



INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA Escola Superior Agrária

**Desenvolvimento de um aditivo natural à base de catequina:
otimização da extração e estabilização a partir de frutos de
Arbutus unedo L.**

Bianca Rodrigues de Albuquerque

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção
do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*

Orientado por:

Professora Doutora Isabel C. F. R. Ferreira

Doutora Lillian Barros

Professora Doutora Celeide Pereira

Bragança

2016

*Aos meus pais,
Marcia e Servilio.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais por toda educação, credibilidade, paciência, motivação, esperança e apoio, não só para realização desta conquista, mas por todos os outros fatores que me trouxeram até aqui.

Em especial às professoras e orientadoras Dra. Isabel C.F.R. Ferreira e Dra. Lillian Barros, por todos os ensinamentos transmitidos, paciência e dedicação ao trabalho. Sou extremamente grata por ter tido o privilégio de trabalhar com pessoas tão competentes e atenciosas, e que sem dúvidas são apaixonadas pela química e bioquímica, muito obrigada. À professora e orientadora Dra. Celeide Pereira da UTFPR de Medianeira, por toda a colaboração durante este período.

Ao Dr. Miguel Angel Prieto Lage, por todo o auxílio, acompanhamento, ensinamento, disponibilidade e motivação, obrigada por tornar este trabalho possível e por toda a aprendizagem que irei levar comigo.

À toda equipa do BioChemCore por todo apoio, contribuição e ensinamentos no decorrer do estudo. Em especial, à Carla Pereira e à Maria Inês Dias, fundamentais para o sucesso obtido.

Aos meus amigos pelo companheirismo em momentos bons e difíceis, motivando e torcendo uns pelos outros, obrigada por estarem presentes.

Aos familiares e amigos que estão longe, mas que mesmo assim me acompanharam sempre.

Finalmente, à Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao Instituto Politécnico de Bragança por terem disponibilizado este mestrado e por todo o apoio financeiro cedido.

Muito Obrigada!

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABELAS	V
LISTA DE ABREVIACÕES	VII
ABSTRACT	IX
RESUMO	XI
1. INTRODUÇÃO	I
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. A necessidade imperativa da utilização de aditivos em alimentos	3
2.1.1. Resenha histórica	3
2.1.2. A importância dos aditivos alimentares	3
2.1.3. Os agentes conservantes e o caso particular dos antioxidantes	5
2.2. Antioxidantes sintéticos versus naturais	7
2.2.1. O domínio dos antioxidantes sintéticos.....	7
2.2.2. A alternativa dos antioxidantes naturais.....	9
2.3. Explorando recursos locais como fonte de antioxidantes naturais	10
2.3.1. O caso particular dos flavan-3-óis	10
2.3.2. <i>Arbutus unedo</i> L. como fonte de flavan-3-óis	12
2.4. Obtenção de flavan-3-óis a partir de <i>Arbutus unedo</i> L.	16
2.4.1. Otimização dos processos de extração do fruto de <i>A. unedo</i>	16
2.4.2. Fatores que podem afetar a estabilidade de flavan-3-óis.....	19
2.5. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Padrões e reagentes	23
3.2. Obtenção dos frutos de <i>Arbutus unedo</i> L.	23
3.3. Identificação e quantificação de flavan-3-óis	23
3.4. Otimização do processo de extração de catequina a partir de frutos de <i>Arbutus unedo</i> L.	24
3.4.1. Extração por maceração (ME)	24
3.4.2. Extração assistida por micro-ondas (MAE).....	24
3.4.3. Extração assistida por ultrassons (UAE)	25
3.5. Purificação e obtenção de extratos enriquecidos em catequinas (EEC)	25
3.6. Estudos de estabilidade dos extratos enriquecidos em catequinas (EEC)	25
3.6.1. Preparação do extrato otimizado enriquecido em catequinas	27
3.6.2. Estabilidade do EEC em pó	27
3.6.3. Estabilidade do EEC em solução aquosa simulando matrizes alimentares	28
3.6.4. Atividade antioxidante dos EEC no estudo de estabilidade em pó	29
3.7. Modelos matemáticos aplicados à otimização da extração: Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)	30
3.7.1. Delineamento experimental	30
3.7.2. Cálculo dos valores naturais e codificados	31
3.7.3. Modelação matemática.....	32
3.7.4. Processo de otimização das variáveis para uma resposta máxima	33

3.8. Modelos matemáticos aplicados aos métodos de estabilização	33
3.8.1. Modelo individual para análise de efeitos das variáveis na estabilidade.....	33
3.8.2. Análise de multivariáveis	34
3.9. Métodos numéricos e análise estatística	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Otimização dos processos de obtenção de catequina a partir de frutos de <i>Arbutus unedo</i> L.....	37
4.1.1. Ensaio preliminares para a seleção das variáveis relativas e parâmetros instrumentais para o centro do domínio experimental previsto para a aplicação da MSR..	37
4.1.2. Resultados da aplicação da MSR para um DCCC com três variáveis	38
4.1.3. Otimização final das ME e MAE usando uma MSR baseada no DFC com as variáveis t e T	43
4.1.4. Comparação das técnicas de extração, condições ótimas que maximizam a extração, análise estatística e verificação dos modelos experimentais	46
4.2. Estabilidade do extrato enriquecido em catequinas (EEC)	48
4.2.1. Estabilidade dos EEC em pó durante o armazenamento	48
4.2.2. Estabilidade dos EEC em solução aquosa simulando uma matriz alimentar	57
5. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	65

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura base dos flavonoides (2-fenil-benzopirano)..... 11
- Figura 2.** Subclasses dos flavonóides..... 11
- Figura 3:** A. Medronheiro. B. Frutos de medronho (A.M. Carvalho). 13
- Figura 4:** Processo de extração e obtenção dos extratos enriquecidos em catequinas e dois testes de estabilidade realizados: (1) a estabilidade dos extratos em sistema em pó de acordo com as principais condições que afetam o armazenamento; e (2) a estabilidade dos extratos em sistemas de solução aquosa, considerando a seu potencial para a aplicação em matrizes alimentares. 26
- Figura 5:** Os gráficos expressam o comportamento das extrações para um DCCC. **A:** Análise gráfica em 3D de cada variável. Cada gráfico em 3D representa a superfície de resposta teórica prevista com o polinómio de segunda ordem das Eqs.[13], [14] e [15]. **B:** Ilustrações da qualidade do ajuste, a primeira simula as alterações das respostas entre os dados e a segunda expressa a distribuição residual como função de cada variável..... 41
- Figura 6:** **A:** Apresenta a otimização final de extração para as técnicas de ME e MAE em um DFC. R: Rendimento de extração de catequina (mg/g ms) em função do t e T . Pontos (●) representam os resultados experimentais obtidos (**Tabela 5**). Cada gráfico em 3D representa a resposta teórica prevista com as equações polinomiais de segunda ordem Eq. [16] e [17]. **B:** Representação em 2D dos resultados dos ajustes nas Eqs. [16] e [17] para os pontos experimentais (valor □ mínimo, ◇ médio e △ máximo) para a combinação do t e T sobre o rendimento da extração de catequina (mg/g ms). **C:** Ilustrações da qualidade do ajuste, a primeira simula as alterações das respostas entre os dados e a segunda expressa a distribuição residual como função de cada variável. 45
- Figura 7:** Respostas individuais em 2D da ME, MAE e UAE para cada variável. Cada gráfico apresenta um ponto (⊙) de valor ótimo sobre uma linha contínua obtida das equações de segunda ordem adquiridas através das Eqs. [13] a [17]. 47
- Figura 8:** Estabilidade de armazenamento em pó avaliada pelos flavan-3-óis em função de t , T e pH . A **secção A** mostra a análise cinética individual dos efeitos na degradação dos flavan-3-óis. Os pontos são dados experimentais (● -25 °C, ○ 5 °C, ◆ 25 °C, ◇ 45 °C) e as linhas (—) são os resultados modelados usando a Eq. [8] (respostas paramétricos e coeficientes de correlação da **Tabela 8**. A **secção B** mostra o procedimento de ajuste global de multivariáveis (trivariado): **B1** mostra os padrões paramétricos dos parâmetros cinéticos k e r da Eq.[8] (os pontos são resultados univariados e as linhas são respostas multivariadas) em função das respectivas variáveis (pH que afeta o parâmetro k e T que afeta r); **B2** ilustra a resposta em 3D do efeito combinado das três variáveis nas melhores condições experimentais encontradas ($T=-20^{\circ}\text{C}$ e $pH=6,7$); e **B3** mostra a correlação entre os valores experimentais e os previstos obtidos com o modelo multivariável apresentado na Eq.[12]..... 52
- Figura 9:** Estabilidade de armazenamento em pó do composto catequina em função de t , T e pH . A **secção A** mostra a análise cinética individual dos efeitos na degradação do composto catequina. Os pontos são dados experimentais (● -25 °C, ○ 5 °C, ◆ 25 °C, ◇ 45 °C) e as linhas (—) são resultados modelados usando a Eq.[8] (respostas paramétricas e coeficientes de correlação da **Tabela 8**. A **secção B** mostra o procedimento de ajuste global de multivariáveis (trivariado): **B1** mostra os padrões paramétricos dos parâmetros cinéticos k e r da Eq. [8] (os pontos são resultados univariados e as linhas representam a resposta multivariada) em função das respectivas variáveis (pH que afeta o parâmetro K e T que afeta r); **B2** mostra ilustra a resposta em 3D do efeito combinado das três variáveis nas melhores condições experimentais encontradas ($T=-20^{\circ}\text{C}$ e $pH=6,7$); **B3** mostra a correlação entre os valores experimentais e os previstos obtidos com o modelo multivariável apresentado na Eq. [12]..... 53

Figura 10: Estabilidade de armazenamento em pó avaliada pela atividade captadora de DPPH em função de t , T e pH . A **seção A** mostra a análise cinética individual dos efeitos na degradação dos compostos antioxidantes. Os pontos são dados experimentais (● -25 °C, ○ 5 °C, ◆ 25 °C, ◇ 45 °C) e as linhas (—) representam os resultados modelados usando a Eq. [8] (respostas paramétricas e coeficientes de correlação na **Tabela 8**). A **seção B** mostra o procedimento de ajuste global multivariado (trivariado): **B1** mostra os padrões paramétricos dos parâmetros cinéticos k e r da Eq [8] (os pontos são resultados univariados e as linhas são respostas multivariadas) em função das respectivas variáveis (pH afeta o parâmetro K e T afeta r); **B2** ilustra a resposta em 3D do efeito combinado das três variáveis nas melhores condições experimentais encontradas ($T = -20^{\circ}\text{C}$ e $pH = 6,7$) e **B3** mostra a correlação entre os valores experimentais e os previstos obtidos com o modelo multivariado apresentado na Eq [12].55

Figura 11: Estabilidade de armazenamento em pó avaliada pelo poder reductor (PR) em função de t , T e pH . A **seção A** mostra a análise cinética individual dos efeitos de degradação dos compostos antioxidantes. Os pontos são dados experimentais (● -25 °C, ○ 5 °C, ◆ 25 °C, ◇ 45 °C) e as linhas (—) são os resultados modelados usando a Eq. [8] (respostas paramétricas e coeficientes de correlação da **Tabela 8**). A **seção B** mostra o procedimento de ajuste global de multivariáveis (trivariado): **B1** mostra os padrões paramétricos dos parâmetros cinéticos k e r da Eq. [8] (os pontos são resultados univariados e as linhas são resultados multivariados) em função das respectivas variáveis (pH que afeta o parâmetro K e T que afeta r); **B2** ilustra a resposta em 3D do efeito combinado das três variáveis nas melhores condições experimentais encontradas ($T = -20^{\circ}\text{C}$ e $pH=6,7$); e **B3** mostra a correlação entre os valores experimentais e os previstos obtidos com o modelo multivariável apresentado na Eq. [12].56

Figura 12: Estabilidade dos flavan-3-óis em sistemas de solução aquosa que simula matrizes alimentares. A **seção A** mostra a análise gráfica dependente do tempo dos resultados de estabilidade com base no teor de flavan-3-óis em função de T e de pH . Cada gráfico mostra os efeitos na degradação ao longo do tempo (0-24h) de cada T testada (25, 40, 55, 70 e 80 °C). Os pontos são os dados experimentais dos diferentes pH s testados (● 3, ○ 5, ◆ 7 and ◇ 9) e as linhas (—) representam os resultados previstos pela Eq. [8]. Os resultados paramétricos e os coeficientes de correlação são apresentados na **Tabela 10**. A parte **B** mostra os resultados da aplicação do procedimento global multivariável descrito na Eq. [19]: **B1** mostra o padrão de superfície paramétrica da cinética r em função das respectivas variáveis que o afetam (pH e T); e **B2** mostra a correlação entre os valores experimentais e os previstos obtidos com o modelo multivariável apresentado na Eq. [19].60

Figura 13: Estabilidade da catequina em sistemas de solução aquosa que simula matrizes alimentares. A **seção A** mostra a análise gráfica dependente do tempo individual dos resultados de estabilidade com base no teor de catequina em função de T e de pH . Cada gráfico mostra os efeitos da degradação ao longo do tempo (0-24h) de cada T testada (25, 40, 55, 70 e 80 °C). Os pontos são os dados experimentais dos diferentes pH s testados (● 3, ○ 5, ◆ 7 and ◇ 9) e as linhas (—) são os resultados previstos pela Eq. [8]. Os resultados paramétricos e coeficientes de correlação são apresentados na **Tabela 10**. A **seção B** mostra os resultados multivariáveis globais da aplicação da Eq. [19] para descrever os dados multivariáveis: **B1** mostra a superfície padrão de paramétrica da cinética r em função das respectivas variáveis que o afetam (pH e T); e **B2** mostra a correlação entre os valores experimentais e os previstos obtidos com o modelo multivariável apresentado na Eq. [19].61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Diferentes técnicas e condições para a extração de catequina a partir de diversas fontes.....	17
Tabela 2: Delineamento experimental e codificação das variáveis independentes na geração fatorial.....	24
Tabela 3: Delineamento experimental para a análise da estabilidade durante o armazenamento EEC em pó a diferentes <i>pHs</i>	28
Tabela 4: Delineamento experimental para análise da estabilidade do EEC a diferentes <i>pHs</i> em sistema aquoso	29
Tabela 5: A) Resultados da MSR do DCCC para a primeira aproximação da otimização com três variáveis envolvidas (X_1 , X_2 e X_3) na ME, MAE e UAE. B) Resultados da MSR do DFC para a otimização de duas variáveis (X_1 e X_2) para a ME e MAE (valores de variáveis naturais e intervalos na Tabela 2). Foram realizadas três repetições (R_{1-3}) para cada condição em cada técnica.	39
Tabela 6: Resultados paramétricos da equação polinomial de segunda ordem (Eq.[7]) para cada técnica de extração avaliada de acordo com o DCCC com 5 níveis (Parte A) e DFC com 3 níveis (Parte B). O subscrito 1, 2 e 3 significa as variáveis envolvidas: t , T e S , respectivamente. A análise dos parâmetros significativos ($\alpha=0,05$) é apresentada em valores naturais. Além disso, a informação estatística do procedimento de ajuste do modelo é apresentada.	40
Tabela 7: Condições de variáveis em valores naturais que conduzem a uma resposta ótima na MSR, para a primeira aproximação usando um DCCC e para a segunda aproximação usando um DFC para cada técnica de extração.	42
Tabela 8: Resultados dos intervalos paramétricos e de confiança de flavan-3-óis , catequina e propriedades antioxidantes ajustados ao modelo dependente do tempo apresentada na Eq. [8] a diferentes <i>pH</i> e condições de T ao avaliar a estabilidade do extrato enriquecido em catequinas (EEC) durante armazenamento.	49
Tabela 9: Resultados dos intervalos paramétricos e de confiança de flavan-3-óis , catequina e propriedade antioxidante obtidos através do modelo de multivariáveis (t , T e <i>pH</i>) apresentado na Eq. [12] ao avaliar a estabilidade do extrato enriquecido em catequinas (EEC) durante armazenamento.	50
Tabela 10: Resultados dos intervalos paramétricos e de confiança de flavan-3-óis e catequina ajustados ao modelo dependente do tempo apresentada na Eq. [8] a diferentes <i>pH</i> e condições de T ao avaliar a estabilidade da aplicação do extrato enriquecido em catequinas (EEC).....	57

LISTA DE ABREVIÇÕES

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análise de variância
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
C	Catequina
CG	Galato de catequina
DAD	Detetor de díodos
DCCC	Deliamento composto central circunscrito
DFC	Deliamento fatorial completo
dj	Grau de liberdade
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
dw	Dry weight (peso seco)
DW	Coefficiente de Durbin-Watson
e.g	Por exemplo
EAG	Equivalente em ácido gálico
EC	Epicatequina
EC₅₀	Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor
ECG	Galato de epicatequina
EEC	Extrato enriquecido em catequina
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
EQ	Etoxiquina
Eq.	Equação
Eqs	Equações
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
GC	Galocatequina
GCG	Galato de galocatequina
GF	Fruto verde
GI₅₀	Concentração da amostra responsável por 50% de inibição do crescimento celular
HCT-15	Linha celular humana de carcinoma do cólon
HeLa	Linha celular humana de carcinoma cervical
HepG2	Linha celular humana de carcinoma hepatocelular
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HR	Humidade Relativa
IDA	Ingestão diária aceitável
JECFA	Comitê Misto FAO/WHO de Peritos em Aditivos Alimentares
MAE	Extração assistida por micro-ondas
MAPE	Média da percentagem absoluta do erro
MCF-7	Linha celular humana de adenocarcinoma mamário
ME	Extração por maceração
MRPs	Produtos da Reação de Maillard
ms	Massa seca
MSE	Quadrado médio do erro
MSR	Metodologia de superfície de resposta
NCI-H460	Linha celular humana de carcinoma de pulmão

n°	Numero
ns	Não significativo
Obs	n° de observações
P	Potencia
PG	Propirilgalato
pH	Potencial hidrogeniônico
PR	Poder redutor
R²	Coefficiente de correlação
R²_{adj}	Coefficiente de correlação de determinação ajustado para o modelo
RF	Fruto vermelho
RMSE	Média da raiz quadrada do erro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minutos
S	Solvente
SD	Desvio padrão
T	Temperatura
t	Tempo
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TBHQ	<i>Terc</i> -butil- <i>p</i> -benzoquinona
UAE	Extração assistida por ultrasons
UE	União Europeia
UV	Ultravioleta
v/v	Relação volume/volume
WHO	Organização Mundial de Saúde
X₁	Tempo
X₂	Temperatura
X₃	Solvente
YF	Fruto amarelo

ABSTRACT

The common Mediterranean ornamental strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) produces an edible reddish sweet berry that is found to be bland and tasteless unless it is consumed overripe, otherwise it is discarded or used as basic agricultural sub residue. The bioactive properties of this fruit have been reported and related with phenolic compounds, mainly flavan-3-ols, such as catechin and procyanidins, which has opened the opportunity to exploit their extraction from alternative sources.

This study compares and optimizes the maceration, microwave and ultrasound extraction techniques in the recovery of a catechin extract from *Arbutus unedo* L. fruits and evaluate the stability of flavan-3-ols during storage and application processes. To obtain conditions that maximize the catechin extraction yield, a response surface methodology was used.

Maceration and microwave extractions were found to be the most effective methods, capable of yielding 1.38 ± 0.1 and 1.70 ± 0.3 mg of catechin/g dry weight (dw) in the corresponding optimal extraction conditions. The optimal conditions for maceration were 93.2 ± 3.7 min, 79.6 ± 5.2 °C and 23.1 ± 3.7 % of ethanol, while for the microwave extraction were 42.2 ± 4.1 min, 137.1 ± 8.1 °C and 12.1 ± 1.1 % of ethanol. The microwave system was a quicker solution, conducting to slightly higher yields of catechin than maceration, but this one needed lower temperatures to reach similar yields. The ultrasound method was the least effective solution in terms of catechin yield extraction (0.71 ± 0.1 mg/g at 42.4 ± 3.6 min, 314.9 ± 21.2 W and 40.3 ± 3.8 % ethanol).

The stability was tested with of the catechin-enriched extract (60% flavan-3-ols and 22% catechin), obtained under the best maceration conditions, was tested. Therefore, catechin-enriched extracts were submitted to physical and chemical stability studies, considering the main affecting variables (time, temperature and pH): i) a stability study of the extracts during storage as powder system; and ii) a stability study of the extracts in simulated food environment (aqueous solution system). The measured responses were the flavan-3-ols and catechin contents, determined by HPLC-DAD, and the antioxidant activity of the extracts evaluated by hydrophilic assays. Mechanistic and phenomenological equations were used to describe the responses, and the optimal conditions for flavan-3-ols (including catechin) stability as powder extract during a month were pH= 5.4 and T= -20°C; while its stability in aqueous solution remained during the 24 h of application at pH<4 and T<30°C.

These results provide useful information for: i) potential industrial use of *A. unedo* fruits as alternative sources of flavan-3-ols; and ii) shelf-life calculations and catechin loss predictions at specific conditions of temperature and pH. Finally, the results obtained showed a certain agreement with previous reports of catechin stability studies in powder and solution systems, but providing a new alternative source: *A. unedo* fruits.

RESUMO

O medronho (*Arbutus unedo* L.) é uma árvore ornamental comum no Mediterrâneo que produz frutos comestíveis avermelhados e doces quando maduros. As propriedades bioativas destes frutos têm sido descritas e relacionadas com a sua composição em compostos fenólicos, principalmente flavan-3-óis, tais como catequinas e procianidinas, o que torna interessante explorar esta matriz como fonte alternativa para extrair estes compostos.

O presente estudo visou otimizar as técnicas de extração de catequina a partir de frutos de *A. unedo* por maceração, micro-ondas e ultrassons e avaliar a estabilidade desses compostos durante os processos de armazenagem e aplicação, simulando uma matriz alimentar. Para obter as condições de maximização do rendimento da extração de catequina, utilizou-se uma metodologia de superfície de resposta.

As técnicas de extração por maceração e micro-ondas foram consideradas mais eficazes, capazes de produzir $1,38 \pm 0,1$ e $1,70 \pm 0,3$ mg de catequina/g matéria seca (ms), respetivamente, nas condições ótimas de extração. Essas condições foram para a maceração $93,2 \pm 3,7$ min, $79,6 \pm 5,2$ °C e $23,1 \pm 3,7$ % de etanol, enquanto para o micro-ondas foram $42,2 \pm 4,1$ min, $137,1 \pm 8,1$ °C e $12,1 \pm 1,1$ % de etanol. O sistema de extração por micro-ondas ofereceu uma resposta ótima mais rápida e com rendimentos de extração de catequina ligeiramente mais elevados do que os da maceração, mas esta necessitou de temperaturas mais baixas para atingir rendimentos de extração semelhantes. O método de extração por ultrassons foi menos eficaz em termos de rendimento de extração de catequina ($0,71 \pm 0,1$ mg/g em $42,4 \pm 3,6$ min, $314,9 \pm 21,2$ W e $40,3 \pm 3,8$ % de etanol).

Foi também testada a estabilidade do extrato enriquecido em catequina (60% flavan-3-óis e 22% de catequina), obtido nas melhores condições de maceração. Assim, os extratos enriquecidos em catequina foram submetidos a estudos de estabilidade química e física, considerando as principais variáveis que afetam os compostos (tempo, temperatura e pH): i) um estudo de estabilidade dos extratos durante o armazenamento do sistema em pó; e ii) um estudo de estabilidade dos extratos em ambiente que simula um alimento (sistema de solução aquosa). Os resultados foram determinados pelo conteúdo de flavan-3-óis e catequina, utilizando HPLC-DAD, e pela atividade antioxidante dos extratos avaliada por ensaios hidrofílicos. Utilizaram-se equações mecanicistas e fenomenológicas para descrever as condições ideais para garantir a

estabilidade de flavan-3-óis (incluindo catequina). As condições de estabilidade adequadas para o extrato em pó durante um mês foram: pH=5,4 e T=-20°C; enquanto a sua estabilidade em solução aquosa permaneceu durante as 24h de aplicação a um pH <4 e T <30°C. Estes resultados fornecem informações úteis para: i) potencial utilização industrial dos frutos de *A. unedo* como fontes alternativas de flavan-3-óis e ii) cálculos de vida de prateleira e previsões de perda de catequina em condições específicas de temperatura e pH. Finalmente, os resultados obtidos estão de acordo com estudos de estabilidade de catequina em sistemas em pó ou em solução realizados anteriormente por outros autores, mas o presente estudo valida uma nova fonte alternativa: frutos de *A. unedo*.

1. INTRODUÇÃO

Os aditivos alimentares são utilizados há milhares de anos no fabrico de alimentos. Dentro dos aditivos alimentares encontram-se os conservantes que desempenham um papel fundamental na cadeia produtiva e distribuição de alimentos, pois são responsáveis por assegurar a qualidade e segurança do produto até ao momento de consumo. No entanto, existe uma controvérsia em relação ao uso prolongado e excessivo de alguns aditivos sintéticos (Carocho et al., 2015; McCarthy et al., 2001; Soares, 2002).

Com a incerteza sobre o consumo dos conservantes sintéticos, tais como o BHT (hidroxitolueno butilado) e o BHA (hidroxianisol butilado), surge o interesse pela descoberta e aplicação de conservantes naturais em alimentos. Conservantes naturais são compostos obtidos através de matrizes naturais, tais como extratos de plantas, algas ou cogumelos (Devcich et al., 2007), muitas vezes compostos maioritários como vitaminas, carotenoides e compostos fenólicos (Carocho et al., 2014).

Os compostos fenólicos representam um dos maiores grupos de metabolitos secundários, sendo constituintes normais da dieta humana. O grande interesse por estes compostos advém das suas múltiplas atividades biológicas, e.g. antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, entre outras. Os flavonoides representam o grupo mais comum de compostos fenólicos e também mais amplamente distribuído no reino vegetal, podendo dividir-se em diferentes subclasses: flavonóis, flavonas, flavanóis (flavan-3-óis ou flavan-3,4-dióis, ou catequinas), antocianinas, isoflavonas, chalconas, flavanonas e di-hidroflavonóis. Os flavan-3-óis são dos compostos fenólicos mais abundantes na alimentação humana, apresentando um elevado potencial antioxidante. Para as plantas, também desempenham um papel de proteção contra bactérias e fungos (Halliwell & Gutteridge, 1995; Carocho et al., 2014; Carocho & Ferreira, 2013). Este grupo de compostos está presente numa vasta gama de alimentos, sendo o chá verde e o cacau as maiores fontes (Manach, 2004; Gadkari & Balaraman, 2015; Monagas et al., 2003). A catequina e a epicatequina são monómeros de flavan-3-óis, e a sua associação a outros monómeros dá origem às procianidinas. Vários estudos têm destacado os benefícios das catequinas para a saúde humana, tais como prevenção de cancro, oxidação do plasma, bem como controlo da obesidade (Lotito & Fraga, 1998; Higdon & Frei, 2003; Nagao et al., 2009; Hirasawa & Takada, 2004).

