tommy Atkins utilizando sistema pressurizado.** 2018. 56 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.
- DAI, R.; LI, K.; LI, Q.; BI, K. Determination of mangiferin, jateorrhizine, palmatine, berberine, cinnamic acid, and cinnamaldehyde in the Tradicional Chinese Medicinal Preparation Zi-Shen Pill by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 42, p. 207-210, abr. 2004.
- DORTA, E.; GONZÁLEZ, M.; LOBO, M. G.; SANCHEZ-MORENO, C.; ANCOS, B. Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica L.*) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. **Food Research International**, v. 57, p. 51-60, 2014.
- DUTRA, F. L. G.; Hoffmann-Ribani, R. Determinação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência isocrática durante estacionamento da erva-mate. **Quimica Nova**, v. 33, n. 1, p. 119-123, 2010.
- FAO. **Statistic Division.** Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017.
- FONSECA, N. **Mangas mais comuns no Brasil.** Portal Dia de Campo – Informação que produz. 2014. Disponível em: <http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=21166&secao=Artigos%20Especiais>. Acesso em: 19 maio 2019.
- FERLONG, E. B.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISCH, A. L. M. **Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais.** **Vetor**, v. 13, p. 105-114, 2003.
- GIORDANI JUNIOR, R.; CAVALI, J.; PORTO, M. O.; FERREIRA, E.; STACHIW, R. Resíduos agroindustriais e alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Ciências da Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 93–104, 2015.
- GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; LOPEZ-COBO, A.; VERARDO, V.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. HPLC-DAD-q-TOF-MS as a powerful platform for the determination of phenolic and other polar compounds in the edible part of mango and its by-products (peel, seed, and seed husk). **Electrophoresis**, v. 37, p. 1072–1084, 2016.
- GUILLARME, D.; NGUYEN, D. T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part I: isocratic separation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 66, n. 3, p. 475-482, jun. 2017.
- HASSAN, F. A.; ISMAIL, A.; ABDULHAMID, A.; AZLAN, A. Identification and

Quantification of Phenolic Compounds in Bambangan (*Mangifera pajang* Kort.) Peels and Their Free Radical Scavenging Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 59, p. 9102–9111. 2011.

IMRAN, M.; MASOOD, S.B.; AKHTAR, S.; RIAZ, M.; IGBAL, M.J.; SULEIRA, H.A.R.S. Quantification of mangiferin by high-pressure liquid chromatography; Physicochemical and sensory evaluation of functional mangiferin drink: Mangiferin from mango peel. **Journal of Food Processing and Preservation.** v. 40, n. 4, p. 760–769, out. 2016.

JASSAL, P. S., SHARMA, M. E. Evaluation of antioxidant, antibacterial, antihemolytic, and phytochemical properties of *Ficus benjamina*, *Ficus infectoria*, and *Ficus krishnae*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research,** v. 12, n. 3, p. 68-73, 2019.

JIN, Y.; XUE, X.; SHI, H.; XIAO, Y.; ZHANG, F.; LIANG, X. HPLC and UPLC switch for TCM analysis. **Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica.** v. 10, n. 1, p. 80-84, fev. 2008.

JONG, TT; LEE, MR; CHIANG, YC; CHIANG, ST. Using LC/MS/MS to determine matrine, oxymatrine, ferulic acid, mangiferin, and glycyrrhizin in the Chinese medicinal preparations Shiao-feng-saan and Dang-guei-nian-tong-tang. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.** v. 40, n. 2, p. 472-477, fev. 2006.

KIST, B. B. *et al.* **Anuário Brasileiro da Fruticultura.** Santa Cruz do Sul-RS: Gazeta, 2018.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica,** v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

**Manga Tommy Atkins.** Disponível em:

<http://irmaosjora.com.br/index.php/produtos/manga/69-manga-tommy-atkins>. Acesso em: 18 maio 2019.

NOGUEIRA, N. M.; SOARES, B. T. M.; ANDRADE, A. B. N.; SINGH Anil. K. Méritos comparativos da Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência em escala convencional e minituarizada. **Revista Brasileira de Farmácia,** v. 92, n. 2, p. 44-50, 2011.

