

2013



Instituto Superior de
Engenharia do Porto

Mestrado em Engenharia Química – Ramo de Tecnologias de
Proteção Ambiental

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO- LÍQUIDO DE ANTIOXIDANTES DE SUBPRODUTOS FLORESTAIS PELO MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Andreia Luísa Rodrigues Coelho

Orientação: Doutora Cristina Matos (ISEP)
Doutora Fátima Barroso (ISEP)
Doutora Manuela Correia (ISEP)
Doutora Teresa Oliveira (WeDoTech)

Agradecimentos

Começo por expressar o meu profundo agradecimento às minhas orientadoras: Doutora Cristina Matos, Doutora Maria Fátima Barroso, Doutora Manuela Correia e Doutora Teresa Oliveira, pelo suporte e apoio incondicional prestados e por todo o conhecimento transmitido.

À minha mais que amiga, Andreia Rocha por ter aguentado todos os mesmos devaneios emocionais, ela que é a figuração da verdadeira amizade.

À minha querida amiga e companheira, Andreia Reis, por ter ocupado todas as suas horas livres para me ajudar. E aos meus companheiros de laboratório, Vitor e Sofia, pois apesar de recentes, tiveram sempre a capacidade de tornar os meus dias mais fáceis.

À minha inestimável amiga Diana Cruz, porque os amigos são a família que nós escolhemos.

Um especial obrigado aos meus pais, aos meus irmãos e à minha avó por terem aguentado a minha ausência e porque me amarem incondicionalmente.

Mojemu Piotrusiowi, za miłość i wsparcie, nawet będąc daleko zawsze czuję, że jesteś przy mnie.

E por último, ao ISEP, instituição que me acolheu e ao GRAQ e a todos aqueles que a este grupo pertencem, por me terem ajudado a crescer tanto a nível académico como a nível pessoal.

Resumo

Portugal continental apresenta uma vasta área florestal, que representa cerca de 35,4% da ocupação total do solo, com predominância de espécies como o eucalipto (*Eucalyptus globulus*) e o pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*). Estas espécies apresentam uma elevada importância a nível económico, designadamente devido à sua ampla utilização, nomeadamente na indústria de celulose e papel, gerando elevadas quantidades de resíduos. Este resíduo de biomassa florestal é utilizado, na sua totalidade, para a geração de energia, na forma de eletricidade ou aquecimento. No entanto, existem outras opções viáveis, a nível económico, tais como a valorização destes subprodutos como fonte de compostos polifenólicos tornando-os, assim, um produto de valor acrescentado.

A extração de compostos fenólicos de subprodutos florestais, como folhas de eucalipto e agulhas de pinheiros tem vindo a aumentar devido, principalmente, à substituição de antioxidantes sintéticos, contribuindo para a valorização de subprodutos florestais. Contudo, apesar de todas as potenciais aplicações e vantagens, apenas algumas centenas de espécies aromáticas identificadas são utilizadas à escala comercial.

Neste trabalho foi avaliada a capacidade antioxidante de subprodutos da floresta, otimizando as condições de extração através do estudo dos fatores: tempo de extração, temperatura e composição de solvente através do método de superfície de resposta.

O planeamento experimental utilizado teve como base um planeamento de compósito central e a avaliação do perfil de antioxidantes das matrizes analisadas foi realizada através de métodos de quantificação total, como o teor fenólico total, a atividade anti-radicalar – método do DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) e o método de FRAP. Estes métodos analíticos convencionais foram modificados e, devidamente validados, para a análise em leitor de microplacas.

Verificou-se que os extratos de pinheiro e de eucalipto, tanto as amostras verdes com as amostras, apresentam uma promissora capacidade antioxidante. O planeamento fatorial aplicado permitiu otimizar as condições de extração em relação às matrizes verdes. Contudo, o mesmo não se verificou em relação às matrizes secas.

A composição (% de água) é sem dúvida o fator com mais efeito em todas as amostras (coeficientes de primeira e segunda ordem no modelo). Também a temperatura foi identificada como um fator com efeito significativo sobre os sistemas em análise.