A procura de novas fontes alternativas de flavan-3-óis para a indústria alimentar é de extrema importância devido às características deste composto natural, especialmente como antioxidante, podendo ser utilizado como ingrediente e potencial aditivo alimentar. O presente estudo aborda o interesse da valorização dos frutos de *Arbutus unedo* L. (medronho) como fonte ainda não explorada de flavan-3-óis .

O medronheiro (*A. unedo*), pertencente à família das Ericaceas, encontra-se distribuído por vários países com clima mediterrâneo. Em Portugal, existe em todo o território continental, mas sobretudo na região do Algarve. A árvore do medronho é bastante resistente a condições de calor intenso e geadas, o que torna o seu cultivo pouco exigente. Os primeiros frutos de *A. unedo* começam a surgir a partir dos 2 anos de cultivo e, após 4 anos, o ritmo de produção está estabilizado. A colheita dos frutos maduros ocorre no mês de outubro. Os frutos apresentam um teor considerável de compostos fenólicos, inclusivamente de flavan-3-óis (Forum Florestal, 2012; Guimarães et al., 2014).

É possível encontrar vários estudos na literatura que descrevem os compostos bioativos presentes no medronho e as suas propriedades antioxidantes (Pallauf et al., 2008; Miguel et al., 2014; Isbilir et al., 2012; Guimarães et al., 2013). No entanto, para que o extrato bioativo de frutos de medronho possa ser aplicado como ingrediente (e potencial aditivo) alimentar, é necessário otimizar metodologias de extração, que garantam o maior rendimento, A sua estabilidade é também de extrema importância, atendendo às condições de processamento e armazenamento mais adequadas à preservação da integridade dos compostos químicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A necessidade imperativa da utilização de aditivos em alimentos

2.1.1. Resenha histórica

Desde a pré-história que o homem recorre a formas físicas e químicas para conservar os alimentos. Antigamente, os métodos de conservação incluíam principalmente secagem, refrigeração, fermentação e aquecimento. Compostos químicos como o sal, os nitritos e os sulfitos são as substâncias mais antigas aplicadas na conservação dos alimentos (Branen et al., 2001).

A utilização de agentes químicos em alimentos é conhecida há milhares de anos, nomeadamente através do uso de especiarias, conservantes, aromas e agentes de maturação. No entanto, no início de 1800 os aditivos químicos começaram a ser utilizados intencionalmente para cometer adulterações alimentares, um problema que assumiu grandes proporções com os avanços da química analítica e com a falta de regulamentação e interesse das autoridades. Nesse mesmo período, começou a surgir uma maior preocupação com a qualidade dos produtos fornecidos e com os químicos aplicados a esses produtos. A problemática das adulterações alimentares arrastou-se até 1950, quando o avanço dos métodos de análise, juntamente com as pressões regulamentares, começaram a minimizar o problema (Fennema, 1987).

Com o agravamento do uso inapropriado de químicos nos alimentos foram criadas organizações, nomeadamente a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (WHO). Em 1955, após a WHO reconhecer que a utilização de químicos na produção de alimentos se tornou um problema de saúde pública, a FAO e a WHO estabeleceram a criação de um Comitê Misto FAO/WHO de Peritos em Aditivos Alimentares (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA*) (FAO & WHO, 2006). Atualmente, o JECFA avaliou mais de 2500 aditivos alimentares (FAO, 2016).

2.1.2. A importância dos aditivos alimentares

De acordo com o *Food Protection Committee of the Food and Nutrition Board*, os aditivos alimentares são definidos como “uma substância ou mistura de substâncias, diferente de um alimento de base, que está presente em alimentos como resultado de qualquer aspeto da produção, processamento, armazenamento ou embalagem. O termo não faz incluir contaminantes” (Branen et al., 2001).

No Brasil, os aditivos alimentares são definidos pela Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997 como “qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam num componente de tal alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar as suas propriedades nutricionais.” (Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, 1997)

Os aditivos são aplicados em alimentos por razões tecnológicas, nutricionais ou sensoriais. A adição tecnológica justifica-se por proporcionar vantagens tecnológicas, exceto quando estas podem ser obtidas por processos tecnológicos ou precauções de ordem de higiene mais adequadas. A utilização de um aditivo só é permitida se o mesmo for seguro e tiver passado por uma avaliação toxicológica levando em consideração também o efeito acumulativo, sinérgico e de proteção do seu uso. Todos os aditivos devem atender ao grau de pureza estabelecido pela FAO/WHO (Brasil, 1997; Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, 1997).

Na América há mais de 3000 tipos de aditivos permitidos, classificados em seis grandes grupos: conservantes, aromas, corantes, texturizantes, emulsificantes e agentes nutricionais. Alguns aditivos ainda podem exercer mais do que uma função no alimento (Branen et al., 2001). Dentro da União Europeia (UE) os aditivos alimentares são divididos em 26 classes conforme a função que desempenham no alimento: adoçantes, corantes, conservantes, antioxidantes, transportadores, ácidos, reguladores de acidez, antiespumantes, anti-aglomerantes, emulsificantes, espessantes, sais de fusão, agentes de endurecimento, estabilizantes, gelificantes, intensificadores de sabor, umectantes, amidos modificados, agentes de revestimento, gases de embalagem, agentes de volume, agentes formadores de espuma, propulsores, sais emulsificantes, sequestrantes e agentes de tratamento de farinha (Parlamento Europeu, 2008).

Os aditivos também poder ser divididos em 4 grupos de acordo com sua origem e produção: aditivos naturais, obtidos diretamente de animais ou plantas, aditivos sintéticos idênticos aos naturais (aditivos sintéticos que imitam os naturais), modificados dos naturais (aditivos naturais que sofrem alguma modificação química) e aditivos artificiais (compostos sintéticos) (Carocho et al., 2014).

A EFSA (*European Food Safety Authority*), em 2008, realizou um fórum para discutir a segurança alimentar. Como conclusão da reunião, concordou-se com a crescente confiabilidade do consumidor e que o uso de aditivos alimentares é favorável aos alimentos, no entanto, em alguns casos, há o risco de efeitos negativos na saúde (Bronzwaer, 2008). Assim, a EFSA deu início a um programa de reavaliação de alguns aditivos alimentares. O plano estabeleceu primeiramente a avaliação de alguns corantes e do adoçante aspartame. Quanto aos conservantes, antioxidantes e glutamatos terão a avaliação concluída entre final de 2015-2016. Por fim, em 2020, o programa estará finalizado com a avaliação dos restantes adoçantes e corantes (European Commission, 2016; EFSA, 2016).

Na UE, todos aditivos aprovados ou não, recebem a letra E, que significa Europa, e um número específico. Essa nomenclatura foi adicionada ao *Codex alimentarium* para facilitar a identificação das substâncias entre diferentes países (Branen et al., 2001).

2.1.3. Os agentes conservantes e o caso particular dos antioxidantes

No grupo dos conservantes há uma divisão em três subclasses: os antimicrobianos, os antioxidantes e os agentes anti-escurecimento (Branen et al., 2001).

Os antimicrobianos são adicionados aos alimentos com duas finalidades: a primeira é de controlar o crescimento da microbiota natural do alimento e retardar o processo de deterioração natural; a segunda razão é a de prevenir o crescimento de microrganismos contaminantes, incluindo os patogênicos, e garantir assim a segurança alimentar (Tajkarimi et al., 2010). Os agentes microbianos sintéticos comumente utilizados são os sais de cálcio, o nitrato de sódio e os sulfitos (Abdulmumeen et al., 2012). Os principais antimicrobianos químicos utilizados em quantidade *quantus satis* são: ácido acético (E260), acetato de potássio (E261), acetato de cálcio (E263), ácido láctico (E270), dióxido de carbono (E290), e ácido málico (E296). Os aditivos antimicrobianos com usos restritos são o ácido benzóico e benzoatos (E210-E219; IDA- ingestão diária aceitável - 5 mg/kg de massa corporal), ácido sórbico e sorbatos (E200-E209; IDA 25 mg/kg de massa corporal), nitritos (nitrito de potássio E249; IDA 0,07 mg/kg de massa corporal, nitrito de sódio E250; IDA de 0,1 mg/kg de massa corporal), nitratos (E251 nitrato de sódio e nitrato de potássio E252; ambos com IDA 3,7 mg/kg de massa corporal) (Carocho et al., 2014). Os antimicrobianos naturais são normalmente obtidos de animais ou vegetais. Há um grande potencial para a utilização desses aditivos naturais em alimentos, em especial, nos produtos vegetais e em fruta fresca, porém, os

mecanismos de ação, a toxicologia e as interferências sensoriais ainda não estão bem definidos (Tajkarimi et al., 2010). Alguns compostos naturais com propriedades antimicrobianas estudadas são: óleos essenciais extraídos de plantas (orégão, manjeriço, tomilho, canela, cravo e alecrim); enzimas obtidas de animais (lisozima, lactoferrina); bacteriocinas provenientes de bactérias (nisina, natamicina); ácidos orgânicos (propiónico, ácido cítrico, sórbico) e quitosana de ocorrência natural (Lucera et al., 2012).

Os agentes anti-escurecimento atuam na inativação de enzimas, como a polifenoloxidase que está presente em vegetais e frutos, impedindo a formação de quinonas que dão origem a pigmentos castanhos e vermelhos que conferem ao alimento coloração menos atraente para consumidor e diminuem o seu tempo de prateleira. Para inibir o escurecimento enzimático, adicionam-se ácidos e sulfitos durante o processamento dos alimentos (Brannen et al., 2001). Os agentes mais utilizados são os sulfitos, contudo, os ácidos são uma boa alternativa natural, nomeadamente o ácido eritórbito (E315; 5 mg/kg de massa corporal); L-cisteína (E920; *quantum satis*) que é um aminoácido e reage com os intermediários de quinolona que inibem a formação de mais de compostos; alguns ácidos fenólicos e, finalmente, 4-hexilresorcinol (E586; IDA não especificado), específico para a utilização em camarões e crustáceos (EFSA, 2014) .

Os antioxidantes são aditivos que são capazes de inibir ou retardar a oxidação de moléculas por transferência de um átomo de hidrogénio ou de um eletrão (Carocho et al., 2014). As reações de oxidação levam à diminuição da qualidade de um alimento, perda do valor nutricional e das características sensoriais, incluindo alteração da cor, sabor e textura. A reação de oxidação mais comum ocorre nos lipídios, pelo mecanismo denominado lipoxidação ou oxidação lipídica (Soares, 2002; Brannen et al., 2001). Os antioxidantes mais utilizados em quantidade *quantum satis* são ácido ascórbico (E301), ascorbato de cálcio (E302), ésteres acílicos de ácido ascórbico (E304), tocoferóis (E306), α -tocoferol (E307), γ -tocoferol (E308), δ -tocoferol (E309), lecitinas (E322), lactato de sódio (E325), lactato de potássio (E326), lactato de cálcio (E327), ácido cítrico (E330), citrato de sódio (E331), citrato de potássio (E332), citrato de cálcio (E333), ácido tartárico (E334), tartarato de sódio (E335), tartarato de potássio (E336), tartarato de sódio e potássio (E337), malato de sódio (E350), malato de potássio (E351), malato de cálcio (E352), tartarato de cálcio (E354) e citrato de triamónio (E380)(Carocho et al., 2014).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que em baixas concentrações atuam no atraso ou inibição da oxidação dos componentes de uma célula, tais como proteínas, lipídios e hidratos de carbono (Gupta & Sharma, 2006). Este conceito foi estabelecido por Halliwell & Gutteridge (1995). Mais tarde, a definição de antioxidantes foi ampliada para “qualquer substância que retarda, iniba ou impeça danos oxidativos para uma molécula alvo” (Halliwell, 2007). No mesmo ano, os antioxidantes passaram a ser considerados como “qualquer substância que elimina diretamente ROS ou age indiretamente para regular as defesas antioxidantes ou na inibição da produção de ROS (Khlebnikov et al., 2007).

Há duas classes de antioxidantes: a primeira classe engloba as moléculas capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, são enzimas que atuam na remoção de espécies reativas de oxigênio, sendo assim, possuem atividade enzimática. A segunda classe é definida como moléculas sem atividade enzimática que interagem com espécies radicalares e são consumidas durante a reação (Moreira & Mancini-Filho, 2004).

Os antioxidantes são normalmente utilizados para prolongar o tempo de prateleira dos produtos alimentares, impedindo a modificação de características sensoriais ou nutricionais do alimento (Nanditha & Prabhasankar, 2010). As investigações com antioxidantes naturais têm adquirido grande destaque junto da comunidade científica. As suspeitas de que os antioxidantes sintéticos podem ser carcinogênicos têm direcionado os estudos para compostos naturais que apresentem a mesma capacidade. O interesse na substituição de antioxidantes artificiais por naturais é cada vez maior (Carocho et al., 2015; McCarthy et al., 2001; Soares, 2002).

2.2. Antioxidantes sintéticos *versus* naturais

2.2.1. O domínio dos antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos são adicionados aos alimentos com o objetivo de impedir oxidação, em especial, dos ácidos gordos. Atualmente, grande parte dos alimentos processados contém antioxidantes sintéticos incorporados na sua composição (Carocho & Ferreira, 2013). Estes compostos são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, desde moléculas simples até polímeros e biosistemas complexos, através de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que desencadeiam a etapa de iniciação; o segundo envolve a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, tais como os radicais alcóxilo e peróxilo, através

da transferência de átomos de hidrogénio a estas moléculas, interrompendo as reações em cadeia (Soares, 2002).

Os antioxidantes sintéticos BHT (hidroxitolueno butilado) e BHA (hidroxianisol butilado) são os mais utilizados na formulação de alimentos. No entanto, o uso de tais compostos tem sido associado a riscos de saúde resultando em regulamentos estritos sobre a sua utilização em alimentos (Carocho & Ferreira, 2013; McCarthy et al., 2001). O JECFA estabeleceu a ingestão diária aceitável (IDA) para do BHT de 0,3 mg/Kg de massa corporal e de 0,5 mg/Kg de massa corporal para o BHA, em contrapartida, a ESFA, após revisão, considera IDA de 0,25 mg/Kg de massa corporal para o BHT e 1,0 mg/Kg de massa corporal para o BHA (ESFA, 2011; ESFA, 2012).

Ambos o BHT e o BHA são considerados seguros para serem utilizados na produção de alimentos, no entanto, devido à disseminação da sua utilização, é fundamental avaliar com sentido crítico a segurança destas substâncias químicas. Diversos estudos descrevem que o BHA tem conduzido a lesões no estômago de ratos e que o BHT, em doses elevadas, provoca hemorragias internas e externas em suínos. Outros investigadores descrevem um desequilíbrio nas atividades das enzimas hepáticas em ratos, causado pelo consumo de ambos aditivos (Shahidi et al., 1992; Branen, 1975).

O TBHQ (*Terc*-butil-*p*-benzoquinona) é um composto orgânico aromático sintetizado quimicamente, que possui alto poder estabilizante de óleos vegetais insaturados e também é utilizado em algumas gorduras de origem animal e produtos cárneos. O seu uso permitido é de 200 mg/Kg de gordura ou óleo. Em doses elevadas, este composto apresenta alguns efeitos negativos em animais de laboratório, nomeadamente desenvolvimento de carcinoma de estômago e mutações no ADN (EFSA, 2004; Dolatabadi & Kashanian 2010).

Outro antioxidante sintético utilizado no processamento alimentar é o PG (propilgalato), que possui um mecanismo de ação semelhante ao do BHA e BHT. O seu uso está restrito apenas a alguns alimentos. O PG pode ser convertido em ácido gálico, uma substância mais facilmente oxidável, que resulta na formação de espécies reativas de oxigénio, devido ao aumento da atividade redox. O ácido gálico pode ainda ser associado aos efeitos carcinogénicos e citotóxicos do PG (Dolatabadi & Kashanian, 2010).

A etoxiquina (EQ) não é um antioxidante permitido no fabrico de alimentos para humanos, no entanto, é adicionado a alimentos para animais domésticos e de quinta. O

consumo de carne de animais que tenham ingerido esse aditivo pode ser prejudicial à saúde humana, visto que essa substância pode ser carcinogénica (Carocho et al., 2014; EFSA, 2015).

Visto que os antioxidantes sintéticos apresentam dúvidas sobre a sua segurança, já que muitos estudos demonstram o seu potencial mutagénico e carcinogénico em animais de laboratório, é fundamental uma revisão sobre os seus riscos, sendo essencial o desenvolvimento de novas alternativas, nomeadamente antioxidantes naturais, como os flavonoides que atuam na proteção do ADN (McCarthy et al., 2001; Soares, 2002; Dolatabadi & Kashanian, 2010).

2.2.2. A alternativa dos antioxidantes naturais

Devcich e colaboradores (2007) realizaram um estudo com 390 estudantes de medicina de uma universidade da Nova Zelândia com o objetivo de avaliar a preferência alimentar de indivíduos com alto nível de preocupação com a saúde moderna. Como resultado, os autores concluíram que há maior preferência para o consumo de alimentos funcionais com adição de aditivos naturais, visto que este tipo de alimentação ajuda a proteger ou minimizar os problemas de saúde.

Os antioxidantes naturais são compostos extraídos, geralmente, de plantas, cogumelos e algas. São na grande maioria vitaminas, carotenoides e polifenóis. Estes compostos, em baixas concentrações, atuam como captadores de eletrões, no entanto, em concentrações elevadas podem exercer efeitos pró-oxidantes (Frankel, 1989; Carocho & Ferreira, 2013; Carocho et al., 2014).

As vitaminas C e E são os principais antioxidantes naturais utilizados na conservação de alimentos. O ácido ascórbico é vulgarmente utilizado em produtos cárneos, bebidas e pães e uma das suas vantagens é apresentar ação anti-escurecimento, o que evita a formação de quinonas em sumos. A vitamina E é composta por 4 tocoferóis (α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol e δ -tocoferol) e 4 tocotrienóis (α -tocotrienol, β -tocotrienol, γ -tocotrienol e δ -tocotrienol). Atua principalmente na oxidação lipídica e na rancificação. Na indústria alimentar, a utilização conjunta destas duas vitaminas garante uma maior vida útil ao alimento devido ao sinergismo entre ambas (Carocho & Ferreira 2013; Carocho et al. 2014). Jayathilakan e colaboradores (2007) avaliaram a eficiência do ácido ascórbico na inibição da oxidação lipídica em carne de porco, boi e ovelha cozidas e armazenadas sob refrigeração. Os resultados obtidos com a incorporação da vitamina C (500 ppm) na carne foram comparados com o mesmo

alimento com os antioxidantes sintéticos BHT, PG e TBHQ a 0,02%. Neste experimento, o ácido ascórbico apresentou atividades antioxidantes, durante todo período de armazenamento, maiores do que as do BHT e o PG. Os mesmos investigadores analisaram os antioxidantes naturais oriundos de especiarias (cravo-da-índia e canela) e da condensação de açúcares e aminoácidos (MRPs). Estes últimos apresentaram maior atividade antioxidante, seguidos do cravo-da-índia, do ácido ascórbico e da canela.

Os carotenoides são pigmentos naturais, amarelo-avermelhados, presentes em diversos frutos e vegetais. Os mais conhecidos são α -caroteno, β -caroteno e licopeno. Desde há muitos anos que os carotenoides são utilizados como corantes naturais, mas recentemente, a sua atividade antioxidante tem também despertado muito interesse (Carocho & Ferreira, 2013; Carocho et al., 2014).

Os compostos fenólicos e alguns dos seus derivados são eficazes para prevenir a oxidação lipídica (Shahidi et al., 1992). McCathy e colaboradores (2001) estudaram o potencial antioxidante de extratos de plantas e comparam com antioxidantes sintéticos e com a vitamina E, incorporando-os em carne de porco. Utilizaram extratos provenientes de Aloe vera, fenacho, ginseng, mostarda, proteína de soja, alecrim, proteína de leite, e catequinas de chá; os antioxidantes sintéticos usados foram BHA/BHT (0,01%). As catequinas presentes no chá mostraram-se mais eficazes quanto ao seu poder antioxidante, em comparação com o BHA e o BHT (atividade antioxidante avaliada através do ensaio TBARS- espécies reativas do ácido tiobarbitúrico).

Os ácidos fenólicos também têm grande potencial antioxidante. Os ácidos fenólicos presentes em grãos de soja, farinha de soja deslipidificada, concentrado e isolado proteico de soja, apresentaram uma atividade antioxidante significativa (Pratt & Birac, 1979). Mais recentemente, têm sido incorporados em requeijões extratos ricos em ácidos fenólicos, provenientes de plantas (Caleja et al., 2015) e cogumelos (Ribeiro et al., 2015), com o objetivo de lhes conferir potencial antioxidante. Os flavonoides são outra classe de compostos fenólicos com ação antioxidante comprovada e, por essa razão, extratos ricos nestes compostos têm também sido utilizados no desenvolvimento de formulações antioxidantes (Dias et al., 2015).

2.3. Explorando recursos locais como fonte de antioxidantes naturais

2.3.1. O caso particular dos flavan-3-óis

Os flavonoides (**Figura 1**) são compostos fenólicos formados no metabolismo secundário das plantas, caracterizados pela estrutura química C₆-C₃-C₆ fenil benzopirano (Marais et al., 2006).

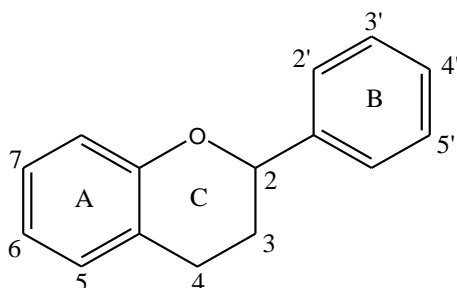


Figura 1. Estrutura base dos flavonoides (2-fenil-benzopirano).

A classe dos flavonoides pode ainda ser subdividida em sete grupos conforme a saturação do anel C heterocíclico e grau de saturação (**Figura 2**).

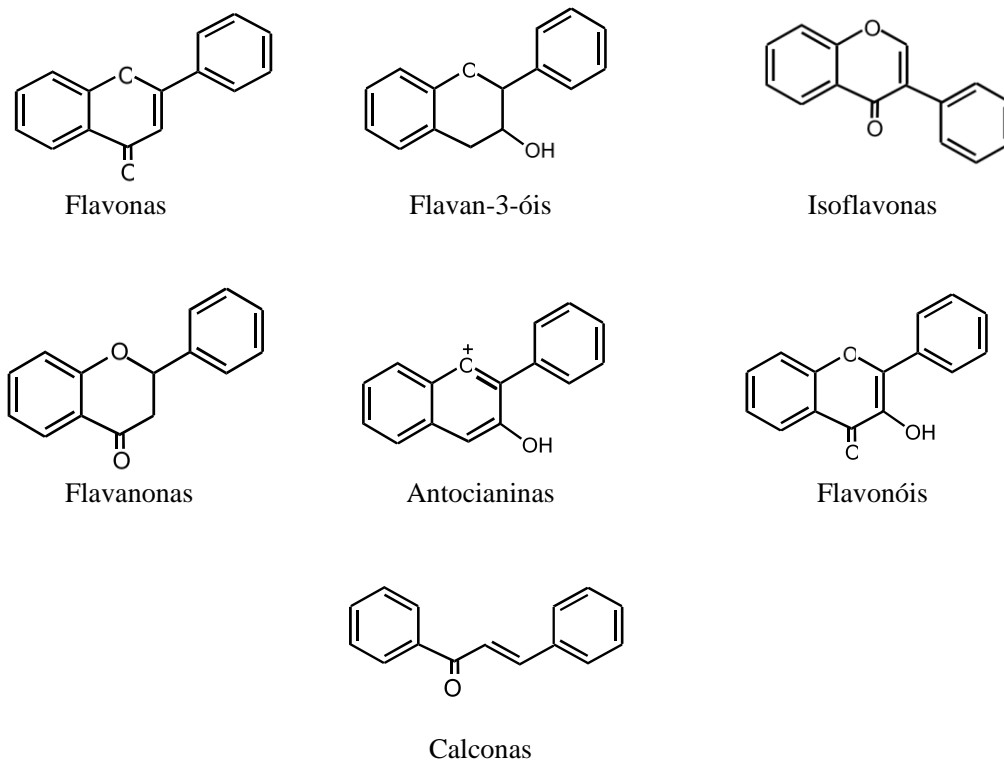


Figura 2. Subclasses dos flavonóides.

O grupo dos flavan-3-óis é o mais comum dos flavonoides presentes na dieta humana, sendo considerados ingredientes funcionais de bebidas, frutas e vegetais (Aron & Kennedy, 2008); no entanto, não são considerados nutrientes, ou seja, são substâncias

sem valor nutritivo (Behling et al., 2004). Os flavanóis são compostos que se apresentam na forma de monómero ou polímero (procianidinas). Os monómeros mais comuns nos vegetais são (epi)alzelequina, (epi)catequina e (epi)galocatequina. As procianidinas são constituídas pelos monómeros referidos. A (epi) catequina é um dos flava-3-óis mais comum e pode ser encontrada em vários tipos de frutos, tal como damasco e uvas, mas o chá verde e o chocolate são os alimentos mais ricos nestas substâncias. Uma infusão de chá verde pode conter cerca de 200 mg de catequina (Manach 2004; Monagas et al., 2003).

O papel biológico do flavan-3-óis nas plantas está relacionado com a autodefesa contra ataques de bactérias, fungos, insetos e animais herbívoros. Estes compostos apresentam também uma poderosa ação antioxidante devido à capacidade de eliminação de radicais livres e a efeitos quelantes de metais de transição. Estas propriedades podem explicar-se pela configuração eletrónica dos flavan-3-óis que permitem uma fácil libertação de eletrões para espécies de radicais livres (Aron & Kennedy, 2008).

Em particular, as catequinas contêm dois ou mais anéis aromáticos e vários grupos hidroxilo. As oito principais catequinas estão divididas em dois grupos: catequinas livres e catequinas esterificadas. No grupo das catequinas livres encontra-se a catequina (C), a galocatequina (GC), a epicatequina (EC) e a epigalocatequina (EGC). Podem também estar esterificadas com ácido gálico, galato de epigalocatequina (EGCG), galato de epicatequina (ECG), galato de galocatequina (GCG) e galato de catequina (CG) (Gadkari & Balaraman, 2015). Têm sido descritas como benéficas para a saúde humana (Lotito & Fraga, 1998; Higdon & Frei, 2003; Nagao et al., 2009; Hirasawa & Takada, 2004).

2.3.2. *Arbutus unedo* L. como fonte de flavan-3-óis

O medronho (*Arbutus unedo* L., Ericaceae.) é uma espécie originária do Mediterrâneo, mas também pode ser encontrada na Pénisula Ibérica, Norte da África. O seu desenvolvimento pode ocorrer em regiões de mato ou rochosas encontradas até aos 1200 m de altitude. Em relação ao clima, o medronho apresenta resistência às condições de geadas e verões quentes, em geral, necessita de luz plena e humidade. Em Portugal, a sua distribuição predominante é na zona sul do país, nas regiões de serra como o caso da Serra do Caldeirão e Algarve, no entanto, a espécie encontra-se difundida em todo o território nacional, abrangendo inclusivamente a região de Trás-os-Montes. O medronheiro (**Figura 3A**) é uma árvore de porte baixo, do tipo arbustivo, que desde o

tempo dos antigos romanos é utilizado como arbusto ornamental. Os frutos apresentam coloração entre amarelo e vermelho (**Figura 3B**) conforme o grau de maturação e diâmetro entre 2-3 cm e, quando maduros, possuem sabor agradável e pode apresentar teor alcoólico de até 0,5 graus. O medronheiro tem a sua primeira frutificação após 4 anos e a maturação dos frutos é atingida completamente no mês de Outubro (Barros et al., 2010; Forum Florestal, 2012; Miguel et al., 2014).