MARQUES, A.; CHICAYBAM, G.; ARAÚJO, M.T.; MANHÃES, L.R.T.; SABAA-SRUR, A.U.O. Composição centesimal e de minerais de casca e polpa de manga (*Mangifera indica L.*) cv. Tommy Atkins. **Revista Brasileira de Fruticultura,** v. 32, n. 4, p. 1206–1210, dez. 2010.

MAHMOUDI, S.; KHALI, M.; BENKHALED, A.; BENAMIROUCHE, K.; BAITI, I. Phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial of leaf extracts from tem Algerian *Ficus carica L.* varieties, v. 6, n. 4, p. 329-245, 2019.

MENDES, L. M. R. **Isolamento bioguiado dos compostos adstringentes do pedúnculo de caju.** 2019. 60 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

MURUNGANANDAN, S.; LAL, J.; GUPTA, P. K. Immunotherapeutic effects of mangiferin mediated by the inhibition of oxidative stress to activated lymphocytes, neutrophils and macrophages. **Toxicology**, v. 215, p. 57-68, ago. 2005a.

MURUNGANANDAN, S.; SRINIVASAN, K.; GUPTA, P. K. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 497-501, mar. 2005b.

OIRAM FILHO, F. **Isolamento em escala preparativa de ácidos anacárdicos provenientes do líquido da casca da castanha de caju (LCC)**. 2017. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

PEDRASSOLLI, I. M.; JUNIOR, A. C. H.; PANDOLFI, M. A. C. Aproveitamento dos resíduos de manga das agroindústrias. In: SIMTEC – SIMPÓSIO DE TECNOLOGIA DA FATEC, 3. Taquaritinga-SP, 2015. **Anais...** Taquaritinga-SP: FATEC, 2015. Disponível em: [www.fatectq.edu.br/simtec](http://www.fatectq.edu.br/simtec). Acesso em: 19 maio 2019.

RUIZ-MONTAÑEZ G.; RAGAZZO-SÁNCHEZ J. A.; CALDERÓN-SANTOYO M.; VELÁZQUEZ-DE LA CRUZ, G.; RAMÍREZ DE LEÓN, J.A.; NAVARRO-OCAÑA, A. Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica L.*). **Food Chemistry**,

SANTOS, E. R. M. **Extração, caracterização e avaliação bioativa de extrato de *Rumex acetosa***. 2013. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2013.

SARTORI, C. J. **Avaliação dos teores de compostos fenólicos nas cascas de *Anadenanthera peregrina* (Angico-vermelho)**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia da Madeira) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

#### **SEBRAE. O cultivo e o mercado da manga.**

2016. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-da-manga,90f5438af1c92410VgnVCM100000b272010aRCR>. Acesso em: 18 maio 2019.

SHIRSATH, S. R.; SABLE S.S.; GAIKWAD, S. G.; SONAWANE, S. H.; SAINI D. R.; GOGATE P. R. Intensification of extraction of curcumin from *Curcuma amada* using ultrasound assisted approach: Effect of different operating parameters. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 38, p. 437-445, set. 2017.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Seminário: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants: review. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p.71-81, jan./abr. 2002.

VETUCCI, J. P.; BERALDO, P. E. P.; CALDERAN, A. N. **Manga: Boletim markesalq em rede.** v. 16, n. 4, 2016. Disponível em: <https://markesalq.com.br/novo/wp-content/uploads/2019/01/markesalq-boletim-manga.pdf>. Acesso em: 18 maio 2019.

TREIN, F. A.; SANTOS, A.; VARGAS, A. S.; RODRIGUES, M. A. S. **Utilização de resíduos industriais como isolantes térmicos: uma revisão aplicada ao caso do projeto kit-mores sob a ótica do eco design.** Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Design. v. 9, n.2. 2016. Disponível em: <http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/utilizao-deresduos-industriais-como-isolantes-termicos-uma-reviso-aplicada-ao-caso-do-projeto-kitmores-sob-a-tica-do-eco-design-2459>. Acesso em: 18 maio 2019.