Palavras-chave: biomassa florestal, valorização, antioxidantes, planeamento fatorial, superfície de resposta, planeamento de compósito central.

Abstract

Portugal mainland has a vast forest area, that represents about 35,4 % of the total ground occupation, with predominance of species like the eucalyptus and the pine. These species present a high importance in the economy, mainly due to its wide use, particularly in the pulp and paper industry, creating huge quantities of waste material.

This residual waste of forest biomass is used, in its totality, in energy generation, as electricity or heat generation. However, there are other viable options, economically, such as the valorization of these byproducts as source of polyphenolic compounds thus making them a product with added value.

The extraction of polyphenolic compounds from forest byproducts, such as eucalyptus leaves and pine needles, has been increasing mainly due to the replacement of synthetic antioxidants, contributing to the valorization of forest byproducts. However, despite of all the potential applications and advantages, only a few hundreds of identified aromatic species are used on a commercial scale.

In this work, forest byproducts antioxidant capacity have been evaluated, by optimizing the extraction conditions through the study of the following factors: extraction time, temperature and solvent composition through the response surface method.

The experimental design used was based on a central composite design and the antioxidant evaluation of the analyzed matrices was performed through methods of total quantification, such as the total phenolic content, the radical scavenging assay – DPPH method 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical and the FRAP method. These conventional analytical methods were modified and properly validated for microplate reader analysis.

It was verified that the pine and eucalyptus extracts, both fresh and dry samples, present a promising antioxidant capacity. The applied factorial design allowed the optimization of the extraction conditions regarding the green matrices. However, the same did not happen in relation to the dry matrices.

The composition (percentage of water) is arguably the most influential factor in all samples (first and second order coefficients in the model). The temperature was also identified as a factor with a significant influence over the analyzed systems.

Keywords: forest biomass, recovery, antioxidants, total antioxidant capacity, factorial design, response surface, central composite design.

Índice

1	Introdução	3
1.1	Áreas de uso de solo em Portugal continental.....	3
1.2	Espécies florestais	4
1.3	Valorização de produtos florestais.....	5
1.4	Antioxidantes.....	8
1.4.1	Compostos fenólicos	11
1.4.1.1	Ácidos fenólicos	11
1.4.1.2	Flavonoides.....	12
1.5	Métodos de extração de antioxidantes	13
1.5.1	Extração por solvente.....	14
1.5.1.1	Extração sólido-líquido	14
1.5.1.2	Extração líquido-líquido.....	15
1.5.2	Extração por digestão	16
1.5.3	Extração sob refluxo	16
1.5.4	Extração assistida por micro-ondas.....	16
1.5.5	Extração assistida por micro-ondas com solvente focalizado	17
1.5.6	Extração com líquido pressurizado.....	17
1.5.7	Extração com fluidos supercríticos	18
1.5.8	Extração por ultrassons.....	18
1.6	Planeamento Experimental	21
1.6.1	Definição de Planeamento Experimental.....	21
1.6.2	Otimização e modelos ótimos	21
1.6.3	Metodologia da superfície de resposta.....	22
1.6.4	O Planeamento fatorial.....	22
1.6.5	Planeamentos sequenciais	24
1.6.6	Planeamentos simultâneos	26
1.6.6.1	Planeamentos para análise do efeito de fatores experimentais.....	27

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE ANTIOXIDANTES DE SUBPRODUTOS
FLORESTAIS PELO MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