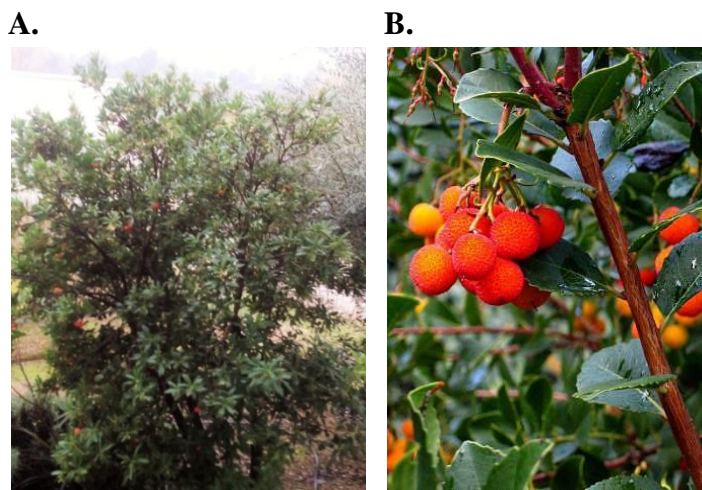


Figura 3: A. Medronheiro. B. Frutos de medronho (A.M. Carvalho).

Os frutos do medronheiro possuem diversas utilizações, sendo apreciados tanto *in natura*, como após processamento. No entanto, a venda do fruto é ainda irrelevante. Em algumas regiões de Portugal, como Algarve, Monchique e Portimão, há um mercado retalhista de grande consumo e de caráter turístico, associado à venda de produtos típicos. Entre os produtos obtidos da transformação dos frutos existe a aguardente que tem sido a mais explorada, especialmente na região de Algarve. Outros produtos comuns elaborados com o fruto são o melaço, compotas e geleias. As folhas são ricas em compostos naturais e bioativos, sendo usadas como antisépticos, laxantes, diuréticos e no tratamento da hipertensão. As folhas, cascas e as madeiras resultantes da exploração da árvore são destinadas a curtumes, combustível para queima e artesanato (Alarcão-E-Silva et al., 2001; Barros et al., 2010; Forum Florestal, 2012; Miguel et al., 2014; Pallauf et al., 2008; Pedro, 1994).

O medronho apresenta excelentes propriedades nutricionais, sendo composto por água, açúcar, proteínas, gordura, ácidos orgânicos (e.g. o ácido ascórbico, vitamina C) e pigmentos (e.g., antocianinas) (Alarcão-E-Silva et al., 2001; Pallauf et al., 2008; Barros

et al., 2010). Nos frutos maduros há mais de 10% de açúcar invertido, ácido málico e pectina. Os frutos têm um sabor farináceo e bastante insonso. Os mais saborosos são os que após a maturação, contêm álcool (até 0,5%) (Pedro, 1994; Forum Florestal, 2012). Os frutos de *A. unedo* podem ainda ser considerados como fonte de mineiras, em especial, cálcio (496-567 mg/100 g) e zinco (0,45-0,76 mg/100 g). Os minerais do fruto de medronho são muito influenciados pelas condições regionais e climáticas (Alarcão-E-Silva et al., 2001; Miguel et al., 2014). Além disso, o fruto tem sido considerado como uma boa fonte de antioxidantes hidrofílicos (flavonoides e vitamina C) e lipofílicos (carotenoides e vitamina E) (Vidrih et al., 2013; Guimarães et al., 2013; Alarcão-E-Silva et al., 2001; Pallauf et al., 2008).

A quantidade de fenólicos totais do fruto de medronho (438-1970 mg equivalentes ácido gálico (EAG)/100 g de fruto fresco) é elevada quando comparada com outros frutos, como por exemplo, mirtilos (670 mg EAG/100 g de fruto fresco) (Ruiz-Rodríguez et al., 2011; Guimarães et al., 2013; Ganhão et al., 2010). O conteúdo total de fenólicos é também influenciado diretamente pelo solvente de extração, assim como a atividade antioxidante e o rendimento de extração (Ganhão et al., 2010; Isbilir et al., 2012).

De facto, o fruto apresenta boa atividade antioxidante devido à quantidade de flavonoides ($\approx 32,4$ mg/100 g de fruto fresco), sendo as procianidinas os compostos mais abundantes (≈ 28 mg/100 g de fruto fresco) que representam mais de 80% dos flavonoides do fruto. Entre as procianidinas presentes no *A. unedo*, o monómero de catequina corresponde a cerca de 15% ($\approx 4,2$ mg/100 g de fruto fresco) (Pallauf et al., 2008; Ganhão et al., 2010). Um outro estudo com frutos oriundos da região de Trás-os-Montes (Portugal) descreve um conteúdo de 37 e 14 mg/100 g de fruto seco de flavan-3-óis e catequina, respetivamente (Guimarães et al., 2013). A concentração de flavonoides nos frutos pode ser influenciada por vários fatores, tais como localização geográfica, clima, estado de maturação, condições do solo, idade da árvore, entre outros (Males et al., 2006).

Em relação à atividade antioxidante dos frutos, Isbilir e colaboradores (2012) concluíram que existe uma variação significativa do poder antioxidante ao longo da maturação do fruto. Os autores avaliaram a capacidade de captação de radicais livres de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH, EC_{50} RF ≈ 297 e 443 $\mu\text{g/mL}$, GF ≈ 243 e 590 $\mu\text{g/mL}$ e YF ≈ 473 e 325 $\mu\text{g/mL}$) e da inibição da descoloração do β -caroteno (EC_{50} RF ≈ 123 e 185 $\mu\text{g/mL}$, GF ≈ 102 e 239 $\mu\text{g/mL}$ e YF ≈ 157 e 317 $\mu\text{g/mL}$) de extratos

metanólicos e etanólicos de medronho, respetivamente. Além disso, neste trabalho os autores concluíram que em todas as fases de maturação os frutos foram capazes de diminuir (RF≈63%, GF≈39% e YF≈33%) a quantidade do radical superóxido, responsável por causar danos a nível celular e no ADN, levando ao aparecimento de diversas doenças.

Guimarães e colaboradores (2014) também associam a elevada capacidade antioxidante (DPPH, $EC_{50} \approx 61 \mu\text{g/mL}$; Poder Redutor, $EC_{50} \approx 37 \mu\text{g/mL}$; Inibição da descoloração do β -caroteno; $EC_{50} \approx 432 \mu\text{g/mL}$) do extrato alcoólico obtido do fruto de *A. unedo* com o teor de flavan-3-óis. Na inibição da peroxidação lipídica através do ensaio das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) o extrato alcoólico do fruto rico em compostos fenólicos, teve uma capacidade de inibição numa concentração ($EC_{50} \approx 7,2 \mu\text{g/mL}$) inferior ao padrão de referência, trolox ($EC_{50} \approx 23 \mu\text{g/mL}$). Os mesmos autores avaliaram também o potencial antitumoral do extrato do fruto em cinco linhas celulares: MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HCT-15 (carcinoma do cólon), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) e concluíram que, além do alto poder antioxidante, o extrato do fruto apresenta também um excelente potencial antitumoral ($GI_{50} \approx 153-38 \mu\text{g/mL}$).

O extrato alcoólico do fruto de *A. unedo* apresenta maior capacidade de inibição de formação de TBARS e de hexanal, quando comparado a outros extratos alcoólicos de outros frutos do Mediterrâneo, como *Rosa canina* L., *Crataegus monogyna* Jacq. e *Prunus spinosa* L. (Ganhão et al., 2010). Os mesmo autores efetuaram um estudo onde incorporaram vários extratos de frutos em hambúrgueres de porco, ficando sob refrigeração (2°C) durante 12 dias. O extrato do fruto de medronho inibiu aproximadamente 80 a 90% da formação de TBARS e de hexanal, respetivamente (Ganhão et al., 2010).

Devido à sua composição em compostos fenólicos (sobretudo flavonoides) e atividades biológicas, o fruto apresenta efeitos benéficos à saúde (Dimitrios, 2006; Heim et al., 2000). Visto que este fruto é uma excelente fonte de flavan-3-óis, nomeadamente catequinas e procianidinas, e sendo estes compostos utilizados em diversas áreas industriais, nomeadamente na indústria nutracêutica (enriquecimento de fármacos/produtos cosméticos) e alimentar (suplementos alimentares, alimentos funcionais e ingredientes alimentares) (Frauen et al., 2002; Gadkari & Balaraman,

2015; Nagao et al., 2009; Wang et al., 2000; Zaveri, 2006) a sua exploração torna-se muito interessante.

Como descrito até agora, este fruto exibe um excelente potencial antioxidante e poderá desempenhar um papel importante na preservação de alimentos, podendo os seus extratos ser aplicados como ingredientes (e potenciais aditivos) alimentares em diversas matrizes tais como carne e produtos lácteos. Para desenvolver ingredientes alimentares existem vários parâmetros que devem ser estudados e otimizados, nomeadamente métodos de extração eficazes para a obtenção do maior rendimento dos compostos bioativos, no caso do *A. unedo* os flavan-3-óis, e as condições que garantam a estabilidade do ingrediente.

2.4. Obtenção de flavan-3-óis a partir de *Arbutus unedo* L.

2.4.1. Otimização dos processos de extração do fruto de *A. unedo*

O processo de extração é uma etapa crucial no isolamento de compostos e na descoberta de novas substâncias funcionais. No entanto, algumas técnicas de extração possuem inúmeras desvantagens, visto que podem requerer longos tempos de extração e demasiada quantidade de solvente, podendo ainda causar, devido ao binómio tempo e temperatura, a degradação de alguns compostos fenólicos (Alonso-Salces et al., 2001; Dai & Mumper, 2010; Ince et al., 2013). A **Tabela 1** descreve algumas técnicas associadas às variáveis de extração aplicadas por alguns autores para a obtenção de catequina a partir de diferentes fontes naturais.

Tabela 1: Diferentes técnicas e condições para a extração de catequina a partir de diversas fontes.

TÉCNICA APLICADA	FONTE	PARTE	CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO					CATEQUINA (mg/g ms)	REFERÊNCIAS
			Solvente	Temp. (°C)	Potencia ou Freqüência (kHz or W)	pH	Tempo (min)		
EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSONS	Maçã	Polpa	Água	40	25 kHz	-	45 a 90	0,030 a 0,075	(Mieszczakowska-Fraç et al., 2015)
	Maçã	Bagaco	Água	40	150 W	3,8	40	0,15	(Pingret et al., 2012)
	Caril	Folhas	Metanol:Água (80:20)	56	145 W	-	20	0,48	(Ghasemzadeh et al., 2014)
	Uva	Sementes	Metanol:Água(75:25)	-	-	-	15	0,41	(García-Marino et al, 2006)
	Uva	Sementes	Metanol	60	-	-	10	0,23	(Piñeiro et al, 2004)
	Uva	Sementes	Metanol:Água(10:90)	30	-	-	30x2	0,65	(Palma & Taylor, 1999)
	Pinheiro bravo	Planta	Água	40	-	3,8	43	3,50	(Meullemiestre et al., 2016)
	Melissa	Folhas	Água	-	150 W	-	20	2,01	(Ince et al., 2013)
	Cogumelo		Etanol:Água (60:40)	25	-	-	30	0,10	(Zhang et al., 2012)
	Pistácio	Castanha	Água	-	35 kHz	-	30	0,050	(Garavand et al., 2015)
	Morango	Fruta	Acetona	-	100 W	<3	0.5x3	0,015	(Herrera & Luque De Castro, 2004)
EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MACERAÇÃO	Maçã	Polpa	Água	40	-	-	45 a 90	0,040 a 0,050	(Mieszczakowska-Fraç et al., 2015)
	Maçã	Bagaco	Água	40	-	3,8	40	0,11	(Pingret et al., 2012)
	<i>Folium eriobotryae</i>	Fruta	Metanol	-	700 W	-	3	12,10	(Chen, Zhang & Chen, 2008)
	Uva	Sementes	Metanol:Água (4:1)	30	-	-	960	0,70	(Palma & Taylor, 1999)
	Chá verde	Folhas	Água	25 a 80	-	<6	30 a 120	0,60 a 7,10	(Vuong et al., 2011)
	Melissa	Folhas	Água	40	-	-	1440	3,45	(Ince et al., 2013)
	Cogumelo		Etanol:Água (60:40)	25	-	-	720	0,10	(Zhang et al., 2012)
EXTRAÇÃO POR REFLUXO AQUECIDO	<i>F. eriobotryae</i>	Fruta	Metanol	80	-	-	3	7,34	(Chen et al., 2008)
	Alecrim	Planta	Metanol:Água (60:40)	90	-	-	120	0,019	(Proestos & Komaitis, 2008)
	Cogumelo		Etanol:Água (60:40)	90	-	-	50	0,10	(Zhang et al., 2012)
EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS	Alecrim	Planta	Metanol:Água (60:40)	-	750 W	-	4	0,025	(Proestos & Komaitis, 2008)
	Pistácio	Noz	Água	-	800 W	-	0,5	0,047	(Garavand et al., 2015)
	Melissa	Folhas	Água	-	407 W	-	5	1,35	(Ince et al., 2013)
	Cogumelo		Etanol:Água (60:40)	110	500 W	-	10	0,11	(Zhang et al., 2012)
EXTRAÇÃO POR LIQUIDO PRESSURIZADO	Maça	Pele	Metanol	40	-	-	5	0,043	(Alonso-Salces et al., 2001)
	Maça	Polpa	Metanol	40	-	-	5	0,018	(Alonso-Salces et al., 2001)
	Uva	Sementes	Metanol	130	-	-	10	1,82	(Piñeiro et al., 2004)
EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA	Uva	Sementes	Metanol:Água (10:90)	55	-	-	60	0,87	(Palma & Taylor, 1999)
EXTRAÇÃO SUBCRÍTICA	Uva	Sementes	Água	50 a 150	-	-	30	0,14 a 0,47	(García-Marino et al., 2006)

No que se refere ao solvente extrator, sendo as catequinas compostos polares, são solubilizadas em solventes orgânicos polares, como a água, etanol, metanol e acetona (Gadkari & Balaraman, 2015). O rendimento de extração, o conteúdo total de fenólicos e a atividade antioxidante são influenciados diretamente pelo solvente de extração, (Ganhão et al., 2010; Isbilir et al., 2012).

Dos métodos de extração de compostos fenólicos, a maceração (ME) é vista como um método tradicional amplamente utilizado. Este processo consiste basicamente na agitação da amostra analítica no solvente extrator por um determinado período de tempo e numa temperatura apropriada. O processo é simples, mas pode requerer tempos relativamente longos e temperaturas elevadas. A fim de contornar estas desvantagens do método tradicional, são utilizados outros métodos de extração nomeadamente, a extração assistida por micro-ondas e ultrassons (Ghasemzadeh et al., 2014; Zhang et al., 2012).

A extração assistida por micro-ondas (MAE) é um processo que facilita a partição das partículas da amostra, reduzindo o tempo de extração e evitando altas temperaturas e grande quantidade de solventes. Esta técnica tem sido utilizada na extração de compostos medicinais de plantas (Chen et al., 2008; Dai & Mumper, 2010; Proestos & Komaitis, 2008).

A extração assistida por ultrassons (UAE) tem sido largamente utilizada na indústria química e alimentar. Esta técnica é mais vantajosa por ser mais rápida do que a convencional, consumindo menos energia e permitindo a redução do volume de solvente, logo, pode ser considerada mais limpa e conduzindo a maior rendimento. Tais vantagens são obtidas pelo efeito de cavitação que é responsável pela ruptura das células vegetais, aumentando desta forma a área de contacto entre o sólido e o solvente (Herrera & Luque De Castro, 2004; Ghasemzadeh et al., 2014; Zhang et al., 2012).

Todos os processos de extração dependem de várias variáveis que não podem ser generalizadas para todas as plantas, devido às diferenças na composição de cada matriz vegetal e o composto alvo em questão. Portanto, é necessário a realização de uma otimização das diferentes variáveis, para a determinação das melhores condições de extração de forma a reduzir os gastos de solventes, consumos energéticos e degradação dos compostos de interesse. Com o processo de extração otimizado, a passagem de uma escala laboratorial para uma escala industrial é mais facilmente atingida.

Tradicionalmente, a otimização de extrações era efetuada através da monitorização da influência de uma variável de cada vez. No entanto, atualmente, a otimização tem sido usada para avaliar simultaneamente múltiplas variáveis, associando e avaliando o efeito da interação de vários fatores fornecendo uma resposta mais eficiente do que a análise individual das variáveis. Além disso, a análise de multivariáveis tem como vantagem a redução de ensaios, reduzindo o consumo de reagentes e tempo. A análise de superfície de resposta é uma das técnicas mais relevantes no estudo de multivariáveis. Essa ferramenta consiste na obtenção de equações matemáticas polinomiais que descreve o comportamento das várias interações, prevendo a melhor resposta de condições para o sistema analisado (Bezerra et al., 2008; Ferreira et al., 2007; Kalil & Maugeri, 2000).

2.4.2. Fatores que podem afetar a estabilidade de flavan-3-óis

Os flavonoides, em especial os flavan-3-óis, estão presentes em diversas partes das plantas (e.g. frutos) que, por sua vez, apresentam composições químicas muito distintas. Este fator limita a extrapolação das condições de estabilidade destes compostos entre matrizes. Além disso, a variação da concentração de outros compostos também poderá influenciar a estabilidade dos flavonoides, dependendo também da variedade da planta, grau de maturação e composição em gordura, proteína e hidratos de carbono (Aron & Kennedy, 2008).

Os flavonoides são compostos fenólicos facilmente degradados em solução ou por fatores ambientais. O pH das soluções é visto como um dos fatores que pode atuar como catalisador da degradação. Além do pH, outros fatores de forma associada ou não, determinam os efeitos sobre os flavan-3-óis durante o processamento alimentar e o período de armazenamento (Zhu et al., 1997; Aron & Kennedy, 2008). No caso dos flavonoides presentes no chá verde, nomeadamente as catequinas, a instabilidade em solução ocorre de forma acentuada em pHs entre 7,4 – 8,0, podendo degradar completamente algumas catequinas em poucos minutos, enquanto a pHs ácidos <4, os compostos são estáveis por mais de 18h (Zhu et al., 1997). Por outro lado, as catequinas, especificamente (-)-epicatequina e (+)-catequina, provenientes de cacau apresentaram estabilidade a pH 2 – 4, que decresce com a diminuição do pH. Observa-se também uma instabilidade destes compostos a pH superior a 7,4 (Zhu et al., 2002).

A luz, especialmente a luz ultravioleta e visível, desempenha um papel importante em reações de oxidação, o que resulta em várias degradações de compostos e na perda de qualidade dos alimentos. Um fator pouco estudado é o efeito das irradiações UV sobre

as moléculas bioativas que podem estar presentes num alimento que receba esse tipo de irradiação, a fim de eliminar microrganismos presentes. A catequina pura, quando submetida a irradiação UV, degrada-se em 80% após 3h. No entanto, este cenário não pode ser diretamente extrapolado a extratos com catequina. Volf e colaboradores (2014), estudaram a influência da irradiação UV num extrato obtido de sementes de uvas e observaram uma degradação de apenas 40% de catequina no mesmo período de irradiação (3h). Portanto, o comportamento da catequina à irradiação UV não pode ser estipulado como sendo global para todas as fontes.

Maiores teores de flavan-3-óis são geralmente observados em frutos frescos do que em frutos desidratados, no entanto, os extratos em pó são amplamente utilizados na indústria alimentar, pela sua maior facilidade de reconstituição, maior tempo de prateleira e o processo de distribuição e venda facilitados (Li et al., 2011; Aron & Kennedy, 2008). A estabilidade de uma matriz em pó é altamente afetada pela presença de humidade, sendo esta variável a que desempenha um papel mais importante para a determinação do tempo de prateleira de um produto. A interação da humidade relativa (HR) com a temperatura potencia os efeitos da degradação ao longo do tempo, visto que o pó tende a absorver a água do ambiente para estabelecer o equilíbrio e, a temperatura, neste caso, é o fator determinante para a taxa de absorção. Num estudo realizado com o pó do extrato de chá verde rico em catequinas, observou-se que à temperatura ambiente de armazenamento (25 -35°C) e HR entre 43-58% as catequinas eram preservadas até 112 dias, porém o aumento da temperatura e da HR (60 °C e 91%, respetivamente) aceleraram o processo de degradação destes compostos (tempo de vida < 1 dia); assim, de um modo geral, a velocidade da reação de degradação é aumentada com a HR (Li et al., 2011).

Além dos fatores ambientais, como a presença de luz, humidade e temperatura, a integridade dos compostos depende também das características do meio onde são aplicados, com por exemplo pH, presença de enzimas e de componentes de possam interagir com esses compostos. Uma barreira para os fatores ambientais e intrínsecos que atuam sobre a integridade dos compostos, é a aplicação de revestimentos nos bioativos, nomeadamente a encapsulação. Estes revestimentos, para garantirem uma cobertura eficaz, são formados a partir de complexos obtidos de matrizes alimentares, sendo os polissacáridos, como o amido e seus derivados, os mais utilizados. Os revestimentos também podem ser obtidos através de extratos de plantas, como a goma arábica e a pectina. Proteínas derivadas do leite também podem ser aplicadas para esse

fim auxiliando a formação de emulsões na encapsulação (Gadkari & Balaraman, 2015; Tobergte & Curtis, 2013).

De um modo geral, a nano ou microencapsulação são utilizadas para proteger os compostos bioativos presentes nos extratos naturais enriquecidos com estes compostos. Esta técnica tem sido útil para evitar interações adversas e melhorar a estabilidade de moléculas altamente reativas em matrizes alimentares. Como resultado, podem preservar os compostos bioativos durante o processamento, armazenamento e transporte de produto (Tobergte & Curtis, 2013).

2.5. OBJETIVOS

Arbutus unedo L., conhecido como medronho, pertence à família Ericaceae, sendo uma espécie nativa do Mediterrâneo e difundida em Portugal (Pedro 1994). Os seus frutos são considerados uma excelente fonte de flavan-3-óis, incluindo catequinas e procianidinas (Barros et al. 2010; Guimarães et al., 2013). Os flavan-3-óis, sobretudo as catequinas, são compostos que têm sido amplamente usados em todo mundo pelo seu potencial nutracêutico, enriquecendo produtos farmacêuticos/cosméticos, suplementos alimentares e alimentos funcionais (Shakar et al., 2008; Frauen et al., 2002; Wang et al., 2000; Zaveri, 2006; Nagao et al., 2009).

Tendo em vista a viabilidade de produção de extratos de medronho ricos em flavan-3-óis para aplicação com aditivos alimentares, este trabalho teve como principais objetivos:

- Otimizar a extração de catequina a partir de medronho recorrendo a diferentes técnicas de extração: extração por maceração (ME), extração assistida por micro-ondas (MAE) e extração assistida por ultrassons (UAE).
- Obter extratos enriquecidos em flavan-3-óis.
- Avaliar a estabilidade dos extratos obtidos na forma liofilizada em diferentes tempos (0, 10, 20 e 30 dias), temperaturas (-20, 5, 25 e 45°C) e pH (2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9) de armazenamento. Além disso, avaliar os efeitos do armazenamento na atividade antioxidante dos extratos nestas condições.
- Avaliar a estabilidade dos extratos obtidos em solução aquosa (simulando um ambiente alimentar) durante diferentes tempos (1, 3, 5, 12 e 24 h), temperaturas (25, 40, 55 70 e 85°C) e pH (3,5, 7 e 9).

Para atingir os objetos propostos o presente trabalho dividiu-se em três etapas:

- 1) Otimização do processo de obtenção de extratos enriquecidos em catequina a partir de frutos de *A. unedo*.
- 2) Estudo da estabilidade dos extratos obtidos na forma liofilizada em diferentes condições de armazenamento.
- 3) Estudo da estabilidade dos extratos obtidos em solução aquosa (simulando a aplicação em alimentos).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Padrões e reagentes

O solvente acetonitrilo de grau de pureza HPLC foi adquirido na Fisher Scientific (Lisboa, Portugal). O padrão de catequina foi adquirido na Extrasynthese (Genay Cedex, França). O 2,2-difinil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, Massachusetts, EUA). O trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcrom-2-carboxílico) e o ácido fórmico foram adquiridos na Sigma (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros agentes químicos utilizados eram de pureza analítica e foram adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A água utilizada foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water System, Greenville, Carolina do Sul, EUA).

3.2. Obtenção dos frutos de *Arbutus unedo* L.

Os frutos de *Arbutus unedo* L. (medronho) foram colhidos no território do Parque Natural de Montesinho, em Trás-os-Montes, Nordeste de Portugal. A identificação botânica foi confirmada pela botânica, Dra. Ana Maria Carvalho da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança (Trás-os-Montes, Portugal), de acordo com o procedimento descrito por Guimarães et al. (2013). Os frutos foram liofilizados (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA) e armazenados no congelador a -20°C.

3.3. Identificação e quantificação de flavan-3-óis

Os flavan-3-óis foram analisadas usando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) com uma bomba quarternária e um detetor de díodos (DAD) acoplado a um sistema de tratamento de dados (software LC solução). A separação foi realizada utilizando uma coluna termostaticada Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 µm, 4.6 mm × 150 mm) a 35°C. Os eluentes foram uma solução de ácido fórmico 0,1 % (A) e acetonitrilo (B). O gradiente de eluição foi: modo isocrático 15% de B durante 5 min, 15-20% de B durante 5 min, 20-25% de B durante 10 min, 25-35% de B durante 10 min, 35-50 % de B durante 10 min e reequilíbrio da coluna. O fluxo foi de 0,5 mL/min. A detecção foi efetuada por DAD utilizando 280 nm como comprimento de onda. A catequina presente nas amostras foi identificada pela comparação dos seus espectros UV e tempos de retenção com os do padrão de catequina comercial. Os outros flavan-3-óis foram identificados utilizando dados publicados

anteriormente em frutos de *A. unedo* (Guimarães et al. 2013). A análise quantitativa foi realizada usando uma curva de calibração de catequina ($Y=66243x-343411$; $R^2=0,999$).

3.4. Otimização do processo de extração de catequina a partir de frutos de *Arbutus unedo* L.

Posteriormente a vários estudos preliminares com variáveis individuais, a experiências prévias de extração no nosso laboratório e recorrendo a material bibliográfico, selecionaram-se as variáveis relevantes e a gama apropriada a testar para cada técnica de extração. Na **Tabela 2** apresenta-se uma descrição detalhada do estudo das variáveis selecionadas para a obtenção dos pontos ótimos de cada técnica.

Tabela 2: Delineamento experimental e codificação das variáveis independentes na geração fatorial.

VALORES CODIFICADOS	VALORES NATURAIS								
	MACERAÇÃO			MICRO-ONDAS			ULTRASSONS		
	<i>t</i> (min)	<i>T</i> (°C)	<i>Et</i> (%)	<i>t</i> (min)	<i>T</i> (°C)	<i>Et</i> (%)	<i>t</i> (min)	<i>P</i> (W)	<i>Et</i> (%)
A) DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL CIRCUNSCRITO (DCCC)									
-1,68	19,6	21,4	0	1,6	51,4	0	4,7	100	0
-1	40	35	20,2	5	65	20,2	15	160	20,2
0	70	55	50	10	85	50	30	250	50
+1	100	75	79,8	15	105	79,8	45	340	79,8
+1,68	120,4	88,6	100	18,4	118,6	100	55,3	400	100
B) DELINEAMENTO FATORIAL COMPLETO (DFC)									
-1	50	65	--	25	125	--	--	--	--
0	100	75	--	35	135	--	--	--	--
+1	150	85	--	45	145	--	--	--	--

3.4.1. Extração por maceração (ME)

A amostra de fruto liofilizado e em pó (1 g) foi colocada num frasco juntamente com o solvente (30 mL) na razão apropriada (30 g/L). O frasco, vedado com tampa, foi colocado num banho de água com termostato para o controlo da temperatura e sob agitação eletromagnética contínua durante o período de tempo necessário. As variáveis e os intervalos testados foram tempo (*t* ou X_1 , 20 a 150 minutos), temperatura (*T* ou X_2 , 20 a 90°C) e proporção do solvente (etanol) (*S* ou X_3 , 0 a 100%).

3.4.2. Extração assistida por micro-ondas (MAE)

O processo de MAE foi realizado utilizando um Micro-ondas Biotage Iniciador (Biotage® Iniciador⁺, Uppsala, Suécia) usando um recipiente fechado. As amostras

lioofilizadas em pó (0,6 g) foram extraídas com 20 mL de volume de solvente. No sistema de micro-ondas a pressão e T são correlacionadas e a potência aplicada é iniciada ao t necessário para alcançar a T ou pressão selecionada. Em consequência, T foi selecionada como a principal variável controlada e a potência do micro-ondas foi ajustada para 400 W sem controle da pressão, um cenário que garante que o t para alcançar a T selecionada é mínimo (menos de 20 s para a mais alta T utilizada). A fim de manter T constante, a potência não foi aplicada constantemente ao longo do ensaio. Portanto, as variáveis finais e intervalos testados foram t (X_1 , 1,6 a 45 min), T (X_2 , 50 a 145°C) e S (X_3 , 0 a 100%).

3.4.3. Extração assistida por ultrassons (UAE)

A UAE foi conduzida num dispositivo de ultrassons (QSonica sonicators, modelo CI-334, Newtown, CT, EUA), equipado com um temporizador digital e um controlador de temperatura. Em sistemas de ultrassons a potência (P) aplicada e t aumentam a T . Esta relação é controlada mantendo-se constante a T e mudando as outras variáveis. Portanto, as amostras liofilizadas em pó (1,5 g) foram extraídas com 50 mL em diferentes tempos (t ou X_1 , 5 a 55 min), intervalos de potência (P ou X_2 , 100 a 400 W) e segundo cada proporção de solvente (S ou X_3 , 0 a 100%).

3.5. Purificação e obtenção de extratos enriquecidos em catequinas (EEC)

Os extratos obtidos foram filtrados num papel Whatman nº4 logo após a extração. O filtrado foi evaporado a 40°C (evaporador rotativo Büchi R-12) para a remoção do solvente. Para a purificação em coluna simples, a fase aquosa restante foi depositada numa coluna de fase sólida C-18 SepPark® Vac 3 cc, previamente ativada com etanol seguido por água. Os açúcares e outras substâncias mais polares foram removidas com a adição de 5 mL de água e o extrato purificado foi eluído com 5 mL de etanol. O extrato purificado foi evaporado a 40°C para remoção do etanol. Posteriormente, os extratos enriquecidos em catequina obtidos foram analisados e quantificados por HPLC-DAD como descrito na secção 3.3 acima. Os resultados foram expressos em mg de catequina por g de massa seca de fruto (ms).

3.6. Estudos de estabilidade dos extratos enriquecidos em catequinas (EEC)

O diagrama apresentado na **Figura 4** descreve resumidamente o processo de obtenção dos extratos enriquecidos em catequinas e as etapas realizadas para estudar a sua estabilidade em pó e em solução aquosa, em diferentes condições de armazenamento.

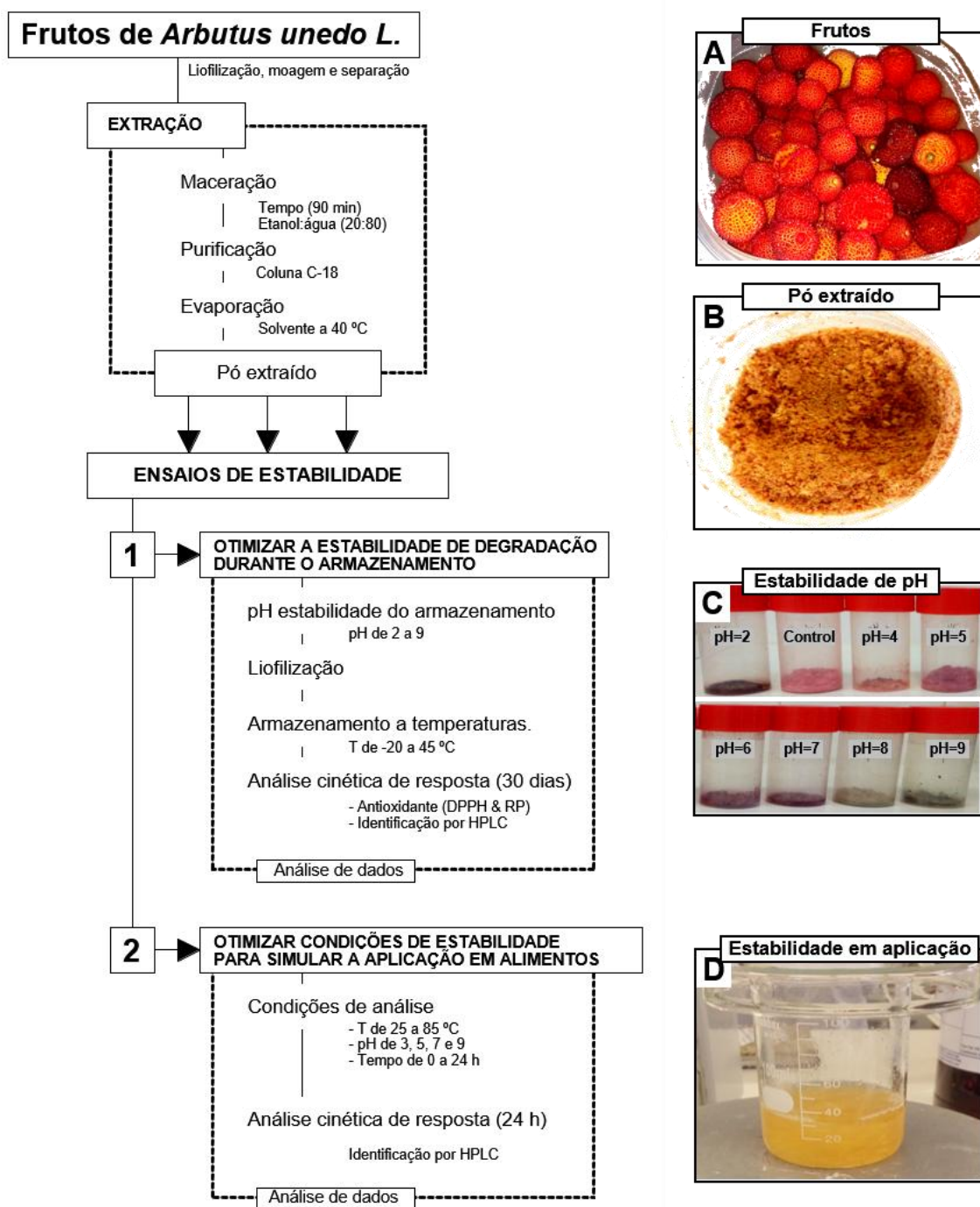


Figura 4: Processo de extração e obtenção dos extratos enriquecidos em catequinas e dois testes de estabilidade realizados: (1) a estabilidade dos extratos em sistema em pó de acordo com as principais condições que afetam o armazenamento; e (2) a estabilidade dos extratos em sistemas de solução aquosa, considerando a seu potencial para a aplicação em matrizes alimentares.

3.6.1. Preparação do extrato otimizado enriquecido em catequinas

Cada amostra (1 g) foi extraída com 30 mL de etanol:água 20:80 (v/v) a 80°C com agitação a 150 rpm por 90 min. O extrato foi filtrado em papel filtro Whatman nº4 e evaporado a 40°C para remoção do etanol. Posteriormente, efetuou-se a sua purificação utilizando a metodologia descrita acima na secção 3.5.

3.6.2. Estabilidade do EEC em pó

O extrato purificado (5 mg) foi dissolvido em 5 mL de água destilada (controle; *pH* 3) e os valores dos diferentes *pH* foram ajustados para 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 com soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio. Os extratos em diferentes *pHs*, incluindo o controle), foram liofilizados e armazenados em Eppendorfs (5 mg de cada extrato liofilizado) a temperaturas de -20, 5, 25 e 45°C por um período de 0, 10, 20 e 30 dias. No final de cada período de armazenamento, as amostras foram colocadas a -80°C até às análises subsequentes. Um total de 104 pontos experimentais (4*t* x 3*T* x 8*pH*, mais 8 amostra de diferentes *pH* de tempo zero), apresentados na **Tabela 3**, foram usados para entender as interferências das condições sobre a estabilidade do EEC seco. Como resposta, os extratos liofilizados de cada condição foram analisados em termos de flavan-3-óis (incluindo a catequina) (os resultados foram expressos em mg de catequina por g de extrato e mg de flavan-3-óis (catequina e procianidinas) por g de extrato) e de atividade antioxidante (ensaio de DPPH e poder redutor) do extrato (ver secção 3.6.4.).

Tabela 3: Delineamento experimental para a análise da estabilidade durante o armazenamento EEC em pH a diferentes *pHs*.

TEMPERATURA	pH	TEMPO (dias)		
		10	20	30
-20°C	2	P9	P41	P73
	3 ^c	P10	P42	P74
	4	P11	P43	P75
	5	P12	P44	P76
	6	P13	P45	P77
	7	P14	P46	P78
	8	P15	P47	P79
	9	P16	P48	P80
5°C	2	P17	P49	P81
	3 ^c	P18	P50	P82
	4	P19	P51	P83
	5	P20	P52	P84
	6	P21	P53	P85
	7	P22	P54	P86
	8	P23	P55	P87
	9	P24	P56	P88
25°C	2	P25	P57	P89
	3 ^c	P26	P58	P90
	4	P27	P59	P91
	5	P28	P60	P92
	6	P29	P61	P93
	7	P30	P62	P94
	8	P31	P63	P95
	9	P32	P64	P96
45°C	2	P33	P65	P97
	3 ^c	P34	P66	P98
	4	P35	P67	P99
	5	P36	P68	P100
	6	P37	P69	P101
	7	P38	P70	P102
	8	P39	P71	P103
	9	P40	P72	P104

P1-P8: amostras correspondentes ao tempo 0 dias (análise efetuada logo após a obtenção do extrato) com os diferentes valores de *pH*.
c: amostras sem modificação do *pH*.

3.6.3. Estabilidade do EEC em solução aquosa simulando matrizes alimentares

O extrato purificado (1 g) foi dissolvido em água destilada (30 mL). Para o ensaio, cada 1,5 mL dessa solução foi vertido num vial âmbar e o *pH* foi ajustado com a adição de 0,5 mL de solução tampão Britton-Robinson de *pH* 3, 5, 7 e 9. As amostras foram depositadas em banhos às temperaturas de 25, 40, 55, 70 e 85°C por 1, 3, 5, 12 e 24h. No final de cada período as amostras foram armazenadas e mantidas a -80°C até às análises subsequentes. Um total de 100 pontos experimentais (5t x 5T x 4pH), apresentados na **Tabela 4**, foram usados para conduzir o estudo das interferências das

condições sobre a estabilidade do extrato rico em catequina. Como resposta, os extratos secos de cada condição foram analisados em termos de flavan-3-óis (incluído a catequina).

Tabela 4: Delineamento experimental para análise da estabilidade do EEC a diferentes *pHs* em sistema aquoso .

TEMPETURA	pH	TEMPO				
		1h	3h	5h	12h	24h
25°C	3	P1	P21	P41	P61	P81
	5	P2	P22	P42	P62	P82
	7	P3	P23	P43	P63	P83
	9	P4	P24	P44	P64	P84
40°C	3	P5	P25	P45	P65	P85
	5	P6	P26	P46	P66	P86
	7	P7	P27	P47	P67	P87
	9	P8	P28	P48	P68	P88
55°C	3	P9	P29	P49	P69	P89
	5	P10	P30	P50	P70	P90
	7	P11	P31	P51	P71	P91
	9	P12	P32	P52	P72	P92
70°C	3	P13	P33	P53	P73	P93
	5	P14	P34	P54	P74	P94
	7	P15	P35	P55	P75	P95
	9	P16	P36	P56	P76	P96
85°C	3	P17	P37	P57	P77	P97
	5	P18	P38	P58	P78	P98
	7	P19	P39	P59	P79	P99
	9	P20	P40	P60	P80	P100

3.6.4. Atividade antioxidante dos EEC no estudo de estabilidade em pó

3.6.4.1 Atividade captadora de radicais livres DPPH

Todas as diferentes diluições das amostras, previamente preparadas (30 µL), foram misturadas com uma solução metanólica (270 µL) contendo os radicais livres DPPH (6×10^{-5} mol/L). A reação ocorreu durante 60 min no escuro. Em seguida, a redução dos radicais livres DPPH foi determinada pela medida de absorvância num comprimento de onda de 515 nm utilizando um leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc.) (Pinela et al. 2012). Utilizou-se trolox como padrão. A dose-resposta dos valores de ponto final assintótico das soluções foi calculada pelo modelo de Weibull (Prieto et al., 2015), com a seguinte equação:

$$DPPH^*(A) = N \exp \left[-(\ln 2)^{1-\alpha} \left(\frac{2v_m A}{N\alpha} \right)^\alpha \right] \quad [1]$$

em que A é a capacidade antioxidante. O parâmetro N é o início do valor de radicais livres DPPH (30 nM). O parâmetro α está relacionado com a inclinação máxima de resposta. O parâmetro v_m corresponde ao número médio de moléculas de DPPH reduzidas por grama de extrato enriquecido em catequina (nM DPPH/g), que é um valor de previsibilidade máxima e, por conseguinte, foi utilizado como resposta.

3.6.4.2 Poder redutor

O ensaio de poder redutor avalia a capacidade da amostra converter Fe^{3+} em Fe^{2+} , o qual reage com cloreto férrico para formar um complexo férrico ferroso que é monitorizado espectrofotometricamente. As concentrações das diferentes soluções (0,5 mL) foram misturadas com tampão de fosfato de sódio (200 mM, pH 6,6, 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1% v/v, 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50°C durante 20 min e, em seguida, foi adicionado o ácido tricloroacético (10% v/v, 0,5 mL). A mistura (0,8 mL) foi depositada nos 48 poços juntamente com água desionizada (0,8 mL) e cloreto férrico (0,1% v/v, 0,16 mL); a absorvância foi medida a 690 nm utilizando o Leitor de Microplacas anteriormente descrito. Utilizou-se trolox como padrão. Os resultados de dose-resposta mostrou uma relação linear e a seguinte equação linear, sem interceptar foi usada para calcular o número médio de moléculas reduzidas:

$$PR(A) = mA \quad [2]$$

em que A é a dose antioxidante. O parâmetro de inclinação m é o valor médio do número de moléculas que são reduzidas por grama de EEC (nM Fe^{2+} /g) e é usada para calcular o potencial de atividade antioxidante dos extratos.

3.7. Modelos matemáticos aplicados à otimização da extração: Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

3.7.1. Delineamento experimental

Para cada técnica de extração foram selecionadas três variáveis como as mais relevantes. Essas variáveis foram estudadas em conjunto com os critérios estruturados de modelo experimental (Box et al., 1957), utilizando a metodologia de superfície de resposta. Inicialmente, três variáveis de cada técnica foram aplicadas a MSR para otimizar as condições de extração. Se em qualquer uma das três variáveis, o intervalo

experimental testado falhou em proporcionar um ótimo global, obtendo-se apenas uma ótima relação dentro do intervalo testado, houve outra geração MSR envolvendo a variável que não foi resolvida combinada com a outra variável importante do sistema de extração de forma complementar às duas variáveis. Portanto, para os cenários complexos, os dois diferentes modelos experimentais utilizados para a otimização das condições de extração de cada técnica foram os seguintes:

- a) Para a análise das três variáveis (X_{1-3}): foi utilizado um delineamento composto central circunscrito (DCCC). Neste desenho os pontos experimentais são gerados sobre uma esfera em torno do ponto central. Este projeto requer 5 níveis de cada fator e 3 repetições por coordenadas.
- b) Para a análise de duas variáveis (X_{1-2}): Foi utilizado um delineamento fatorial completo (DFC), com três repetições por condição. A estrutura de um DFC implica que para todas as combinações de três valores cada um dos fatores são estudadas (mínimo, média e máximo).

Para ambos os modelos de MSR, o ponto de centro é assumido como um valor próximo para a posição ótima para a resposta e é repetido, de modo a maximizar a precisão de previsão (Box & Hunter, 2005). Os ensaios experimentais foram distribuídos aleatoriamente para minimizar os efeitos inesperados da variabilidade nas respostas observadas.

3.7.2. Cálculo dos valores naturais e codificados

A seguir, apresenta-se uma descrição das expressões matemáticas para calcular a distribuição do delineamento e para descodificar e codificar os intervalos das variáveis testadas (apresentada na **Tabela 2**) encontradas para o *delineamento fatorial completo* (DFC) e para o *delineamento composto central circunscrito* (DCCC):

1) Para o DFC:

O número de ensaios n para k fatores é dado como $n=3^k$. As variáveis são codificadas de acordo com a seguinte equação:

$$X = (x_a - x_0) / \Delta x \quad [3]$$

onde X é o valor do código para a variável, x_a é o valor correspondente atual, x_0 é o valor atual no centro do domínio, e Δx é o incremento de x_a que corresponde a uma variação de uma unidade de X .

2) Para o DCCC:

O número de repetições n_0 do ponto central é calculado pela seguinte formula para k fatores com base na precisão uniforme:

$$\gamma = \frac{(k+3) + \sqrt{9k^2 + 14k - 7}}{4(k+2)}; \quad \text{onde: } n_0 = \text{floor}\left(\gamma\left(\sqrt{2^k} + 2\right)^2 - 2^k - 2k\right) \quad [4]$$

onde *floor* designa o maior valor inteiro menor do que o argumento. O número de experiências para n fatores k é dada como:

$$n = 2^k + 2k + 1 \quad [5]$$

Os valores codificados das variáveis independentes e os naturais da DCCC são codificados e decodificados pelos seguintes expressões:

$$v_c = (v_n - v_0) / \Delta v_n \quad \text{e} \quad v_n = v_0 + \Delta v_n \times v_c \quad [6]$$

onde v_n e v_c são valores natural (n) e o codificado (c) no centro do domínio experimental, v_0 é o valor inicial Δv_n é o incremento de v_n por unidade de v_c .

3.7.3. Modelação matemática

Independentemente da MSR utilizada (três ou duas variáveis) o modelo para análise das respostas produzidas seguem a seguinte equação polinomial de segunda ordem:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{\substack{j=2 \\ j>i}}^n b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2 \quad [7]$$

onde Y é a variável independente (variável resposta) para ser modelada. X_i e X_j definem as variáveis independentes, b_0 é o coeficiente constante, b_i é o coeficiente do efeito linear, b_{ij} é o coeficiente do efeito interativo entre as variáveis, b_{ii} é o coeficiente do efeito quadrático e n é o numero de variáveis. Embora os parâmetros estatísticos do modelo consistente foram obtidos empiricamente e não podem ser associados com um sentido mecanicista, sendo úteis para prever os resultados de condições de operação não testados (Pinela et al., 2016). O sinal do efeito marca o desempenho da resposta. Desta forma, quando um destes fatores tem um efeito positivo, a resposta é superior a um nível elevado e em que um fator tem um efeito negativo, a resposta é mais baixa no nível elevado. Quanto maior for o valor absoluto de um coeficiente, mais importante é o peso da variável correspondente.

3.7.4. Processo de otimização das variáveis para uma resposta máxima

Para a otimização da extração de catequina, foi obtido um processo maximizado do modelo de respostas produzido, utilizando um simples método para resolver problemas não-lineares (Pinela et al., 2016; Heleno et al., 2016). Foram feitas limitações para valores de variáveis codificadas para evitar condições não naturais (isto é, vezes menor do que 0).

3.8. Modelos matemáticos aplicados aos métodos de estabilização

3.8.1. Modelo individual para análise de efeitos das variáveis na estabilidade

3.8.1.1 Efeito do tempo sobre a estabilidade

Para o efeito t , uma típica função exponencial foi aplicada:

$$e(t) = k \exp(-rt) \quad [8]$$

onde k represente o ponto inicial e r é a razão de degradação da reação.

3.8.1.2 Efeito da temperatura sobre a estabilidade

A equação de Arrhenius estabelece que a constante de velocidade de uma reação química é uma função T absoluta de acordo com a seguinte relação:

$$e(T) = A \exp\left(-\frac{Ea}{RT}\right) \quad [9]$$

onde o fator pré-exponencial A representa a frequência de colisão entre moléculas na reação, Ea é energia de ativação (kJ) e R a constante dos gases (8,31 kJ.mol⁻¹.K⁻¹). Nesse contexto, A e Ea podem ser considerados como parâmetros de ajuste.

3.8.1.3 Efeito do pH sobre a estabilidade

Em contraste com os efeitos das variáveis anteriores, o pH tem muitos comportamentos possíveis e não há uma única equação estabelecida que poderia descrever os seus efeitos. Portanto, é necessário testar vários modelos fenomenológicos para ser capaz de reproduzir a sua conduta. Entre essas respostas é típico encontrar soluções com perfil sino e exponencial:

1) A solução de perfil sino perfil característica para o efeito do pH e pode ser descrita por muitas funções (Di Marco & Bombi, 2001; Prieto & Murado, 2014). Após uma extensa avaliação, no qual foram testadas várias equações, a função exponencial

generalizada sem intercepto (também chamada de função de distribuição Weibull modificada) foi encontrado como sendo o mais satisfatório, com menor número de parâmetros e maior precisão.

$$e(pH) = k_m \left\{ \frac{i}{d} \left[1 - \left(\frac{pH}{pH_{opt}} \right)^d + \ln \left(\frac{pH}{pH_{opt}} \right) d \right] \right\} \quad [10]$$

em que o parâmetro d está relacionado com a distância entre as extremidades de uma função, i é o valor relacionado com a assimetria do perfil de sino, k_m o efeito máximo de resposta e pH_{opt} e pH em que ocorre k_m . Este modelo prevê explicitamente os parâmetros de caracterização (k_m e pH_{opt}) da resposta e, portanto, sua significância estatística pode ser testada através da determinação de seus intervalos de confiança.

2) Uma outra solução para a descrição do efeito do pH é a função exponencial, semelhante à utilizada para efeito de tempo, que é normalmente encontrado em muitas respostas do sistema biológico (Komatsu et al., 2014; Prieto et al., 2012b) e pode ser expresso como se segue:

$$e(pH) = s \exp(-bpH) \quad [11]$$

3.8.2. Análise de multivariáveis

O desenvolvimento de um modelo teórico é facilitado pela possibilidade de combinar todos os dados experimentais com uma única curva principal que é capaz de explicar as variáveis importantes ao mesmo tempo (Prieto et al., 2012a). Tal solução permite controlar a maioria dos fatores que afetam o sistema, ajudando a padronizar as variáveis-chave para a produção de protocolos reprodutíveis e, por consequência, obter resultados reprodutíveis. Apesar da existência de resultados muito rigorosos sobre a cinética e os fatores que afetam a curva cinética de moléculas específicas em função de variáveis tais como T e pH (Rosso et al., 1995; Tijskens et al., 1997; Prieto & Murado, 2014), as soluções simultâneas não são executadas sempre, e aplicando-as, podemos fornecer um conhecimento mais amplo para entender parcialmente os mecanismos que regem.

Para ser capaz de desenvolver uma análise multivariada de três variáveis, a abordagem lógica é a de inserir as equações que levam ao controle do T e pH na Eq. [8] que governa a variável de tempo, modificando os seus parâmetros, o valor de partida (k) e a

velocidade de degradação (r). Mesmo que as três variáveis sejam totalmente independentes, qualquer evento que possa ocorrer em torno de uma reação deve ser sempre encaminhado para a variável tempo. Portanto, uma descrição possível global da estabilidade ao nível molecular pode ter a seguinte abordagem:

$$e(t, pH, T) = k^* \exp(-r^* t) \quad \text{Onde} \quad \begin{aligned} k^*(pH, T) &= k \times e(T) \times e(pH) \\ r^*(pH, T) &= r \times e(T) \times e(pH) \end{aligned} \quad [12]$$

onde k^* representa o ponto de partida e r^* é a taxa de degradação da reação causada pelo efeito de tempo descrito na Eq. [8] mas modificado pelas equações matrizes do efeito de T (Eq. [9]) e pH (Eq. [10] ou [11]).

3.9. Métodos numéricos e análise estatística

Todos os procedimentos de modelação, estimativas dos coeficientes e cálculos estatísticos foram realizados por Microsoft Excel. A análise de modelação e estatística dos resultados experimentais para as equações propostas foram realizadas em quatro fases:

- Coeficientes de determinação: foram obtidas estimativas paramétricas pela minimização da soma das diferenças quadráticas entre os valores observados e os que o modelo previu, usando o método não-linear de mínimos quadrados (quasi-Newton) método fornecido pelo *Solver* no *Microsoft Excel 2003* (Kemmer & Keller, 2010), que permite o teste rápido de uma hipótese e suas consequências (García & Lage, 2013).
- Coeficientes de significância: a determinação dos intervalos de confiança paramétricos foi realizada usando o '*SolverAid*' (Prikler, 2009). O modelo foi simplificado, removendo os termos que não foram estatisticamente significativos para um p -valor ($p > 0,05$).
- Consistência do modelo: Foi utilizado o teste F de Fisher ($\alpha = 0,05$) para determinar se os modelos construídos foram adequados para descrever os dados observados (SHI & TSAI, 2002).
- Outros critérios de avaliação estatística: Para voltar a verificar a uniformidade do modelo, foram aplicados os seguintes critérios: a) A macro '*SolverStat*' foi utilizada para a avaliação dos parâmetros e para prever incertezas do modelo (Comuzzi *et al.*, 2003); b) R^2 que é interpretado como a percentagem de variabilidade da variável dependente explicada pelo modelo; c) Coeficiente de determinação múltipla ajustado (R^2_{adj}), que é

uma correção para R^2 , que leva em conta o número de variáveis utilizadas no modelo; d) os fatores de precisão de todas as equações foram calculados para avaliar a qualidade de dados experimentais preconcebidos, como o erro médio quadrático (MSE), a raiz quadrada significativa dos erros (RMSE) e o erro percentual médio absoluto (MAPE); e) o coeficiente de Durbin-Watson (DW) para testar se os resíduos do modelo não são auto-correlacionados; e f) a análise da tabela de variância (ANOVA) para avaliar o poder explicativo das variáveis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização dos processos de obtenção de catequina a partir de frutos de *Arbutus unedo* L.

4.1.1. Ensaio preliminares para a seleção das variáveis relativas e parâmetros instrumentais para o centro do domínio experimental previsto para a aplicação da MSR

Embora haja estudos anteriores relativos à otimização da extração de catequina de fontes naturais (**Tabela 1**), não há na bibliografia que descreva as condições ótimas para a sua extração a partir de *A. unedo*. Além disso, devido à diversidade de composição química das fontes naturais apresentadas na **Tabela 1**, as condições descritas por diversos autores não podem ser extrapoladas para a extração direta de catequina a partir de frutos de *A. unedo*. Portanto, para encontrar as condições que maximizam a extração de catequina é necessário conhecer as variáveis que afetam as técnicas de extração sólido-líquido. Essas variáveis podem ser divididas em fatores intrínsecos (tipo de solvente, S e razão sólido/líquido) e fatores extrínsecos (t e T para os sistemas ME e MAE e t e P para o sistema UAE). Foram também efetuados testes preliminares realizados individualmente para determinar o domínio experimental (mantendo outras variáveis constantes) para a obtenção de um bom modelo de MSR pela análise das suas respostas.

Em consequência, foram selecionadas as seguintes variáveis e intervalos nos sistemas de extração:

- 1) O tipo de solvente de extração é fundamental para a separação dos compostos pretendidos. Devido à estrutura química da catequina, têm sido utilizadas diferentes misturas de solventes (principalmente metanol, etanol e acetona) com água, para obtenção de altos rendimentos de extrações (mais detalhes na **Tabela 1**). No entanto, seguindo a química verde, selecionaram-se misturas binárias de etanol e água como solventes de extração. Em todos os sistemas, foi testado S de 0 a 100%, afetando significativamente o rendimento de extração de catequina e, por conseguinte, permitindo selecionar o intervalo apropriado.
- 2) Para a determinação da proporção sólido líquido o intervalo testado foi de 1 a 60 g/L. Pequenas quantidades tendem a conduzir a uma dissolução mais eficaz, causando uma melhoria no rendimento de extração, mas havendo também perda de solvente. Uma grande proporção de sólido para líquido resultará num rendimento de extração de

catequina inferior. No entanto, foram encontradas pequenas diferenças, descartando-se a razão sólido/líquido e selecionando a concentração de 30 g/L para todas as técnicas de extração.

3) Em relação às variáveis extrínsecas selecionadas para os processos de ME, MAE e UAE, realizou-se uma pesquisa bibliográfica (**Tabela 1**) dos intervalos utilizados em processos semelhantes combinando uma das variáveis estudadas (mantendo as outras constante). Embora tenham resultados muitas conclusões deste estudo, os resultados podem ser altamente dependentes da variação das outras variáveis que permaneceram constantes e das diferenças entre as matérias-primas utilizadas para extrair catequinas.

Em conclusão, para otimizar a eficiência dos processos de extração de catequina por ME, MAE e UAE foi utilizada a MSR com a aplicação de três variáveis num DCCC. Foram utilizados cinco níveis de variação para as variáveis independentes de t (20-120 min), T (20-90°C) e S (0-100%) para a ME e de t (1-20 min), T (50-120°C), e S (0-100%) para a MAE e t (5-55 min), P (100-400 W), e S (0-100%) para a UAE. Apresenta-se na **Tabela 2** uma descrição detalhada dos valores naturais e codificados das variáveis selecionadas para cada técnica para o DCCC com três variáveis.

4.1.2. Resultados da aplicação da MSR para um DCCC com três variáveis

Os resultados obtidos de acordo com o DCCC são apresentados na primeira parte da **Tabela 5** para cada uma das técnicas de extração testadas. Depois, com o ajuste na Eq. [7] para os resultados de resposta da **Tabela 5** utilizando o procedimento não-linear dos mínimos quadrados, foram obtidos os valores paramétricos estimados, os intervalos paramétricos e os critérios estatísticos numéricos, e apresentam-se na **Tabela 6** os coeficientes paramétricos. Estes coeficientes, que mostram os efeitos com o intervalo de coeficiente ($\alpha = 0,05$) mais elevados do que o valor do parâmetro, foram considerados como não significativos (ns) e não foram considerados para o modelo de desenvolvimento.

Tabela 5: **A)** Resultados da MSR do DCCC para a primeira aproximação da otimização com três variáveis envolvidas (X_1 , X_2 e X_3) na ME, MAE e UAE. **B)** Resultados da MSR do DFC para a otimização de duas variáveis (X_1 e X_2) para a ME e MAE (valores de variáveis naturais e intervalos na Tabela 2). Foram realizadas três repetições (R_{1-3}) para cada condição em cada técnica.

VARIÁVEIS CODIFICADAS			CATEQUINA (mg/g ms)								
			MACERAÇÃO			MICRO-ONDAS			ULTRASSONS		
X_1	X_2	X_3	r_1	r_2	r_3	r_1	r_2	r_3	r_1	r_2	r_3
A) DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL CIRCUNSCRITO (DCCC)											
-1	-1	-1	0,84	0,86	0,87	0,31	0,32	0,33	0,66	0,65	0,65
1	-1	-1	0,74	0,76	0,77	0,55	0,56	0,57	0,67	0,67	0,67
-1	1	-1	1,12	1,15	1,16	0,50	0,50	0,51	0,68	0,69	0,69
1	1	-1	1,32	1,35	1,36	0,95	0,98	0,99	0,69	0,69	0,69
-1	-1	1	0,38	0,39	0,40	0,38	0,39	0,40	0,42	0,42	0,42
1	-1	1	0,30	0,30	0,30	0,45	0,46	0,47	0,45	0,47	0,46
-1	1	1	0,65	0,67	0,68	0,47	0,47	0,48	0,47	0,45	0,46
1	1	1	0,94	0,97	0,99	0,61	0,61	0,62	0,48	0,50	0,49
-1,68	0	0	0,81	0,84	0,85	0,49	0,46	0,47	0,61	0,60	0,60
1,68	0	0	0,99	1,03	1,04	0,74	0,76	0,77	0,71	0,71	0,71
0	-1,68	0	0,40	0,41	0,41	0,49	0,52	0,53	0,58	0,60	0,59
0	1,68	0	1,18	1,21	1,23	0,72	0,72	0,73	0,70	0,70	0,70
0	0	-1,68	1,14	1,17	1,19	0,39	0,41	0,41	0,39	0,40	0,39
0	0	1,68	0,39	0,39	0,40	0,30	0,31	0,32	0,23	0,23	0,23
0	0	0	1,17	1,21	1,23	0,63	0,64	0,65	0,69	0,69	0,69
0	0	0	1,17	1,21	1,23	0,65	0,67	0,68	0,68	0,68	0,68
0	0	0	1,17	1,21	1,23	0,66	0,70	0,71	0,71	0,71	0,71
0	0	0	1,17	1,21	1,23	0,66	0,68	0,69	0,69	0,70	0,70
0	0	0	1,17	1,21	1,23	0,67	0,68	0,69	0,71	0,71	0,71
0	0	0	1,17	1,21	1,23	0,67	0,68	0,69	0,69	0,70	0,70
B) DELINEAMENTO FATORIAL COMPLETO (DFC)											
-1	-1	--	1,16	1,16	1,16	0,93	0,94	0,94	--	--	--
0	-1	--	1,24	1,25	1,25	1,35	1,36	1,37	--	--	--
1	-1	--	0,83	0,83	0,83	1,51	1,52	1,53	--	--	--
-1	0	--	1,30	1,30	1,30	1,22	1,23	1,24	--	--	--
0	0	--	1,40	1,40	1,40	1,60	1,61	1,62	--	--	--
1	0	--	1,00	1,01	1,00	1,72	1,74	1,75	--	--	--
-1	1	--	1,27	1,27	1,27	1,19	1,20	1,20	--	--	--
-1	-1	--	1,38	1,38	1,38	1,53	1,54	1,54	--	--	--

Portanto, os modelos matemáticos foram construídos, obtendo as seguintes equações polinomiais de segunda ordem de acordo com a Eq. [7] para cada uma das técnicas de extração avaliadas:

$$\text{Para ME: } Y_{ME} = 1.1 + 0.05t + 0.24T - 0.23S - 0.11t^2 - 0.15T^2 - 0.13S^2 + 0.09tT \quad [13]$$

$$\text{Para MAE: } Y_{MAE} = 0.66 + 0.09t + 0.08T - 0.04S - 0.01t^2 - 0.03T^2 - 0.11S^2 + 0.03tT - 0.04tS - 0.03TS \quad [14]$$

$$\text{Para UAE: } Y_{UAE} = 0.69 + 0.02t + 0.02P - 0.8S - 0.02t^2 - 0.03P^2 - 0.13S^2 \quad [15]$$

As equações [13], [14] e [15] descrevem os padrões de resposta para cada técnica de extração que mostram cenários altamente complexos. Na **Tabela 6** apresentam-se os efeitos lineares e quadráticos encontrados desempenhando um papel importante e significativo em todos os sistemas de extração. Quanto aos efeitos interativos, para o sistema ME a interação entre t & T foi significativa num modo positivo; para o MAE todas as interações variáveis causaram um efeito significativo (positivo para t & T , e negativo para t & S e T & S); e para os UAE não foram encontrados efeitos significativos.

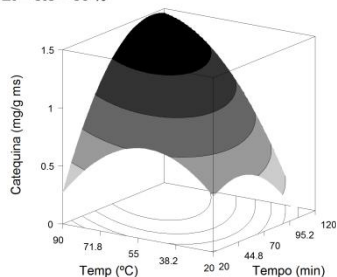
Tabela 6: Resultados paramétricos da equação polinomial de segunda ordem (Eq.[7]) para cada técnica de extração avaliada de acordo com o DCCC com 5 níveis (**Parte A**) e DFC com 3 níveis (**Parte B**). O subscrito 1, 2 e 3 significa as variáveis envolvidas: t , T e S , respetivamente. A análise dos parâmetros significativos ($\alpha=0,05$) é apresentada em valores naturais. Além disso, a informação estatística do procedimento de ajuste do modelo é apresentada.

COEFICIENTES		RESPOSTAS				
		COMPOSTO CENTRAL			FATORIAL COMPLETO	
		MACERAÇÃO MICRO-ONDAS	ULTRASSONS	MACERAÇÃO MICRO-ONDAS	MACERAÇÃO MICRO-ONDAS	MACERAÇÃO MICRO-ONDAS
Ajuste dos coeficientes obtidos						
Intercetar	b_0	1,126±0,10	0,668±0,37	0,696±0,016	1,351±0,02	1,613±0,02
Efeito linear	b_1	0,051±0,01	0,091±0,02	0,019±0,010	0,076±0,01	0,089±0,01
	b_2	0,241±0,06	0,076±0,02	0,022±0,010	-0,114±0,01	0,219±0,01
	b_3	-0,235±0,06	-0,034±0,02	-0,084±0,010		
Efeito quadrático	b_{11}	-0,112±0,03	-0,009±0,00	-0,017±0,010	-0,079±0,01	-0,184±0,02
	b_{22}	-0,154±0,06	-0,025±0,00	-0,030±0,010	-0,227±0,01	-0,150±0,02
	b_{33}	-0,130±0,06	-0,111±0,02	-0,129±0,010		
Efeito interativo	b_{12}	0,090±0,08	0,025±0,02	ns	0,017±0,01	-0,041±0,01
	b_{13}	ns	-0,042±0,02	ns		
	b_{23}	ns	-0,025±0,02	ns		
Análise estatística dos ajustes						
	Obs	60	60	60	27	27
	df	51	49	52	20	20
	R^2	0,9670	0,9655	0,9479	0,9860	0,9879
	R^2_{adj}	0,9326	0,9593	0,9386	0,9625	0,9631
	MEC	0,1310	0,0311	0,0220	0,0864	0,0490
	RMSE	0,3620	0,1762	0,1483	0,2940	0,2213
	MAPE	2,0099	4,0771	4,6536	0,3814	0,0917
	DW	1,0598	2,5446	1,6565	0,2360	2,9929

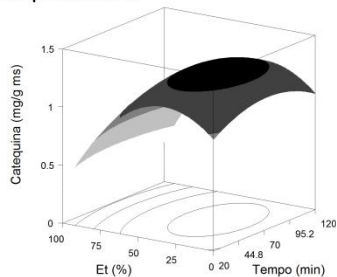
ns: não significativo; Obs: nº de observações; df: grau de liberdade; R^2 : coeficiente de correlação; R^2_{adj} : coeficiente de determinação ajustado para o modelo; MSE: quadrado médio do erro; RMSE: média da raiz quadrada do erro; MAPE: média da percentagem absoluta do erro e DW: estatística Durbin-Watson.

MACERAÇÃO**A: ANÁLISE CONJUNTA**

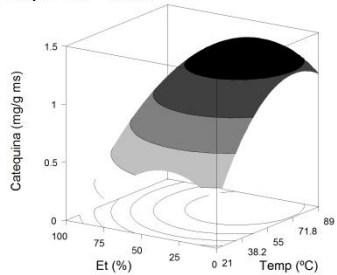
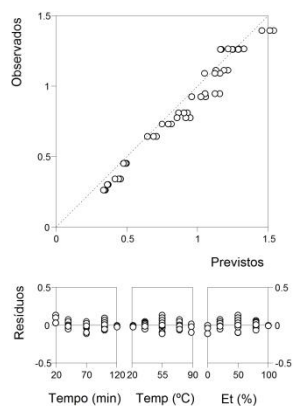
Et = cte = 50 %



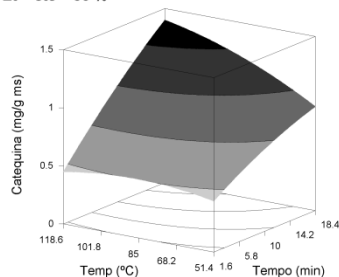
Temp = cte = 55 °C



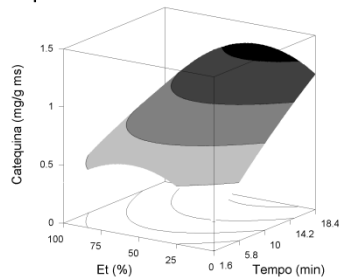
Tempo = cte = 10 min

**B: DISTRIBUIÇÃO ESTATÍSTICA****MICRO-ONDAS****A: ANÁLISE CONJUNTA**

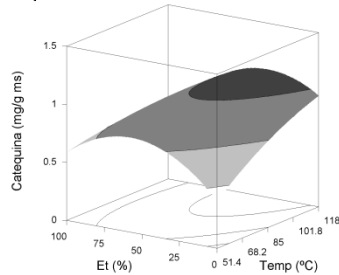
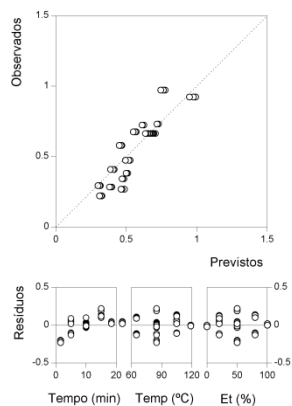
Et = cte = 50 %



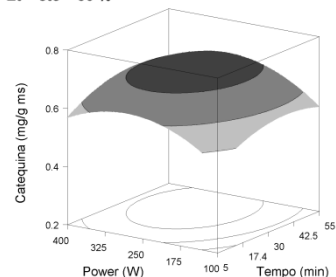
Temp = cte = 85 °C



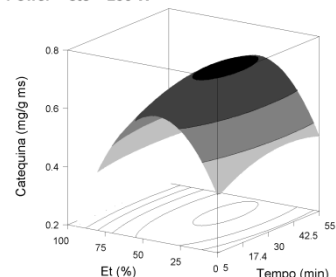
Tempo = cte = 10 min

**B: DISTRIBUIÇÃO ESTATÍSTICA****ULTRASSONS****A: ANÁLISE CONJUNTA**

Et = cte = 50 %



Power = cte = 250 W



Tempo = cte = 30 min

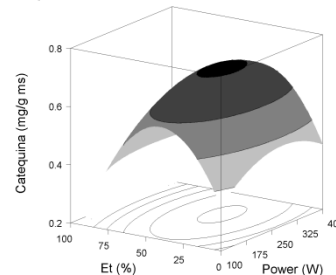
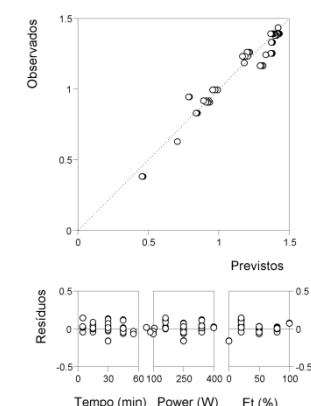
**B: DISTRIBUIÇÃO ESTATÍSTICA**

Figura 5: Os gráficos expressam o comportamento das extrações para um DCCC. **A:** Análise gráfica em 3D de cada variável. Cada gráfico em 3D representa a superfície de resposta teórica prevista com o polinômio de segunda ordem das Eqs. [13], [14] e [15]. **B:** Ilustrações da qualidade do ajuste, a primeira simula as alterações das respostas entre os dados e a segunda expressa a distribuição residual como função de cada variável.

A **Figura 5** mostra em três colunas os resultados em mg de catequina/g para cada técnica de extração. Cada coluna é dividida em duas subseções (A e B). A subseção A apresenta as superfícies de resposta previstas com a sua respetiva equação polinomial de segunda ordem descrita por Eqs. [13], [14] e [15] como uma função de cada uma das

variáveis envolvidas. A ação binária entre variáveis é apresentada quando a variável excluída está posicionada no centro do domínio experimental (ver **Tabela 2**). A subsecção B ilustra a capacidade para prever os resultados obtidos e a distribuição residual como uma função de cada uma das variáveis.

Em quase todas as combinações de respostas em 3D da **Figura 5**, há o aumento da quantidade de material extraído para um valor ótimo e, em seguida, diminui em função de cada uma das variáveis independentes avaliadas. Portanto, em quase todas as combinações do ótimo pode ser encontrado um único ponto ao longo da resposta, o que permite calcular as condições que levam ao máximo absoluto.

Através da aplicação de um procedimento simples com restrições para os intervalos experimentais, as condições ótimas encontradas, assim como os valores da resposta máxima apresentam-se na primeira parte da **Tabela 7**. Para o sistema de ME, a relação ótima (*) ou condições de máximos absolutos foram encontrados em $88,3 \pm 31,8$ min, $79,2 \pm 15,7$ °C e $23,1 \pm 3,7$ % etanol, produzindo uma resposta máxima de $1,36 \pm 0,5$ mg de catequina/g ms. Para a MAE, os valores de condições ótimas foram obtidos a $*18,4 \pm 1,7$ min, $*118,6 \pm 21,3$ °C e $12,1 \pm 1,1$ % etanol, resultando num rendimento de $0,97 \pm 0,2$ mg de catequina/g ms. Para UAE, as condições ótimas encontradas foram $42,4 \pm 4,1$ min, $314,9 \pm 21,2$ W e $40,3 \pm 3,8$ % etanol obtendo uma resposta máxima de $0,71 \pm 0,1$ mg de catequina/g ms.

Tabela 7: Condições de variáveis em valores naturais que conduzem a uma resposta ótima na MSR, para a primeira aproximação usando um DCCC e para a segunda aproximação usando um DFC para cada técnica de extração.

CRITÉRIO	VALORES DE VARIÁVEIS ÓTIMAS			RESPOSTA ÓTIMA	
	$X_1: t$ (min)	$X_2: T$ (°C) ou P (W)	$X_3: S$ (%)		
Condições individuais das variáveis ótimas para um DCCC					
Maceração	$88,3 \pm 31,8$	$79,2 \pm 15,7^*$	$23,1 \pm 3,7$	$1,36 \pm 0,5$	mg/g ms
Micro-ondas	$18,4 \pm 1,7^*$	$118,6 \pm 21,3^*$	$12,1 \pm 1,1$	$0,97 \pm 0,2$	mg/g ms
Ultrassons	$42,4 \pm 4,1$	$314,9 \pm 21,2$	$40,3 \pm 3,8$	$0,71 \pm 0,1$	mg/g ms
Condições individuais das variáveis ótimas para um DFC					
Maceração	$93,2 \pm 3,7$	$79,6 \pm 5,2$	--	$1,38 \pm 0,1$	mg/g ms
Micro-ondas	$42,2 \pm 4,1$	$137,1 \pm 8,1$	--	$1,70 \pm 0,3$	mg/g ms
Condições de variáveis ótimas globais para a combinação do DCCC e DFC					
Maceração	$93,2 \pm 3,7$	$79,6 \pm 5,2$	$23,1 \pm 3,7$	$1,38 \pm 0,1$	mg/g ms
Micro-ondas	$42,2 \pm 4,1$	$137,1 \pm 8,1$	$12,1 \pm 1,1$	$1,70 \pm 0,3$	mg/g ms
Ultrassons	$42,4 \pm 3,6$	$314,9 \pm 21,2$	$40,3 \pm 3,8$	$0,71 \pm 0,1$	mg/g ms

Embora o DCCC tenha sido baseado em testes preliminares e em resultados encontrados na bibliografia, com as respostas produzidas não foi possível encontrar as condições ótimas para todas as variáveis em todas as técnicas de extração. A principal razão para tal resultado é o facto de não terem sido considerados os efeitos interativos nas experiências realizadas. Somente modelos experimentais com base na análise de múltiplas variáveis (tais como a MSR) podem produzir respostas que integrem as interações causadas entre as variáveis. As interações positivas entre o t & T na ME e MAE produziram um efeito adicional na extração que determinou que as respostas encontradas não fossem suficientes (no caso da ME) ou absolutamente otimizadas (no caso da MAE) dentro dos intervalos de variáveis testados, encontrando intervalos de grande confiança para alguns valores ótimos (para a ME) ou condições ótimas ideais (para a MAE) para as variáveis t e T . A falta de clareza para uma solução de ótimo absoluto obrigou à aceitação uma das seguintes soluções: 1) ótimos pouco viáveis e/ou ótimos relativos; 2) utilização de valores ótimos previsto no modelo matemático desenvolvido; ou 3) re-projetar uma segunda MSR em torno dos intervalos parecem ser os ideais a fim de encontrar os valores experimentais que ajudariam a encontrar o melhor absoluto dessas variáveis que falharam na primeira tentativa de otimização. A solução (3) foi escolhida e novas experiências foram realizadas utilizando uma MSR com base num DFC para a análise específica da interação das variáveis t e T nos sistemas de ME e MAE.

4.1.3. Otimização final das ME e MAE usando uma MSR baseada no DFC com as variáveis t e T

Os intervalos das variáveis t e T para o DFC foram expandidos de acordo com os resultados do DCCC (domínio experimental na segunda parte da **Tabela 2**). Os resultados obtidos de acordo com a estatística do DFC para ME e MAE são apresentados na segunda parte da **Tabela 5** para cada uma das técnicas de extração. A elaboração da MSR adequada foi realizada como descrito anteriormente; a Eq. [7] foi usada para o ajuste das respostas da **Tabela 5** usando o procedimento não-linear de mínimos quadráticos. Foram obtidos os valores paramétricos estimados, intervalos paramétricos e critérios de estáticas numéricas, que se apresentam na segunda parte da **Tabela 6**. Os modelos matemáticos foram construídos, obtendo as seguintes equações polinomiais de segunda ordem de acordo com a Eq. [7] para cada técnica de extração avaliada:

Para ME: $Y_{ME} = 1,35 + 0,08t - 0,11T - 0,08t^2 - 0,23T^2 + 0,08tT$ [16]

Para MAE: $Y_{MAE} = 1,6 + 0,09t + 0,2T - 0,18t^2 - 0,15T^2 - 0,04tT$ [17]

As Equações [16] e [17] apresentam as respostas padrão para cada técnica de extração mostrando cenários quase idênticos aos anteriormente encontrados para a abordagem DCCC, mas com intervalos de variáveis mais extensos, permitindo encontrar as condições de extração de catequina que conduzem a um ótimo absoluto real de confiança. Foram encontrados efeitos lineares e quadráticos desempenhando um papel importante e significativo em todos os sistemas de extração. Quanto aos efeitos interativos de t e T , colaboraram de forma positiva e negativa, respectivamente para ME e MAE.

A **Figura 6** apresenta os resultados de extração de catequina para cada técnica testada (ME e MAE). Cada técnica apresentada na **Figura 6** é dividida em três secções:

- Secção A que apresenta o rendimento de extração de catequina (mg/g de ms) como uma função das variáveis t e T . Os pontos (●) representam os resultados experimentais obtidos de acordo com o desenho estatístico descrito. O gráfico em 3D representa a superfície de resposta teórica prevista com as equações polinomiais de segunda ordem [16] e [17]. Os valores paramétricos estimados são apresentados na segunda parte da **Tabela 6**.
- Secção B que apresenta a representação bidimensional do ajuste dos resultados com as Eqs. [16] e [17] (linha sólida) para os pontos experimentais (valores de variáveis □ mínimo, ◇ médio e △ máximo) para o efeito de combinação do t e T no rendimento de extração de catequina (mg/g ms).
- Secção C que apresenta a ilustração para a análise estatística das soluções encontradas. São usados dois gráficos: um para a simulação das alterações da resposta e outro para a distribuição dos resíduos como função de cada variável.

Em ambas as técnicas (ME e MAE) as variáveis t e T afetaram a extração de catequina significativamente. A eficiência da extração de catequina aumentou com o aumento do t e T até uma resposta ótima absoluta, que diminuiu devido à quebra da estrutura da molécula.

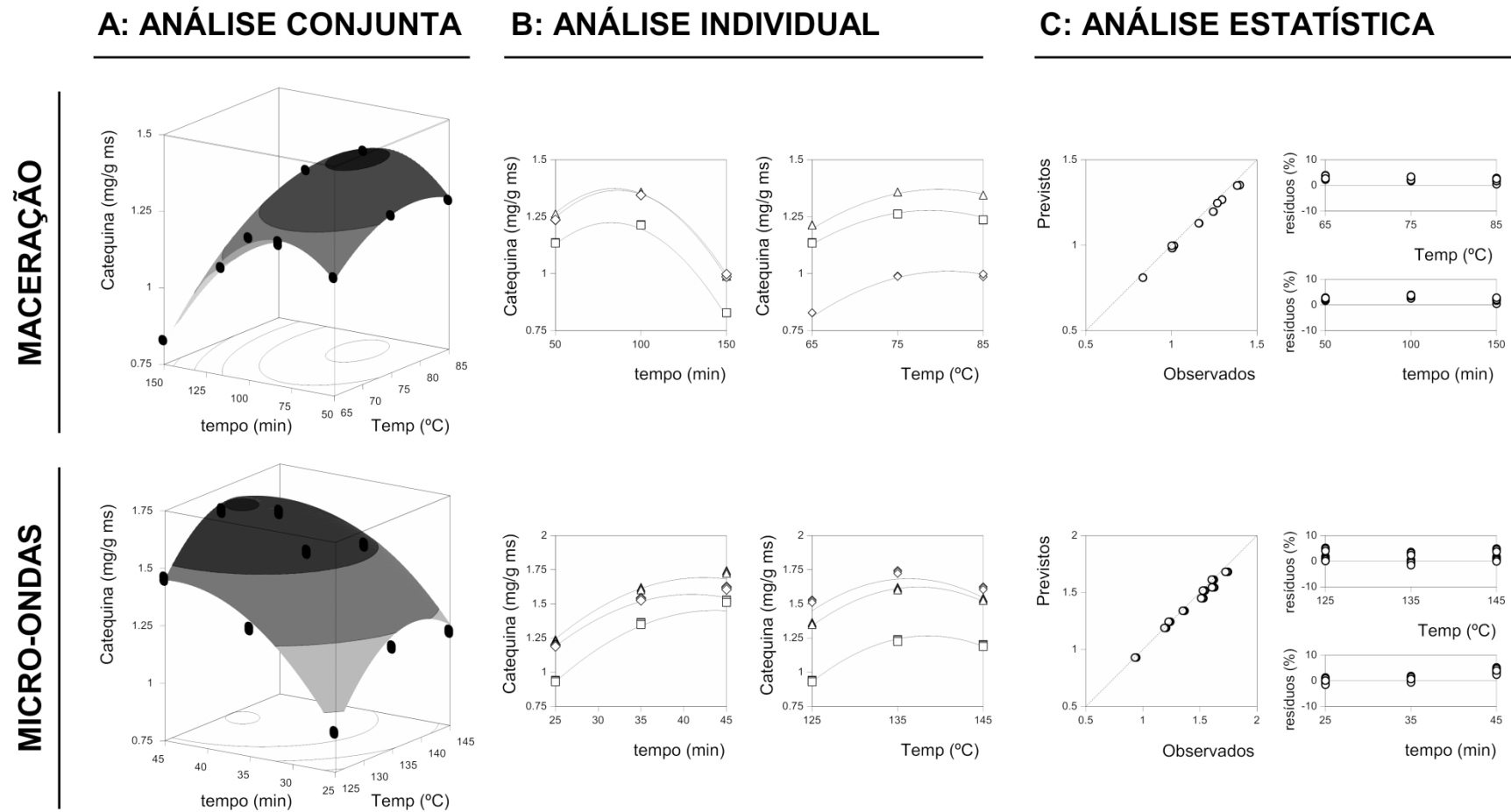


Figura 6: **A:** Apresenta a otimização final de extração para as técnicas de ME e MAE em um DFC. R: Rendimento de extração de catequina (mg/g ms) em função do t e T . Pontos (●) representam os resultados experimentais obtidos (Tabela 5). Cada gráfico em 3D representa a resposta teórica prevista com as equações polinomiais de segunda ordem Eq. [16] e [17]. **B:** Representação em 2D dos resultados dos ajustes nas Eqs. [16] e [17] para os pontos experimentais (valor □ mínimo, ◇ médio e △ máximo) para a combinação do t e T sobre o rendimento da extração de catequina (mg/g ms). **C:** Ilustrações da qualidade do ajuste, a primeira simula as alterações das respostas entre os dados e a segunda expressa a distribuição residual como função de cada variável.

Através da aplicação de um procedimento simples, com restrições para os intervalos experimentais testados, foram encontrados os resultados em condições ideais, bem como os valores de resposta de rendimento máximo de catequina para cada técnica (apresentada na segunda parte da **Tabela 7**). Para o sistema de ME, as condições ótimas foram encontradas em $93,2 \pm 3,7$ min e $79,6 \pm 5,2$ °C (em 24% de etanol) produzindo um valor máximo de resposta de $1,38 \pm 0,1$ mg de catequina/g ms. Para a MAE, as condições ótimas foram a $42,2 \pm 4,1$ min e $137,1 \pm 8,1$ °C (em 12% de etanol) produzindo uma resposta máxima de $1,70 \pm 0,3$ mg de catequina/g ms.

4.1.4. Comparação das técnicas de extração, condições ótimas que maximizam a extração, análise estatística e verificação dos modelos experimentais

Ao combinar a informação produzida a partir do DCCC e DFC, define-se em termos absolutos o comportamento completo de cada uma das variáveis relevantes na extração de catequina. Para todas as técnicas as condições que conduzem aos valores ótimos foram reexaminados a fim de garantir a precisão dos resultados apresentados. A **Figura 7** apresenta em 2D as respostas individuais resumidas em função das variáveis definidas para as técnicas extração ME, MAE e UAE. A linha representa resposta padrão da variável quando as outras estão localizadas nos valores ótimos apresentados na terceira parte da **Tabela 7**. O ponto (⊙) apresentado ao longo da linha realça a localização do valor ótimo. A comparação da eficiência de extração dos resultados encontrados mostra que a técnica de ME e MAE forneceram valores significativamente mais elevados, enquanto a extração UAE apresenta valores mais baixos. Em relação ao tempo de extração, MAE foi o método de extração mais rápido com ~45 min enquanto na ME são necessários ~95 min. Na eficiência de extração, ME é semelhante a MAE. UAE não é adequada para a extração de catequina por causa da baixa eficiência de extração.

A otimização do rendimento de extração de catequina em ME, MAE e UAE com a utilização da MSR é uma solução eficiente que minimiza os erros com um pequeno número de ensaios experimentais. O ajuste com as multivariáveis diminuiu o número de parâmetros necessários para analisar a resposta levando a melhores estimativas e reduzindo o seu intervalo de confiança.

A falta de ajuste avaliou a capacidade dos modelos mostrando que os parâmetros não significativos de ambas as MSR (**Tabela 6**) não melhoram estatisticamente a solução encontrada e, pelo contrário, todos os parâmetros significativos foram altamente consistentes ($p < 0,01$). Isto também foi confirmado pelos valores elevados de R^2 e R^2_{adj}

obtidos, indicando a percentagem de variabilidade explicada pelo modelo (**Tabela 6**). A distribuição dos resíduos apresentados na **Figura 5** e **Figura 6** ficou em torno de zero e não foram observados grupos de valores ou autocorrelações. Além disso, os valores experimentais e previstos indicam uma explicação aceitável dos resultados obtidos pelas variáveis independentes utilizadas. Por conseguinte, os modelos desenvolvidos das Eqs. [13] a [17], seja pela DCCC ou DFC, são completamente funcionais e adequados a ser usados para processos de previsão e otimização.

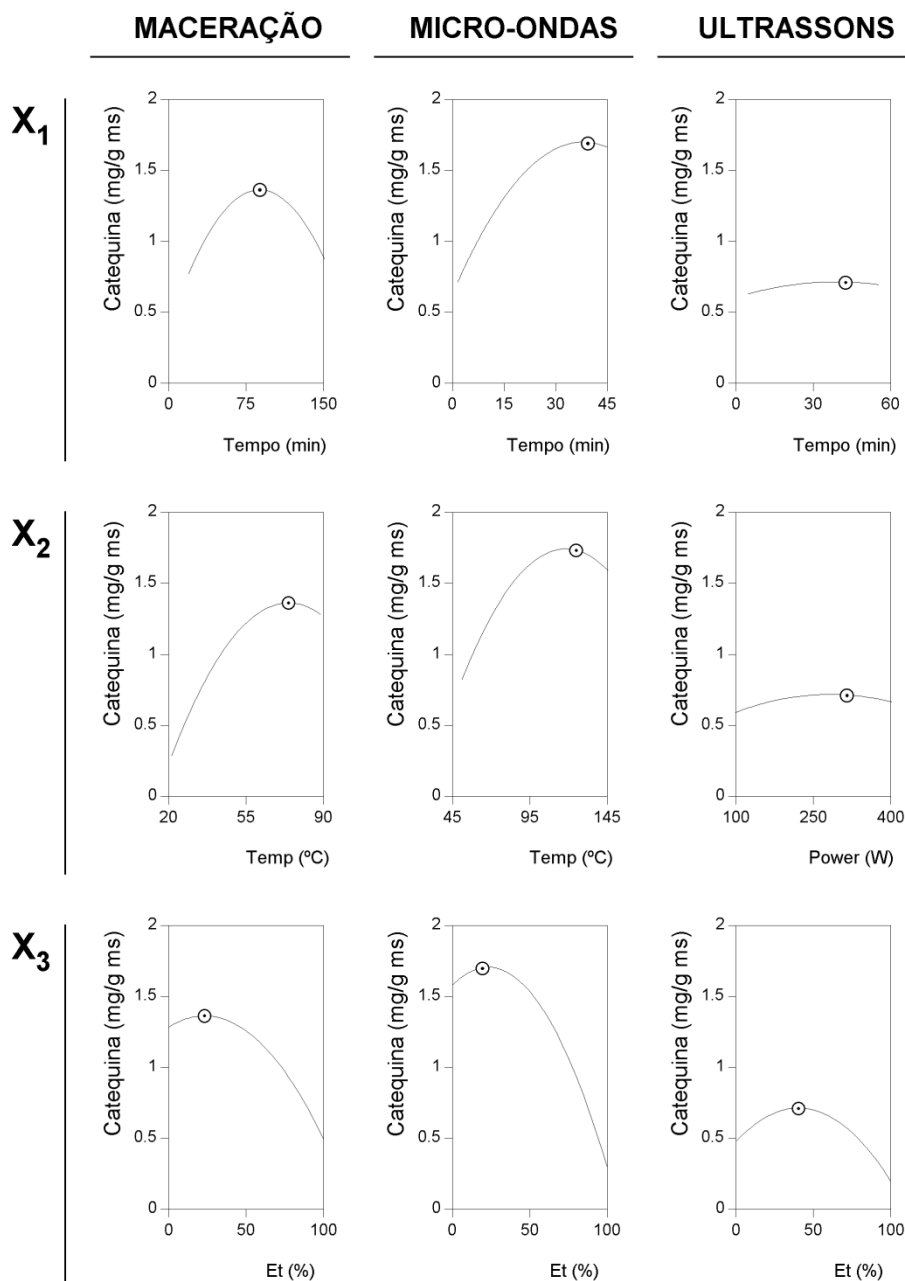


Figura 7: Respostas individuais em 2D da ME, MAE e UAE para cada variável. Cada gráfico apresenta um ponto (⊙) de valor ótimo sobre uma linha contínua obtida das equações de segunda ordem adquiridas através das Eqs. [13] a [17].

4.2. Estabilidade do extrato enriquecido em catequinas (EEC)

A obtenção dos extratos e as etapas dos estudos da sua estabilidade estão resumidas na **Figura 4** apresentada na secção 3.6.

4.2.1. Estabilidade dos EEC em pó durante o armazenamento

O EEC em pó foi analisado sob a influência dos fatores t , T e pH tendo em vista avaliar a estabilidade dos seus compostos (flavan-3-óis e catequina) e da sua atividade antioxidante (DPPH e PR). Para todas as respostas, o efeito t foi descrito pela Eq. [8]. As respostas paramétricas e os coeficientes de relação apresentam-se na **Tabela 8**. A análise de multivariáveis foi testada como descrita na Eq. [12], por interseção das Eq. [9] e Eq. [10] na Eq.[8] substituindo os parâmetros dependentes da T e pH (k e r). Testando as multivariáveis aproximadas para todas as respostas (flavan-3-óis, catequina, DPPH e PR), verificou-se que em todos os casos o efeito pH teve efeito exclusivamente na assintótica do parâmetro k e T teve efeito exclusivamente sobre o parâmetro r . O modelo global de multivariáveis que controla os efeitos de t , T e pH sobre a estabilidade dos compostos no EEC em pó pode ser descrito por:

$$e(t, pH, T) = k_m \left\{ \frac{i}{d} \left[1 - \left(\frac{pH}{pH_{opt}} \right)^d + \ln \left(\frac{pH}{pH_{opt}} \right) d \right] \right\} \exp \left(-A \exp \left(-\frac{Ea}{RT} \right) t \right) \quad [18]$$

Todos os parâmetros estão definidos na secção de material e métodos. A solução paramétrica e os coeficientes de correlação dos efeitos das multivariáveis estão descritos na Eq. [18], para o estudo da estabilidade dos compostos (flavan-3-óis e catequina) e da atividade antioxidante (DPPH e PR), e apresentam-se na **Tabela 9**, **Figura 8**, **Figura 9**, **Figura 10** e **Figura 11**. Em seguida, descrevem-se de uma forma mais detalhada os resultados destas análises para todas as respostas.

Tabela 8: Resultados dos intervalos paramétricos e de confiança de flavan-3-óis, catequina e propriedades antioxidantes ajustados ao modelo dependente do tempo apresentada na Eq. [8] a diferentes pH e condições de T ao avaliar a estabilidade do extrato enriquecido em catequinas (EEC) durante armazenamento.

pH	T	FLAVAN-3-ÓIS			CATEQUINA			DPPH			PODER REDUTOR		
		$k(t)$ (mg/g EEC)	$r(t)$ (dia ⁻¹)	R ²	$k(t)$ (mg/g EEC)	$r(t)$ (dia ⁻¹)	R ²	$k(t)$ (nM DPPH/g EEC)	$r(t)$ (nM DPPH/g EEC/dia)	R ²	$k(t)$ (nM Fe ²⁺ /g EEC)	$r(t)$ (nM Fe ²⁺ /g EEC/dia)	R ²
2,0	-20,0	25,43±2,37	0,0236±0,002	0,9311	9,58±0,76	0,0198±0,002	0,8897	87,8±8,8	0,019±0,002	0,9994	4,12±0,41	0,047±0,005	0,9944
2,0	5,0	25,12±2,46	0,0354±0,003	0,9790	9,58±0,81	0,0293±0,002	0,8485	90,0±8,0	0,038±0,003	0,8895	4,09±0,40	0,050±0,005	0,9662
2,0	25,0	25,31±2,48	0,0464±0,005	0,9794	9,58±0,78	0,0315±0,003	0,8097	87,4±8,4	0,044±0,004	0,9667	4,08±0,40	0,055±0,005	0,9796
2,0	45,0	23,50±2,16	0,0510±0,005	0,9177	9,58±0,83	0,0331±0,003	0,8630	87,8±8,1	0,063±0,006	0,9228	4,04±0,40	0,069±0,007	0,9836
4,0	-20,0	41,34±4,12	0,0265±0,003	0,9962	19,32±1,06	0,0083±0,000	0,8475	110,9±11,0	0,030±0,003	0,9933	4,82±0,48	0,044±0,004	0,9997
4,0	5,0	41,61±4,15	0,0304±0,003	0,9980	19,32±0,55	0,0074±0,000	0,8828	111,2±11,1	0,040±0,004	0,9940	4,81±0,48	0,050±0,005	0,9999
4,0	25,0	42,67±4,16	0,0325±0,003	0,9743	19,32±1,47	0,0177±0,001	0,8613	109,7±10,7	0,035±0,003	0,9789	4,74±0,47	0,059±0,006	0,9901
4,0	45,0	42,37±4,17	0,0354±0,003	0,9852	19,32±1,50	0,0132±0,001	0,8744	111,3±10,0	0,057±0,005	0,9001	4,80±0,48	0,085±0,008	0,9997
5,0	-20,0	58,51±5,79	0,0316±0,003	0,9896	30,25±2,56	0,0223±0,002	0,8464	122,5±12,0	0,044±0,004	0,9786	4,92±0,49	0,042±0,004	0,9942
5,0	5,0	59,29±5,92	0,0350±0,003	0,9991	30,25±2,79	0,0227±0,002	0,9236	123,5±11,9	0,031±0,003	0,9656	4,74±0,47	0,041±0,004	0,9986
5,0	25,0	58,23±5,72	0,0391±0,004	0,9820	30,25±2,46	0,0228±0,002	0,8947	119,2±11,9	0,054±0,005	0,9981	5,10±0,51	0,058±0,006	0,9996
5,0	45,0	58,97±5,88	0,0414±0,004	0,9966	30,25±2,53	0,0319±0,003	0,9362	118,8±11,8	0,094±0,009	0,9938	4,69±0,47	0,072±0,007	0,9982
6,0	-20,0	80,48±8,02	0,0377±0,004	0,9966	23,88±1,40	0,0151±0,001	0,8871	134,8±12,9	0,036±0,003	0,9554	5,54±0,55	0,040±0,004	0,9851
6,0	5,0	80,70±8,06	0,0409±0,004	0,9990	23,88±2,28	0,0146±0,001	0,9562	139,7±13,9	0,046±0,005	0,9945	5,55±0,55	0,047±0,005	0,9922
6,0	25,0	80,66±8,06	0,0442±0,004	0,9989	23,88±2,07	0,0193±0,002	0,8649	137,9±13,8	0,041±0,004	0,9992	5,56±0,55	0,054±0,005	0,9933
6,0	45,0	78,59±7,57	0,0509±0,005	0,9634	23,88±2,21	0,0217±0,002	0,9267	138,1±13,8	0,051±0,005	0,9986	5,55±0,55	0,061±0,006	0,9914
7,0	-20,0	78,79±7,83	0,0363±0,004	0,9939	24,82±1,81	0,0207±0,002	0,9275	189,1±18,4	0,042±0,004	0,9753	5,55±0,55	0,034±0,003	0,9958
7,0	5,0	79,16±7,91	0,0373±0,004	0,9996	24,82±1,74	0,0218±0,002	0,9015	191,6±17,9	0,038±0,004	0,9351	5,58±0,55	0,034±0,003	0,9871
7,0	25,0	79,26±7,92	0,0408±0,004	0,9998	24,82±1,80	0,0252±0,002	0,9250	191,6±18,8	0,047±0,005	0,9817	5,72±0,54	0,040±0,004	0,9475
7,0	45,0	77,22±7,56	0,0456±0,004	0,9785	24,82±2,21	0,0305±0,003	0,8921	194,4±18,7	0,068±0,007	0,9611	5,62±0,55	0,059±0,006	0,9720
8,0	-20,0	55,29±5,51	0,0282±0,003	0,9971	17,58±1,50	0,0149±0,001	0,8549	130,5±12,8	0,039±0,004	0,9803	4,62±0,46	0,042±0,004	0,9931
8,0	5,0	54,21±5,39	0,0328±0,003	0,9938	17,58±1,68	0,0174±0,002	0,9539	130,8±12,9	0,041±0,004	0,9845	4,74±0,45	0,038±0,004	0,9524
8,0	25,0	55,81±5,52	0,0347±0,003	0,9898	17,58±1,50	0,0148±0,001	0,8531	132,1±12,8	0,045±0,004	0,9682	4,47±0,43	0,050±0,005	0,9718
8,0	45,0	55,87±5,53	0,0372±0,004	0,9890	17,58±1,51	0,0164±0,001	0,8566	133,2±12,6	0,049±0,005	0,9473	4,67±0,46	0,052±0,005	0,9788
9,0	-20,0	27,60±2,72	0,0275±0,003	0,9844	15,78±1,42	0,0149±0,001	0,8986	99,7±10,0	0,039±0,004	1,0000	3,56±0,34	0,046±0,004	0,9682
9,0	5,0	27,59±2,73	0,0311±0,003	0,9882	15,78±1,41	0,0190±0,002	0,8947	100,4±10,0	0,039±0,004	0,9988	3,57±0,35	0,043±0,004	0,9931
9,0	25,0	27,61±2,73	0,0351±0,003	0,9893	15,78±0,96	0,0152±0,001	0,9113	100,1±10,0	0,044±0,004	0,9994	3,57±0,36	0,046±0,005	0,9975
9,0	45,0	27,64±2,74	0,0381±0,004	0,9907	15,78±1,38	0,0204±0,002	0,8739	100,2±9,8	0,040±0,004	0,9793	3,53±0,35	0,051±0,005	0,9773

Tabela 9: Resultados dos intervalos paramétricos e de confiança de flavan-3-óis, catequina e propriedade antioxidante obtidos através do modelo de multivariáveis (t , T e pH) apresentado na Eq. [12] ao avaliar a estabilidade do extrato enriquecido em catequinas (EEC) durante armazenamento.

		FLAVAN-3-ÓIS	CATEQUINA	DPPH	PODER REDUTOR
Parâmetros que controlam o efeito do pH do parâmetro de cinética $k(t)$					
R_{max} (pH)	(unid. resposta)	76,73±2,18	30,21±1,51	154,84±5,17	5,46±0,08
i (pH)		7,76±1,17	1,49±0,98	11,11±3,76	9,70±1,67
pH_{opt} (pH)	(unid. pH)	6,70±0,14	5,43±0,26	7,16±0,31	6,73±0,19
d (pH)		2,21±0,15	3,87±1,66	1,55±0,09	1,33±0,04
Parâmetros que controlam os efeitos da T do parâmetro de cinética $r(t)$					
$A(T)$	(freq. colisão)	0,13±0,02	0,08±0,01	0,32±0,04	0,31±0,08
Ea (T)	(kJ)	2,87±0,32	2,87±0,80	4,78±0,72	4,42±0,62
Informação estatística da análise multivariada (trivariado)					
Obs		112	112	112	112
df		105	105	105	105
R^2		0,9741	0,8792	0,8835	0,9578
R^2_{adj}		0,9318	0,8533	0,8648	0,9324

4.2.1.1 Monitorização da estabilidade dos compostos flavan-3-óis e catequina por HPLC-DAD

A representação gráfica dos resultados da estabilidade dos flavan-3-óis e catequina do EEC em pó em função de t , T e do pH está na **Figura 8** e **Figura 9**. Cada uma dessas figuras está dividida em duas secções (A e B).

Secção A: apresenta a análise individual dependente do tempo (durante 31 dias) dos efeitos de degradação dos flavan-3-óis e catequina para cada um dos valores de pH testados (2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9). Os pontos são dados experimentais (● -25 °C, ○ 5 °C, ◆ 25 °C, ◇ 45 °C) e as linhas (—) são resultados modelados usando a Eq. [8]. Os efeitos produzidos pelas variáveis t e pH exerceram maior influência sobre a estabilidade dos flavan-3-óis e catequina do que a variável T . O intervalo testado de T era grande o suficiente, mas foi altamente afetado pelo pH . Somente entre pH s 5 e 7 as taxas de degradação causada pelo efeito T (parâmetro r , **Tabela 8**) mostraram uma resposta bem diferenciada. Embora os valores de pH entre 5 e 7 tenham apresentado as maiores taxas de degradação em qualquer T , na estabilidade inicial mostrou um teor compostos mais elevados do que qualquer outro valor de pH , uma vez que pode ser avaliada pelo valor

do parâmetro K (**Tabela 8**) da Eq. [8]. O teor máximo de partida obtido foi de 80,7 e 30,25 mg/g EEC para flavan-3-óis e catequina, respectivamente. A informação estatística dos ajustes realizados está ilustrada utilizando dois critérios básicos, o coeficiente R^2 básico e os intervalos de confiança paramétricos. Em todos os casos, os parâmetros foram altamente significativos ($\alpha=0,05$) e os valores de R^2 foram predominantemente superiores a 0,95, indicando a adequação das análises efetuadas com a Eq. [8]. Portanto, para encontrar os valores que nos permitiam determinar o intervalo variável exato que estabilizaria o pó de EEC, foi aplicado o modelo da análise multivariada da Eq. [18] e apresentado na secção B da **Figura 8** e **Figura 9**.

Secção B: apresenta, para ambas as respostas (flavan-3-óis e teor de catequina), o procedimento de ajuste das múltiplas variáveis globais dividido em três subsecções (aplicando a Eq [18] com os resultados paramétricos da **Tabela 9**):

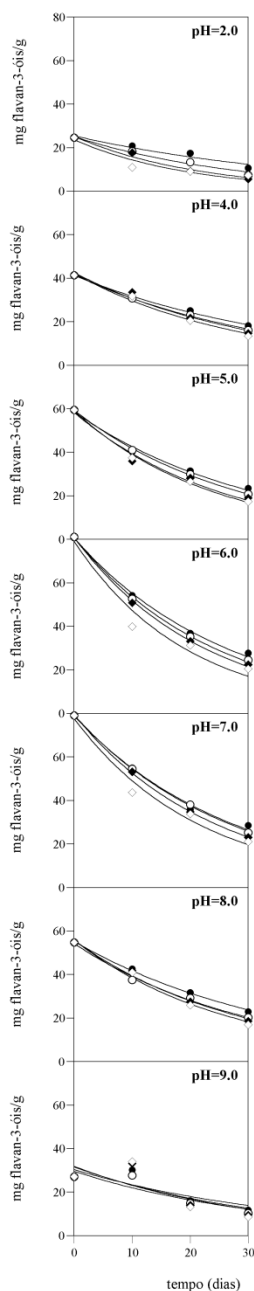
B1: apresenta os padrões de cinética dos parâmetros k e r da Eq. [8] (os pontos são resultados individuais e linhas de multivariável) como uma função das respectivas variáveis (pH que afecta o parâmetro K e T que afetam o parâmetro r). Em ambos os casos, a resposta de pH mostra um padrão de perfil de sino com um pico claro em 6,7 para o teor de flavan-3-óis e em 5,4 para o conteúdo de catequina. Para a variável T , ambos os casos apresentaram um perfil linear de aumento com valores esperados EA (2,87 kJ), mas diferente frequência de colisão (0,13 e 0,08 de flavan-3-óis e conteúdo de catequina, respetivamente).

B2: apresenta uma ilustração da resposta em 3D do efeito combinado do tempo, com as outras duas variáveis (T e pH), com as melhores condições experimentais encontradas para estabilizar o teor de flavan-3-óis ($T=-20^\circ\text{C}$ e $pH=6,7$) e de catequina ($T=-20^\circ\text{C}$ e $pH=5,4$) no EEC em pó.

B3: mostra a correlação entre os valores experimentais e os previstos obtidos com o modelo de multivariáveis apresentado na Eq [18] para a previsão da estabilidade do conteúdo de flavan-3-óis e ($R^2=0,9741$) e catequina ($R^2=0,8741$) do EEC em pó.

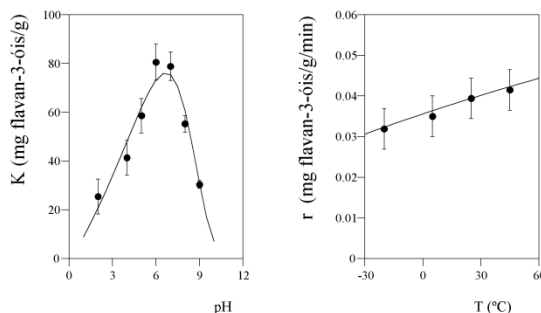
Estes valores estão de acordo com os descritos anteriormente. Como exemplo, Zhu e colaboradores (2002) mostraram que as melhores condições de vida de prateleira obtidas para todos os flavan-3-óis do cacau foram a valores de pH entre 2-4, e a instabilidade ocorreu de forma acentuada a $pH >7,4$, independentemente, a qualquer temperatura de armazenamento entre 4-45°C, e concluíram que a estabilidade é fundamentalmente dependente do pH .

A:ANALISE INDIVIDUAL

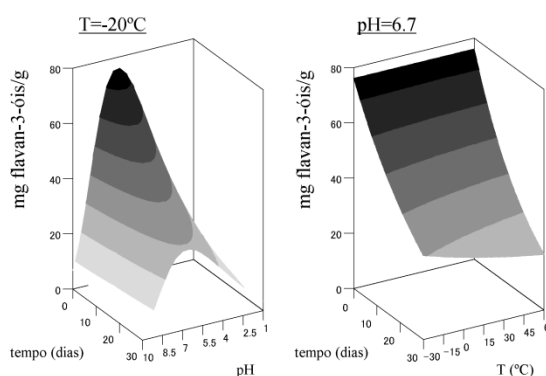


B: ANALISE MULTIVARIADA

B1: Efeitos dos parâmetros



B2: Resposta aos valores experimentais ótimos



B3: Correlação entre dados experimentais e modelados

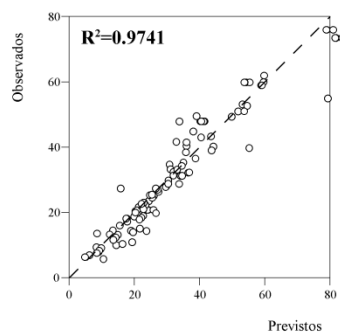
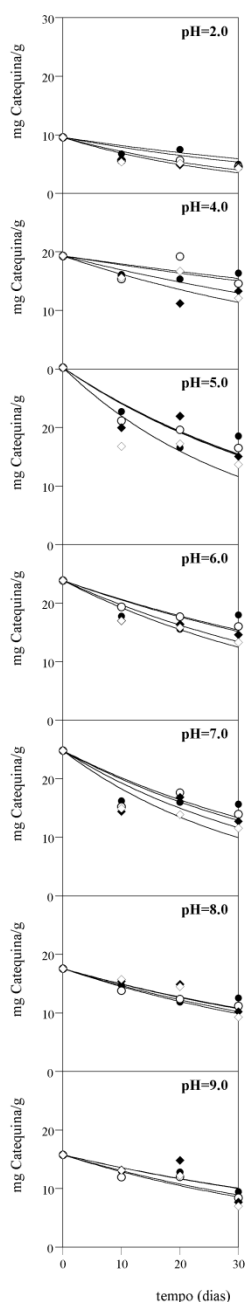


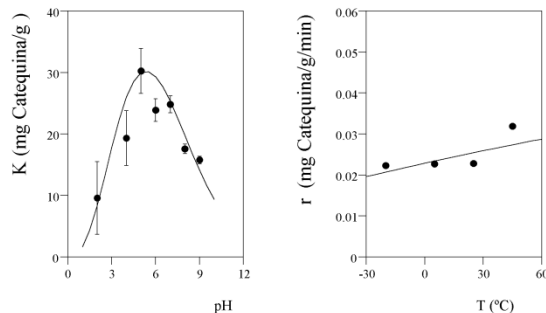
Figura 8: Estabilidade de armazenamento em pó avaliada pelos flavan-3-óis em função de t , T e pH . A **secção A** mostra a análise cinética individual dos efeitos na degradação dos flavan-3-óis. Os pontos são dados experimentais (● -25 °C, ○ 5 °C, ◆ 25 °C, ◇ 45 °C) e as linhas (—) são os resultados modelados usando a Eq. [8] (respostas paramétricos e coeficientes de correlação da **Tabela 8**). A **secção B** mostra o procedimento de ajuste global de multivariáveis (trivariado): **B1** mostra os padrões paramétricos dos parâmetros cinéticos k e r da Eq.[8] (os pontos são resultados univariados e as linhas são respostas multivariadas) em função das respectivas variáveis (pH que afeta o parâmetro k e T que afeta r); **B2** ilustra a resposta em 3D do efeito combinado das três variáveis nas melhores condições experimentais encontradas ($T=-20^{\circ}\text{C}$ e $pH=6,7$); e **B3** mostra a correlação entre os valores experimentais e os previstos obtidos com o modelo multivariável apresentado na Eq.[12].

A: ANALISE INDIVIDUAL

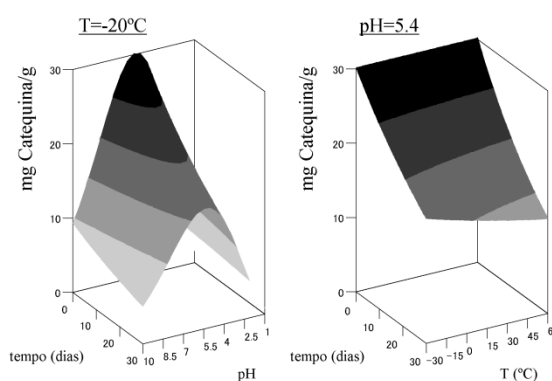


B: ANALISE MULTIVARIADA

B1: Efeitos dos parâmetros



B2: Resposta aos valores experimentais ótimos



B3: Correlação entre dados experimentais e modelados

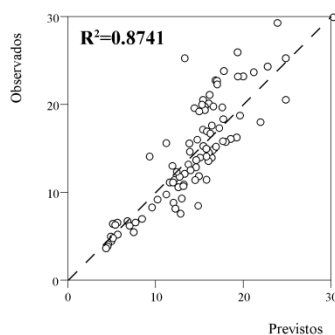
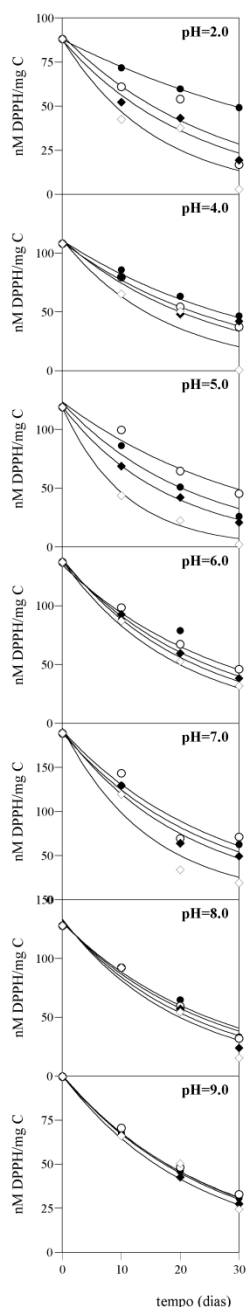


Figura 9: Estabilidade de armazenamento em pó do composto catequina em função de t , T e pH . A **seção A** mostra a análise cinética individual dos efeitos na degradação do composto catequina. Os pontos são dados experimentais (● -25 °C, ○ 5 °C, ◆ 25 °C, ◇ 45 °C) e as linhas (—) são resultados modelados usando a Eq.[8] (respostas paramétricas e coeficientes de correlação da **Tabela 8**). A **seção B** mostra o procedimento de ajuste global de multivariáveis (trivariado): **B1** mostra os padrões paramétricos dos parâmetros cinéticos k e r da Eq. [8] (os pontos são resultados univariados e as linhas representam a resposta multivariada) em função das respectivas variáveis (pH que afeta o parâmetro K e T que afeta r); **B2** mostra ilustra a resposta em 3D do efeito combinado das três variáveis nas melhores condições experimentais encontradas ($T=-20^{\circ}\text{C}$ e $pH=6,7$); **B3** mostra a correlação entre os valores experimentais e os previstos obtidos com o modelo multivariável apresentado na Eq. [12].

4.2.1.2 Monitorização da atividade antioxidante remanescente dos compostos do EEC, avaliada por ensaios hidrofóbicos

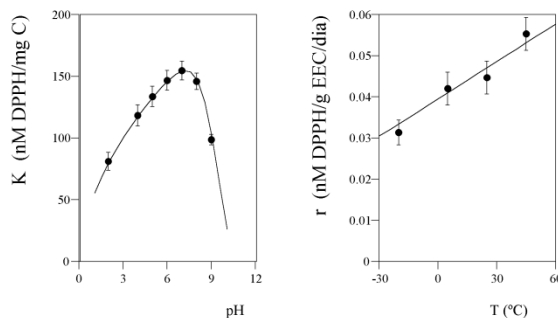
A representação gráfica dos resultados da atividade captadora de DPPH e poder redutor (PR) do EEC em pó em função de t , T e pH está nas **Figura 10** e **Figura 11**. Cada uma destas figuras está dividida nas mesmas duas secções (A e B) e é analisada como descrito na secção anterior. A análise individual da atividade medida por ambos os métodos (secção A da **Figura 10** e **Figura 11**) mostra um efeito mais forte da variável pH e t do que da T , mas com um efeito de T mais notável do que a encontrada na análise da estabilidade dos principais compostos do EEC. Os valores dos parâmetros da Eq.[8] de todas as análises antioxidantes são apresentados na **Tabela 8**. A informação estatística mostrou $R^2 > 0,95$ em quase todos os casos e intervalos de confiança paramétricos altamente significativas ($\alpha=0,05$). A análise multivariada pela Eq. [18] está graficamente ilustrada na secção A da **Figura 11** e B da **Figura 10** e os resultados dos parâmetros são apresentados na **Tabela 9**. Os padrões do parâmetro cinético k mostra um padrão de perfil de sino, como uma função do pH com um pico claro a 7,1 e 6,7 para os métodos DPPH e PR., respetivamente. No caso do parâmetro r dependente da temperatura, a atividade captadora de DPPH e o poder redutor mostraram um perfil linear crescente com valores semelhantes de EA (4,78 e 4,42 kJ , respetivamente) e valores de frequência de colisão 0,32 e 0,31, respetivamente. Portanto, a temperaturas mais baixas e valores de pH entre o intervalo de 6 a 7 o tempo de degradação é reduzido. Esta relação é ilustrada pela resposta 3D do efeito combinado do tempo com as outras duas variáveis (pH e T) com as melhores condições experimentais estabilizantes encontradas para o conteúdo em compostos antioxidantes do EEC em pó. Finalmente, a subsecção B3 mostra os altos valores de correlação entre os valores experimentais e os preditos pela Eq. [18], validando mais uma vez a solução desenvolvida.

A: ANÁLISE INDIVIDUAL

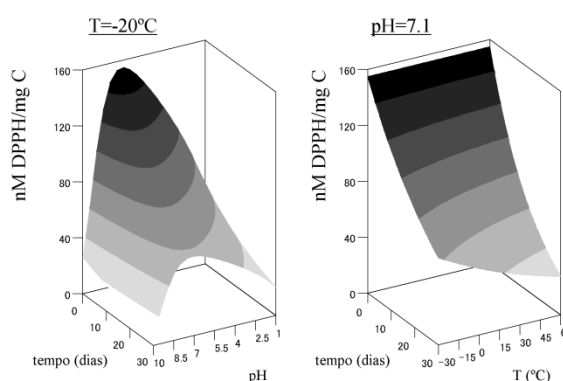


B: ANÁLISE MULTIVARIADA

B1: Efeitos dos parâmetros



B2: Resposta aos valores experimentais ótimos



B3: Correlação entre dados experimentais e modelados

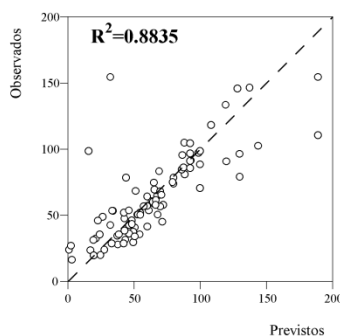
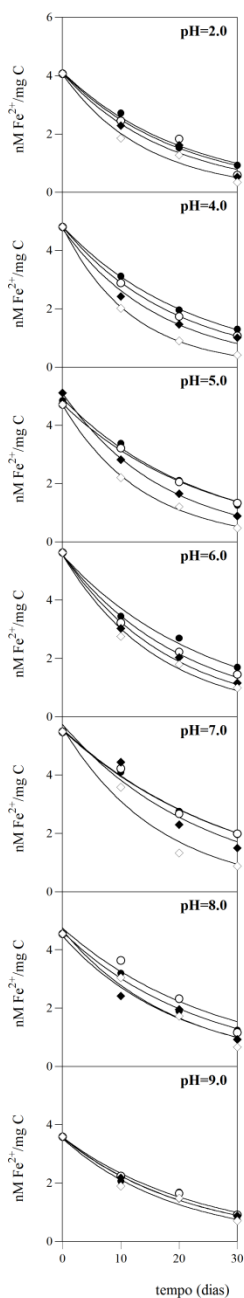


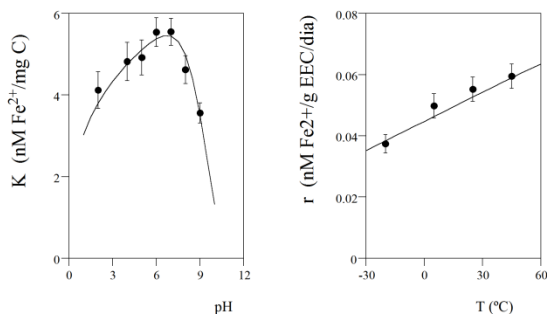
Figura 10: Estabilidade de armazenamento em pó avaliada pela atividade captadora de DPPH em função de t , T e pH . A **seção A** mostra a análise cinética individual dos efeitos na degradação dos compostos antioxidantes. Os pontos são dados experimentais (\bullet -25 °C, \circ 5 °C, \blacklozenge 25 °C, \diamond 45 °C) e as linhas (—) representam os resultados modelados usando a Eq. [8] (respostas paramétricas e coeficientes de correlação na **Tabela 8**). A **seção B** mostra o procedimento de ajuste global multivariado (trivariado): **B1** mostra os padrões paramétricos dos parâmetros cinéticos k e r da Eq [8] (os pontos são resultados univariados e as linhas são respostas multivariadas) em função das respectivas variáveis (pH afeta o parâmetro K e T afeta r); **B2** ilustra a resposta em 3D do efeito combinado das três variáveis nas melhores condições experimentais encontradas ($T = -20^{\circ}\text{C}$ e $pH = 6,7$) e **B3** mostra a correlação entre os valores experimentais e os previstos obtidos com o modelo multivariado apresentado na Eq [12].

A: ANALISE INDIVIDUAL

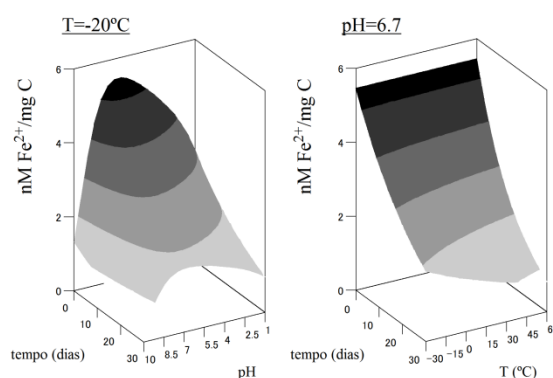


B: ANALISE MULTIVARIADA

B1: Efeitos dos parâmetros



B2: Resposta aos valores experimentais ótimos



B3: Correlação entre dados experimentais e modelados

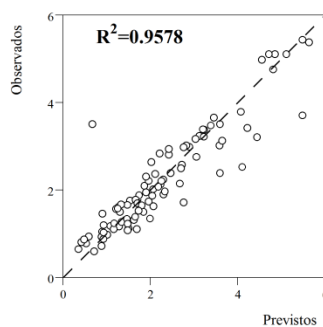


Figura 11: Estabilidade de armazenamento em pó avaliada pelo poder redutor (PR) em função de t , T e pH . A **seção A** mostra a análise cinética individual dos efeitos de degradação dos compostos antioxidantes. Os pontos são dados experimentais (\bullet -25 °C, \circ 5 °C, \blacklozenge 25 °C, \diamond 45 °C) e as linhas (—) são os resultados modelados usando a Eq. [8] (respostas paramétricas e coeficientes de correlação da **Tabela 8**). A **seção B** mostra o procedimento de ajuste global de multivariáveis (trivariado): **B1** mostra os padrões paramétricos dos parâmetros cinéticos k e r da Eq. [8] (os pontos são resultados univariados e as linhas são resultados multivariados) em função das respectivas variáveis (pH que afeta o parâmetro K e T que afeta r); **B2** ilustra a resposta em 3D do efeito combinado das três variáveis nas melhores condições experimentais encontradas ($T = -20^\circ\text{C}$ e $pH=6,7$); e **B3** mostra a correlação entre os valores experimentais e os previstos obtidos com o modelo multivariável apresentado na Eq. [12].

4.2.2. Estabilidade dos EEC em solução aquosa simulando uma matriz alimentar

As informações fornecidas pela análise da atividade antioxidante no sistema em pó não podem ser replicadas para o sistema aquoso devido aos dois intervalos de tempo que ocorreram na resposta. No sistema em pó, os dois intervalos de tempo foram amplamente separados. Os compostos deteriorados no sistema em pó foram avaliados ao longo de um período de armazenamento de 30 dias e mais 2 h necessárias à avaliação da resposta antioxidante, que não influenciaram os resultados. Em contraste, no período analisado de 24h no sistema aquoso, observaram-se não só taxas de degradação extremamente elevadas em comparação com o sistema em pó, mas também os dois intervalos de tempo sobrepuseram-se um ao outro evidenciando uma análise extrapolada. Portanto, o EEC obtido foi utilizado para investigar os efeitos de t , T e pH na estabilidade do teor de compostos (flavan-3-óis e catequina) num sistema de solução aquosa simulando um ambiente alimentar. Para todas estas respostas, a estabilidade dos compostos foi monitorizada por HPLC-DAD em sequências de tempo diferentes (1, 3, 5, 12 e 24h) e a atividade antioxidante foi descartada.

Tabela 10: Resultados dos intervalos paramétricos e de confiança de flavan-3-óis e catequina ajustados ao modelo dependente do tempo apresentada na Eq. [8] a diferentes pH e condições de T ao avaliar a estabilidade da aplicação do extrato enriquecido em catequinas (EEC).

T	pH	FLAVAN-3-ÓIS			CATEQUINA		
		$k(t)$	$r(t)$	R^2	$k(t)$	$r(t)$	R^2
		($\mu\text{g/mL}$)	(h^{-1})		($\mu\text{g/mL}$)	(h^{-1})	
25,0	3,0	300,0±29,06	0,011 ±0,003	0,9687	150,0±14,95	0,040±0,006	0,9965
25,0	5,0	300,0±29,78	0,081 ±0,024	0,9926	150,0±14,30	0,094±0,013	0,9536
25,0	7,0	300,0±30,00	3,138 ±0,941	0,9888	150,0±15,00	2,598±0,390	0,9989
25,0	9,0	300,0±30,00	7,952 ±2,386	0,9981	150,0±15,00	6,094±0,914	0,9990
40,0	3,0	300,0±26,60	0,002 ±0,001	0,8866	150,0±14,51	0,015±0,002	0,9671
40,0	5,0	300,0±29,35	0,058 ±0,017	0,9783	150,0±13,92	0,043±0,006	0,9280
40,0	7,0	300,0±30,00	2,543 ±0,763	0,9961	150,0±14,93	1,555±0,232	0,9955
40,0	9,0	300,0±30,00	6,156 ±1,847	0,9977	150,0±15,00	7,828±1,174	0,9997
55,0	3,0	300,0±30,00	0,001 ±0,000	0,9988	150,0±14,31	0,008±0,001	0,9541
55,0	5,0	300,0±29,55	0,045 ±0,013	0,9849	150,0±14,65	0,029±0,004	0,9767
55,0	7,0	300,0±30,00	1,820 ±0,546	0,9979	150,0±14,64	1,211±0,177	0,9758
55,0	9,0	300,0±30,00	5,156 ±1,547	0,9989	150,0±15,00	7,828±1,174	0,9998
70,0	3,0	300,0±12,98	0,002 ±0,000	0,4328	150,0±8,09	0,001±0,001	0,9397
70,0	5,0	300,0±28,98	0,038 ±0,011	0,9659	150,0±13,37	0,023±0,003	0,8916
70,0	7,0	300,0±30,00	1,374 ±0,412	0,9999	150,0±14,24	1,004±0,143	0,9492
70,0	9,0	300,0±30,00	4,156 ±1,247	0,9989	150,0±15,00	7,828±1,174	0,9991
85,0	3,0	300,0 ±6,42	0,000 ±0,000	0,2140	150,0±0,45	0,002±0,001	0,9301
85,0	5,0	300,0±28,70	0,033 ±0,009	0,9566	150,0±10,71	0,016±0,002	0,9141
85,0	7,0	300,0±29,99	1,085 ±0,326	0,9997	150,0±13,78	0,840±0,116	0,9190
85,0	9,0	300,0±30,00	3,545 ±1,064	0,9991	150,0±15,00	6,131±0,920	0,9991

A análise gráfica individual dos resultados de estabilidade do teor de flavan-3-óis e catequina do EEC em função do tempo, do pH e da T apresenta-se na Secção A da **Figura 12** e **Figura 13**, respetivamente. Cada gráfico mostra os efeitos da degradação no tempo (0-24h) de cada T testada (25, 40, 55, 70 e 80°C). Os pontos são dados experimentais dos diferentes pH s testados (● 3, ○ 5, ◆ 7 e ◇ 9) e as linhas (—) são resultados previstos pela Eq. [8]. Os resultados paramétricos e os coeficientes de correlação apresentam-se na **Tabela 10**. Ao contrário do estudo anterior de estabilidade, o teor de compostos (flavan-3-óis e catequina) foi idêntico em todos os casos, portanto, o parâmetro K de Eq. [8] não foi alterado em função de qualquer variável e permaneceu constante (300 μg flavan-3-óis/mL EEC e 150 μg catequina/mL EEC). Para descrever estes efeitos numa forma multivariada, o parâmetro da velocidade de degradação (r) converte todos os efeitos de perturbações causadas pelas variáveis T e pH . Os aumentos em unidades de T e pH causa um aumento exponencial na taxa de degradação dos compostos do EEC. O efeito T segue a definição do conceito de Arrhenius apresentado na Eq.[9]. No entanto, os efeitos do pH não podem ser descritos como anteriormente, com uma função de perfil sino, devido, como dito anteriormente, ao facto dos mecanismos que regem o efeito do pH sobre as reações químicas de base ou organismos vivos complexos serem diferentes e heterogéneos. Para o caso particular da estabilidade dos compostos do EEC em sistema aquoso, o efeito do pH segue uma relação exponencial como descrito pela Eq. [11]. Por conseguinte, foi desenvolvido um modelo multivariado global que controla o efeito de t , T e pH sobre a estabilidade no sistema aquoso, através da substituição do parâmetro r da Eq. [8] com as equações que governam o efeito de T (Eq. [9]) e do pH (Eq. [11]), como se segue:

$$e(t, pH, T) = k \exp\left(-p \exp\left(-\frac{Ea}{RT} + bpH\right)t\right) \quad [19]$$

Quando se substitui o parâmetro r multiplicativo pelo resultado da Eq. [9] e [11], a expressão inclui um fator pré-exponencial (A e s) e a sua utilização em conjunto será redundante, surgindo portanto, um novo fator que é denominado por p . Todas as outras notações paramétricas foram definidas na secção Material e Métodos. A secção B da **Figura 12** e **Figura 13** mostram os resultados do ajuste das multivariáveis globais da aplicação da Eq. [19] para descrever os dados multivariados completos. Os resultados paramétricos são para os flavan-3-óis ($k=300.0\pm 6.1$; $p=40.21\times 10^{-6}$; $Ea=19.37$; $b=67.31$) e para a catequina ($k=150.0\pm 8.5$; $p=40.21\times 10^{-6}$; $Ea=21.93$; $b=64.09$). Em todos os casos, a descrição estatística foi significativa e a predição da estabilidade dos

compostos do EEC em solução, pela Eq. [19], mostrou valores altamente consistentes de R^2 para flavan-3-óis ($R^2 = 0,9629$) e catequina ($R^2 = 0,9585$). A Subsecção B1 mostra o padrão paramétrico de superfície da cinética r como uma função das respectivas variáveis que a afetam (T e pH). As conclusões estão em concordância com os resultados anteriores obtidos no sistema em pó e dados descritos anteriormente (Li et al., 2012; Komatsu et al., 2014; Li et al., 2011), considerando que a $T < 20^\circ\text{C}$ e $pH < 4,5$ o EEC é mais estável reduzindo, tanto quanto possível, a taxa de degradação de flavan-3-óis e catequina.

Tal como no sistema em pó, os flavan-3-óis e a catequina do EEC em solução aquosa provaram ser fundamentalmente dependentes do pH . A valores de pH superior a 7 os teores de flavan-3-óis e de catequina diminuíram em poucos minutos independentemente de T . Este fenómeno também foi descrito por outros autores que estudaram a estabilidade da catequina e derivados noutras matrizes nomeadamente, chá verde e cacau (Komatsu et al., 2014; Li et al., 2012; Zhu et al., 1997; Zhu et al., 2002). Similarmente, outros autores (Li et al., 2012) indicaram que a catequina de extratos enriquecidos em solução aquosa se manteve estável a pH 4 e a temperaturas abaixo de 30°C durante um período de 24h. Mesmo em condições térmicas elevadas (85°C) a valores de pH mais baixos do que 4, os flavan-3-óis e a catequina foram detetados por um período de 1h, sem grandes perdas. Estes resultados podem limitar a aplicação direta do EEC, favorecendo a sua utilização em alimentos ácidos como alguns queijos, sumos de fruta, produtos vegetais/fruta, maioneses e iogurtes (Food Ingredients Brasil, 2008).

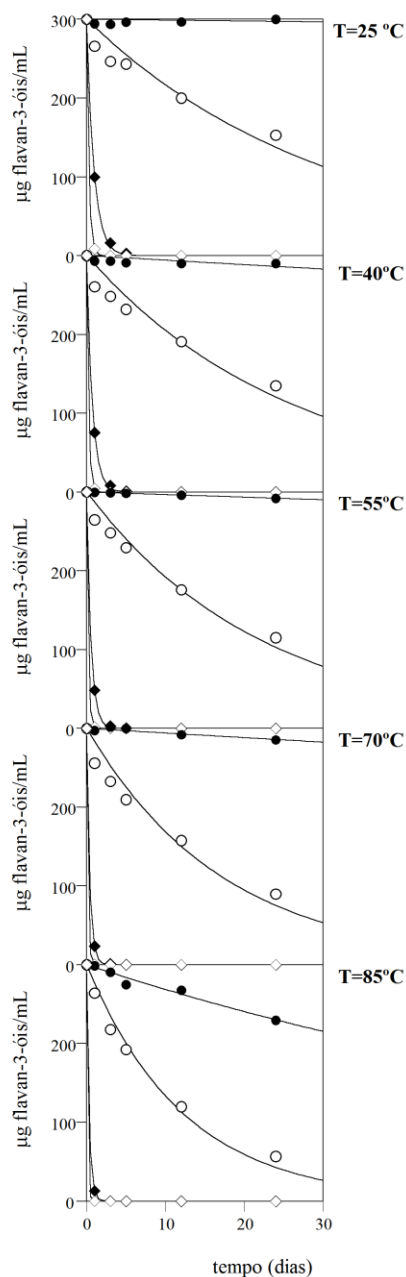
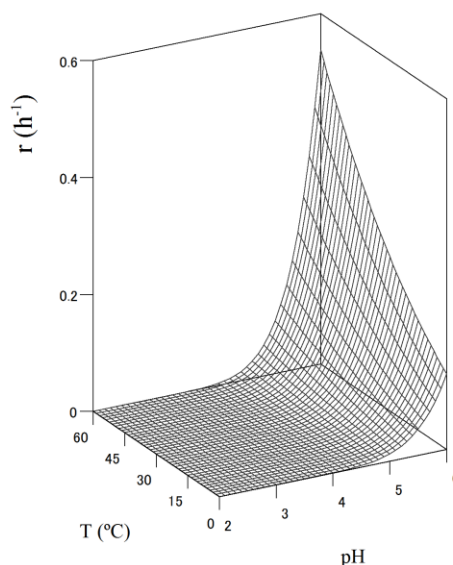
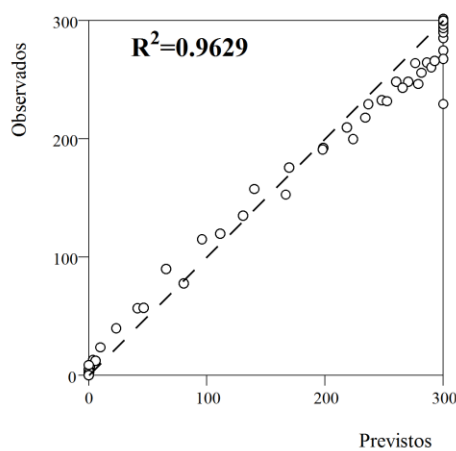
A: ANALISE INDIVIDUAL**B: ANALISE MULTIVARIADA****B1: Efeito do parâmetro****B2: Experimentais vs modelados**

Figura 12: Estabilidade dos flavan-3-óis em sistemas de solução aquosa que simula matrizes alimentares. A **seção A** mostra a análise gráfica dependente do tempo dos resultados de estabilidade com base no teor de flavan-3-óis em função de T e de pH . Cada gráfico mostra os efeitos na degradação ao longo do tempo (0-24h) de cada T testada (25, 40, 55, 70 e 80 °C). Os pontos são os dados experimentais dos diferentes pH s testados (● 3, ○ 5, ◆ 7 and ◇ 9) e as linhas (—) representam os resultados previstos pela Eq. [8]. Os resultados paramétricos e os coeficientes de correlação são apresentados na **Tabela 10**. A parte **B** mostra os resultados da aplicação do procedimento global multivariável descrito na Eq. [19]: **B1** mostra o padrão de superfície paramétrica da cinética r em função das respectivas variáveis que o afetam (pH e T); e **B2** mostra a correlação entre os valores experimentais e os previstos obtidos com o modelo multivariável apresentado na Eq. [19].

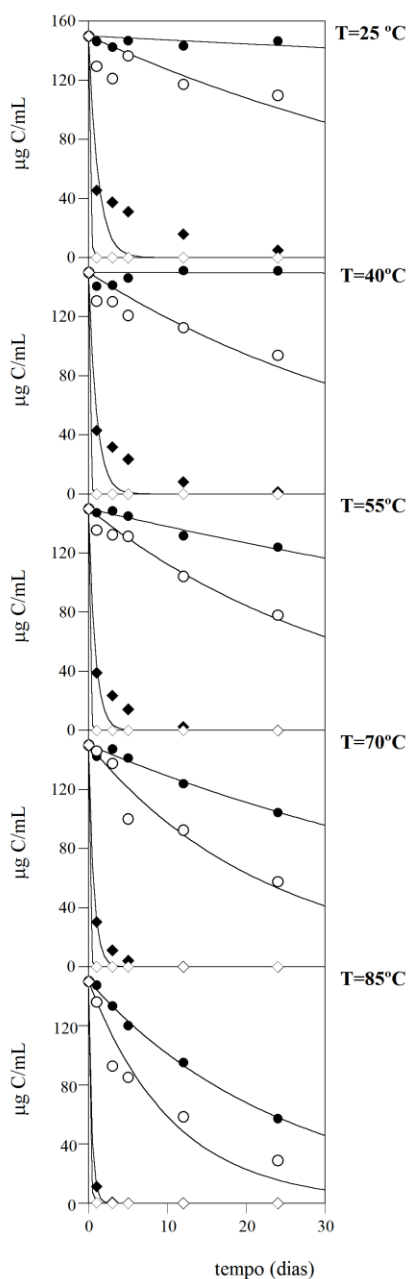
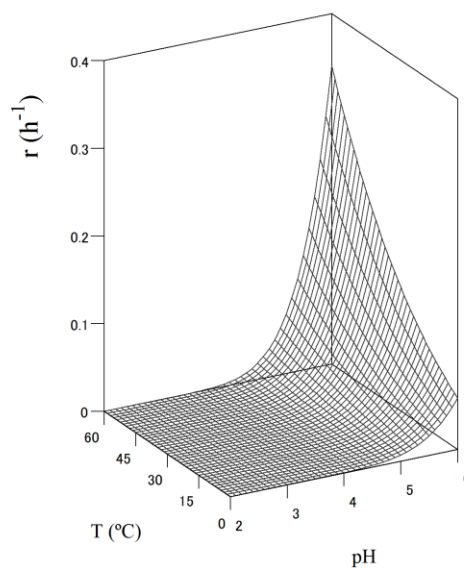
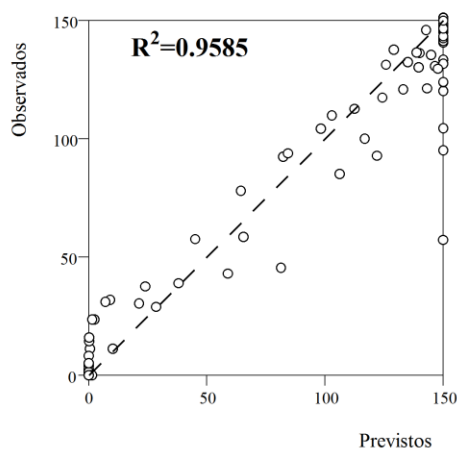
A: ANALISE INDIVIDUAL**B: ANALISE MULTIVARIADA****B1: Efeito do parâmetro****B2: Experimentais vs modelados**

Figura 13: Estabilidade da catequina em sistemas de solução aquosa que simula matrizes alimentares. A **secção A** mostra a análise gráfica dependente do tempo individual dos resultados de estabilidade com base no teor de catequina em função de T e de pH . Cada gráfico mostra os efeitos da degradação ao longo do tempo (0-24h) de cada T testada (25, 40, 55, 70 e 80 °C). Os pontos são os dados experimentais dos diferentes pH s testados (\bullet 3, \circ 5, \blacklozenge 7 and \diamond 9) e as linhas (—) são os resultados previstos pela Eq. [8]. Os resultados paramétricos e coeficientes de correlação são apresentados na **Tabela 10**. A **secção B** mostra os resultados multivariáveis globais da aplicação da Eq. [19] para descrever os dados multivariáveis: **B1** mostra a superfície padrão de paramétrica da cinética r em função das respectivas variáveis que o afetam (pH e T); e **B2** mostra a correlação entre os valores experimentais e os previstos obtidos com o modelo multivariável apresentado na Eq. [19].

5. CONCLUSÃO

As técnicas de ME, MAE e UAE foram comparadas e otimizadas para a obtenção de extratos enriquecidos em catequina a partir de frutos de *A. unedo*. Estas técnicas baseiam-se em procedimentos de extração sólido-líquido e são amplamente aplicadas à extração de catequina de diferentes fontes naturais (Mieszczakowska-Fraç et al., 2015; García-Marino et al., 2006; Palma & Taylor, 1999; Meullemiestre et al., 2016; Pingret et al., 2012; Ghasemzadeh et al., 2014; Piñeiro et al., 2004). Embora a bibliografia científica disponível descreva já a utilização de algumas destas técnicas na extração de catequina de diferentes fontes, não há referências na literatura que descrevem a otimização da sua extração a partir *A. unedo*. Os frutos desta espécie têm sido pouco explorados, mas podem constituir uma boa fonte de compostos bioativos, nomeadamente flavan-3-óis, incluindo catequinas.

O processo de extração foi otimizado com sucesso através da aplicação da MSR, com o objetivo de atingir um rendimento máximo de catequina. Os resultados mostraram que o tempo de extração, a temperatura e a razão água:etanol do solvente tiveram um efeito significativo nos rendimentos obtidos para cada técnica aplicada. Os métodos de ME e MAE foram os mais eficazes, capazes de produzir $1,38 \pm 0,1$ e $1,70 \pm 0,3$ mg catequina/g ms em condições ótimas de extração. A MAE ofereceu um maior rendimento ótimo em menor período de tempo quando comparada às outras técnicas. No entanto, as temperaturas mais baixas de extração eficiente foram encontradas com a ME, sendo semelhantes os rendimentos obtidos com ambas as técnicas.

Este trabalho destaca uma nova alternativa de obtenção de catequina para futuras aplicações como aditivos alimentares, ou até mesmo noutros sectores, nomeadamente em suplementos alimentares e cosméticos. Os frutos de medronho têm a vantagem de estarem distribuídos por quase toda a região do Mediterrâneo e poderem então sofrer processos de extração ambientalmente viáveis realizados por tecnologias "verdes". Os resultados obtidos indicam a viabilidade do uso dos frutos de *A. unedo* como fonte de produção de catequina por qualquer uma das técnicas avaliadas e fornecem evidência das vantagens das técnicas de maceração, micro-ondas e ultrassons para a sua expansão a uma escala industrial.

Considerando a atividade antioxidante dos flavan-3-óis (incluindo catequina) e o seu potencial de utilização como aditivo alimentar, é muito importante garantir a

estabilidade dos compostos ao longo do armazenamento para uma possível comercialização de extratos enriquecidos em pó.

A análise da estabilidade dos compostos flavan-3-óis e catequina, obtidos a partir do fruto de *A. unedo*, é crucial para a previsão do tempo de prateleira desses compostos e do seu comportamento em várias condições de processamento. Na realidade, o processamento de alimentos incluem diversos fatores que afetam diretamente a integridade das moléculas. O controlo das condições de t , T e pH , entre outros, são aspetos essenciais para manter a eficiência dos processos e para a obtenção de produtos de alta qualidade. A degradação dos flavan-3-óis e da catequina no sistema em pó mostrou um comportamento diferente do observado em soluções aquosas. Os resultados mostraram que os sistemas em pó são mais estáveis. Foram desenvolvidos vários modelos matemáticos e gráficos que ilustrassem os valores ótimos das variáveis independentes estudadas. Assim, os modelos cinéticos podem ser utilizados para prever o tempo de prateleira e estabilidade dos compostos em determinadas condições de pH e T para sistemas em pó e aquosos. As condições ótimas para garantir a estabilidade dos flavan-3-óis (incluindo catequina) em sistemas em pó foram obtidas a $pH=5,4$ e $T=20^{\circ}C$ durante um mês, enquanto que em solução aquosa foram a $pH < 4$ e $T < 30^{\circ}C$ pelo menos durante 24h. As elevadas correlações significativas e os intervalos de confiança dos parâmetros estudados foram sempre determinados. Assim, propõe-se que estes modelos cinéticos semi-empíricos possam ser aplicados para prever os efeitos de T e de pH no tempo de prateleira dos compostos em sistemas em pó e aquosos.

Em geral, os frutos de *A. Unedo* podem ser considerados uma fonte de flavan-3-óis, em particular catequina e seus derivados. Estes compostos apresentam uma boa estabilidade o que suscita o interesse de novos estudos baseados na aplicação do extrato enriquecido em compostos bioativos (flavan-3-óis e catequina) em matrizes alimentares reais e avaliando o seu poder conservante quando associado às particularidades das matrizes testadas (como por exemplo, aplicação em iogurtes, sumos e derivados de carne). Estes compostos são também conhecidos por terem uma grande variedade de aplicações em produtos farmacêuticos, cosméticos e suplementos alimentares. Em suma, o presente estudo valorizou a utilização de frutos de medronho como fonte de extratos ricos em flavan-3-óis para muitas das aplicações mencionadas.

REFERÊNCIAS

- Abdulmumeen, H.A., Risikat, A.N. & Sururah, A.R., 2012. Food: Its preservatives, additives and applications. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 1, pp.36–47.
- Alarcão-E-Silva, M.L.C.M.M. et al., 2001. The Arbutus berry: studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, pp.27–35.
- Alonso-Salces, R.M. et al., 2001. Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. *Journal of Chromatography A*, 933(1-2), pp.37–43.
- Aron, P.M. & Kennedy, J.A., 2008. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(1), pp.79–104.
- Barros, L. et al., 2010. Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120(1), pp.247–254.
- Behling, E.B. et al., 2004. Flavonóide Quercetina : Aspectos Gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition*, 15(3), pp.285–292.
- Bezerra, M.A. et al., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, pp.965–977.
- Box, G. & Hunter, J., 1957. Multi-factor experimental designs for exploring response surfaces. *The Annals of Mathematical Statistics*, 28(1), pp.195–241.
- Box, G.E.P., Hunter, J.S. & Hunter, W.G., 2005. *Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery*, 2nd Edition,
- Branen, A.L. et al., 2001. *Food Additives* 2^o ed. L. A. Branem et al., New York: Marcel Dekker, Inc., p.953.
- Branen, A.L., 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 52(2), pp.59–63.
- Bronzwaer, S., 2008. ESFA scientific forum “from safe food to healthy diets”. EU risk assessment - past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 19(1), pp.2–8.
- Caleja, C. et al., 2015. *Foeniculum vulgare* Mill. as natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese. *Journal of Functional Foods*, 12, pp.428–438.
- Carocho, M. et al., 2014. Adding molecules to food, pros and cons: a review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), pp.377–399.
- Carocho, M. & Ferreira, I.C.F.R., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51, pp.15–25..
- Carocho, M., Morales, P. & Ferreira, I.C.F.R., 2015. Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), pp.284–295.

- Chen, Z., Zhang, L. & Chen, G., 2008. Microwave-assisted extraction followed by capillary electrophoresis-amperometric detection for the determination of antioxidant constituents in *Folium Eriobotryae*. *Journal of Chromatography A*, 1193(1-2), pp.178–181.
- Comuzzi, C. et al., 2003. SOLVERSTAT: A new utility for multipurpose analysis. An application to the investigation of dioxygenated Co(II) complex formation in dimethylsulfoxide solution. *Talanta*, 59(1), pp.67–80.
- Dai, J. & Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), pp.7313–7352.
- Devcich, D.A., Pedersen, I.K. & Petrie, K.J., 2007. You eat what you are: modern health worries and the acceptance of natural and synthetic additives in functional foods. *Appetite*, 48(3), pp.333–337.
- Dias, M.I. et al., 2015. A bioactive formulation based on *Fragaria vesca* L. vegetative parts: Chemical characterisation and application in K-carrageenan gelatin. *Journal of Functional Foods*, 16, pp.243–255.
- Dimitrios, B., 2006. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, 17(9), pp.505–512.
- Dolatabadi, J.E.N. & Kashanian, S., 2010. A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. *Food Research International*, 43(5), pp.1223–1230. .
- EFSA, 2016. Food Additives. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/additives>. Acesso em: fev. 2016.
- EFSA, 2004. Opinion of the Scientific Panel on food additives , flavourings , processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to tertiary-butylhydroquinone (TBHQ) Question number EFSA-Q-2003-141. *EFSA Journal*, 84, pp.1–50.
- EFSA, 2015. Safety and efficacy of ethoxyquin (6-ethoxy-1,2-dihydro-2,2,4-trimethylquinoline) for all animal species. *EFSA Journal*, 13(11), p.4272.
- EFSA, 2014. Scientific Opinion on the re-evaluation of 4-hexylresorcinol (E 586) as a food additive. *EFSA Journal*, 12(4), p.3643.
- European Commission, 2016. Health and food safety health claims. *European Commission*, (257), p.2020.
- FAO, 2016. Chemical risks and JECFA. *Food safety and quality*, pp.1–2.
- FAO/WHO, 2006. *Understanding the codex Alimentarius*. 30^a ed. FAO, Roma, p. 19.
- Fennema, R., 1987. Food additives-an. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 46, pp.201–203.
- Ferreira, S.L.C. et al., 2007. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), pp.179–186.
- Food Ingredients Brasil, 2008. Segurança alimentar. *Food Ingredients Brasil*, pp.32–43.
- Forum Florestal, 2012. Estudo económico de desenvolvimento da fileira da castanha. , p.44.
- Frankel, E.N., 1989. The antioxidant and nutritional effects of tocopherols, ascorbic acid and beta-carotene in relation to processing of edible oils. *Bibliotheca Nutritio et Dieta*, 43, pp.297–312.

- Frauen, M. et al., 2002. Determination of green-tea catechins in cosmetic formulations and in in-vitro skin extracts by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Chromatographia*, 55, pp.43–48.
- Gadkari, P.V. & Balaraman, M., 2015. Catechins: sources, extraction and encapsulation: A review. *Food and Bioproducts Processing*, 93, pp.122–138.
- Ganhão, R. et al., 2010. Characterization of selected wild mediterranean fruits and comparative efficacy as inhibitors of oxidative reactions in emulsified raw pork burger patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), pp.8854–8861.
- Garavand, F., Madadlou, A. & Moini, S., 2015. Determination of phenolic profile and antioxidant activity of pistachio hull using HPLC-DAD-ESI-MS as affected by ultrasound and microwave. *International Journal of Food Properties*.
- García-Marino, M. et al., 2006. Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2 SPEC. ISS.), pp.44–50.
- Ghasemzadeh, A. et al., 2014. Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoid compounds and their pharmaceutical activity from curry leaf (*Murraya koenigii* L.) using response surface methodology. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(318), pp.1–10.
- Guimarães, R. et al., 2014. Bioactivity of different enriched phenolic extracts of wild fruits from Northeastern Portugal: a comparative study. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(1), pp.37–42.
- Guimarães, R. et al., 2013a. Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry*, 141, pp.3721–3730.
- Guimarães, R. et al., 2013b. Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry*, 141(4), pp.3721–3730.
- Gupta, V. & Sharma, S., 2006. Plants as natural antioxidants. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 5(4), pp.326–334.
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), pp.1147–1150.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C., 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1), pp.125–126.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. & Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), pp.572–584.
- Heleno, S.A. et al., 2016. Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. *Food chemistry*, 197 Pt B, pp.1054–63.
- Herrera, M.C. & Luque De Castro, M.D., 2004. Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379(7-8), pp.1106–1112.
- Higdon, J. V & Frei, B., 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical reviews in food science and*

- nutrition*, 43(1), pp.89–143.
- Hirasawa, M. & Takada, K., 2004. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2), pp.225–229.
- Ince, A.E., Şahin, S. & Şümnü, S.G., 2013. Extraction of phenolic compounds from melissa using microwave and ultrasound. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37(1), pp.69–75.
- Isbilir, S.S. et al., 2012. Determination of antioxidant activities of Strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) flowers and fruits at different ripening stages. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 11(3), pp.223–237.
- Jayathilakan, K. et al., 2007. Antioxidant potential of synthetic and natural antioxidants and its effect on warmed-over-flavour in different species of meat. *Food Chemistry*, 105(3), pp.908–916.
- Kalil, S. & Maugeri, F., 2000. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Process Biochemistry*, 35, pp.539–550.
- Kemmer, G. & Keller, S., 2010. Nonlinear least-squares data fitting in Excel spreadsheets. *Nature protocols*, 5(2), pp.267–281.
- Khlebnikov, A.I. et al., 2007. Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(4), pp.1749–70.
- Komatsu, Y. et al., 2014. Effects of pH and temperature on reaction kinetics of catechins in green tea infusion. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57(6), pp.907–910.
- Li, N. et al., 2012. Kinetic study of catechin stability: effects of pH, concentration, and temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(51), pp.12531–12539.
- Li, N., Taylor, L.S. & Mauer, L.J., 2011. Degradation kinetics of catechins in green tea powder: effects of temperature and relative humidity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), pp.6082–6090.
- Lotito, S.B. & Fraga, C.G., 1998. (+)-Catechin prevents human plasma oxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(3), pp.435–441.
- Lucera, A. et al., 2012. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 3, pp.1–13.
- Males, Z. et al., 2006. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree - *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Pharmaceutica*, 56(2), pp.245–250.
- Manach, C., 2004. Polyphenols : food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, pp.727 – 747.
- Marais, J.P.J. et al., 2006. The stereochemistry of flavonoids. In *The Science of Flavonoids*. pp. 1–46.
- Di Marco, V.B. & Bombi, G.G., 2001. Mathematical functions for the representation of chromatographic peaks. *Journal of chromatography*, 931(1-2), pp.1–30.
- May, S., 2006. Advanced Excel® for Scientific Data Analysis by R. De Levie. *Biometrics*, 62(1), pp.303–304.

- McCarthy, T.L. et al., 2001. Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin e in raw and cooked pork patties. *Meat Science*, 58(1), pp.45–52.
- Meullemiestre, A. et al., 2016. Impact of ultrasound on solid-liquid extraction of phenolic compounds from maritime pine sawdust waste. kinetics, optimization and large scale experiments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 28, pp.230–239.
- Mieszczakowska-Fraç, M., Dyki, B. & Konopacka, D., 2015. Effects of ultrasound on polyphenol retention in apples after the application of predrying treatments in liquid medium. *Food and Bioprocess Technology*, pp.1–10.
- Miguel, M.G. et al., 2014. *Arbutus unedo* L.: chemical and biological properties. *Molecules*, 19(10), pp.1579–15823.
- Monagas, M. et al., 2003. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), pp.6475–6481.
- Moreira, A.V.B. & Mancini-Filho, J., 2004. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Revista de Nutrição*, 17(4), pp.411–424.
- Murado García, M.A. & Prieto Lage, M.Á., 2013. Dose-response analysis in the joint action of two effectors. a new approach to simulation, identification and modelling of some basic interactions. *Plos one*, 8(4).
- Nagao, T. et al., 2009. A catechin-rich beverage improves obesity and blood glucose control in patients with type 2 diabetes. *Obesity*, 17(2), pp.310–317.
- Nanditha, B. & Prabhasankar, P., 2010. Antioxidants in bakery goods. *Food Engineering and Ingredients*, 35(1), pp.16–18.
- Pallauf, K. et al., 2008. Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(4), pp.273–281.
- Palma, M. & Taylor, L.T., 1999. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A*, 849(1), pp.117–124.
- Parlamento Europeu, 2008. Regulamento (CE) N.o 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos aditivos alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia*, 2007, pp.16–33.
- Pedro, J.G., 1994. *Carta da distribuição de figueira e medronheiro*, Lisboa: Qualigrafe, p. 39.
- Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), pp.1035–1042.
- Piñeiro, Z., Palma, M. & Barroso, C.G., 2004. Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids. *Journal of Chromatography A*, 1026(1-2), pp.19–23.
- Pinela, J. et al., 2012. Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmer' varieties in Northeastern Portugal homegardens. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4), pp.829–834.

- Pinela, J. et al., 2016. Optimization of microwave-assisted extraction of hydrophilic and lipophilic antioxidants from a surplus tomato crop by response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*, 98, pp.283–298.
- Pingret, D. et al., 2012. Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*, 111(1), pp.73–81.
- Pratt, D.E. & Birac, P.M., 1979. Source of antioxidant activity of soybean and soy products. *Journal of Food Science*, 44(6), pp.1720–1722.
- Prieto, M. et al., 2015. An efficient methodology for quantification of synergy and antagonism in single electron transfer antioxidant assays. *Food Research International*, 67, pp.284–298.
- Prieto, M.A. & Murado, M.A., 2014. Oversimplification and overstandardization in biological methods: sperm bioassays in ecotoxicology as a case of study and a proposal for their reformulation, *The Scientific World Journal*, p.13.
- Prieto, M.A., Vázquez, J.A. & Murado, M.A., 2012a. A simple pseudo-mechanistic model for the response characterization and quantification of the copper-induced oxidative LDL method. *Free Radical Biology and Medicine*, 53, p.S245.
- Prieto, M.A., Vázquez, J.A. & Murado, M.A., 2012b. Comparison of several mathematical models for describing the joint effect of temperature and ph on glucanex activity. *Biotechnology Progress*, 28(2), pp.372–381.
- Proestos, C. & Komaitis, M., 2008. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *Food Science and Technology*, 41(4), pp.652–659.
- Ribeiro, A. et al., 2015. Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients. *Food Chemistry*, 188, pp.612–618.
- Rosso, L., Lobry, J.R. & Bajard, S., 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), pp.610–616.
- Ruiz-Rodríguez, B.-M. et al., 2011. Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Research International*, 44(5), pp.1244–1253.
- Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, 1997. *Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997*,
- Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P., 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, pp.67–103.
- Shakar, S. et al., 2008. EGCG inhibits growth, invasion, angiogenesis and metastasis of pancreatic cancer. *Frontiers in Bioscience*, 13(2), pp.440–452.
- Shi, P. & Tsai, C. L., 2002. Regression model selection: A Residual likelihood approach. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Statistical Methodology)*, 64(2), pp. 237–252.
- Soares, S.E., 2002. Ácidos Fenólicos como Antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15(1), pp.71–81.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. & Cliver, D.O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), pp.1199–1218.

- Tijsskens, L.M.M. et al., 1997. The kinetics of pectin methyl esterase in potatoes and carrots during blanching. *Journal of Food Engineering*, 34(4), pp.371–385.
- Tobergte, D.R. & Curtis, S., 2013. *Nano- and microencapsulation for foods* H.-S. Kwak, 9 ed., Sejong University: JohnWiley& Sons.
- Vidrih, R. et al., 2013. The physico-chemical properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Croatian Journal Food Science technology*, 5(1), pp.29–33.
- Volf, I. et al., 2014. Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. *Chemical Papers*, 68(1), pp.121–129.
- Vuong, Q. V. et al., 2011. Optimizing conditions for the extraction of catechins from green tea using hot water. *Journal of Separation Science*, 34(21), pp.3099–3106.
- Wang, H., Provan, G.J. & Helliwell, K., 2000. Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 11(4-5), pp.152–160.
- Zaveri, N.T., 2006. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life sciences*, 78(18), pp.2073–2080.
- Zhang, Z. et al., 2012. Optimisation of the microwave-assisted extraction process for six phenolic compounds in *Agaricus blazei* murrill. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(1), pp.24–31.
- Zhu, Q.Y. et al., 1997. Stability of green tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), pp.4624–4628.
- Zhu, Q.Y. et al., 2002. Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), pp.1700–1705.

Este trabalho deu origem a:

- 1) Albuquerque et al. 2016. PART I: Comparison and optimization of maceration/microwave/ultrasound extraction techniques for the production of a catechin extract from *Arbutus unedo* L. fruits using response surface methodology. *Submetido numa revista científica internacional indexada*

- 2) Albuquerque et al. 2016. PART II: Assessment of the stability of catechin-enriched extracts obtained from *Arbutus unedo* L. fruits: Kinetic mathematical modeling of pH and temperature effects on powder and solution systems. *Submetido numa revista científica internacional indexada.*

- 3) Albuquerque et al. Development of a natural preservative based on catechin and derivatives from plant origin. Aceite para comunicação oral no I International Conference on Research for Sustainable Development in Mountain Regions, no *Symposium: New alternative sources of natural additives for food and cosmetic applications*. 5-7 Outubro 2016, Bragança, Portugal.