1.6.6.2	Planeamentos para definir superfícies de resposta.....	29
1.6.7	Regressão múltipla	30
1.6.7.1	Estimativa dos coeficientes da regressão.....	31
1.6.7.2	Coeficientes da regressão e efeito dos fatores.....	32
1.6.7.3	Análise do modelo.....	33
1.6.7.4	Validação do método	37
1.7	Avaliação da capacidade antioxidante total.....	37
1.7.1	Métodos quantitativos	37
1.8	Objetivos e âmbito do trabalho.....	43
2	Materiais e métodos.....	47
2.1	Reagentes e soluções.....	47
2.2	Amostragem, materiais e equipamentos	47
2.2.1	Amostragem e preparação da amostra	47
2.2.2	Extração - Equipamento geral e condições operatórias.....	48
2.2.2.1	Planeamento Experimental	48
2.2.3	Avaliação da capacidade antioxidante total.....	49
2.3	Métodos analíticos	50
2.3.1	Caracterização dos extratos.....	50
2.3.1.1	Teor fenólico total – método de Folin-Ciocalteu.....	50
2.3.1.2	Atividade anti-radicalar – DPPH (RSA)	51
2.3.1.3	Poder de redução férrica - FRAP	51
2.3.2	Estudo estatístico.....	51
3	Resultados e discussão.....	55
3.1	Amostras verdes e secas	55
3.2	Avaliação do perfil antioxidante.....	55
3.2.1	Amostras verdes	56
3.2.1.1	Folhas verdes de <i>Eucalyptus globulus</i>	56
3.2.1.2	Agulhas verdes de <i>Pinus pinaster</i>	58
3.2.2	Amostras secas.....	59

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE ANTIOXIDANTES DE SUBPRODUTOS FLORESTAIS
PELO MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

3.2.2.1	Folhas secas de <i>Eucalyptus globulus</i>	59
3.2.2.2	Agulhas secas de <i>Pinus pinaster</i>	60
3.3	Otimização das condições operacionais na avaliação do perfil antioxidante	61
3.3.1	Amostras verdes	62
3.3.1.1	Folhas verdes de <i>Eucalyptus globulus</i>	62
3.3.1.2	Agulhas verdes de <i>Pinus pinaster</i>	65
3.3.2	Amostras secas.....	67
3.3.2.1	Folhas secas de <i>Eucalyptus globulus</i>	67
3.3.2.2	Agulhas secas de <i>Pinus pinaster</i>	69
4	Conclusões e sugestões para trabalhos futuros	75
	Referências Bibliográficas	77
	ANEXOS	83
Anexo A.	<i>Layout</i> utilizado na preparação dos métodos de análise.	85
Anexo B.	Curvas de calibração.....	85
Anexo C.	Análise da variância (ANOVA) da regressão e Gráficos de Resíduos	87

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Distribuição dos usos do solo em Portugal continental para 2010 (adaptado de [3]).....	4
Figura 1.2 - Distribuição das áreas totais por espécie/grupo de espécies [3].....	5
Figura 1.3 - Órgãos afetados pelo efeito oxidativo de radicais-livres (adaptado de [15]).	8
Figura 1.4 - Compostos antioxidantes naturais por classes (adaptado de [17]).	10
Figura 1.5 - Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e dos ácidos hidroxicinâmicos (b) (adaptado de [21]).....	11
Figura 1.6 - Estrutura genérica de um flavonoide (adaptado de [20]).	12
Figura 1.7 - Estrutura genérica das subclasses de flavonoides [22].	13
Figura 1.8 – Principais etapas de um planeamento experimental (adaptado de [40]).	24
Figura 1.9 – Otimização sequencial com o método Simplex para dois fatores, x_1 e x_2 [40]...25	
Figura 1.10 – Possíveis movimentos do Simplex em duas dimensões com pontos característicos: (a) reflexão; (b) expansão; (c) contração no sentido exterior; (d) contração interior; (e) redução [41].	25
Figura 1.11 – Esquema de um planeamento fatorial completo com dois níveis e dois fatores (a) e três fatores e dois níveis (b) [42].	27
Figura 1.12 – Planeamento de compósito central para as experiências: (a) duas variáveis (com $\alpha = 1,41$) e (b) três variáveis (com $\alpha = 1,68$); (●) representam o planeamento fatorial, (○) os pontos axiais e (□) os pontos centrais [37].	30
Figura 1.13 – Exemplo de gráficos e_i vs y' (adaptado de [42]).....	33
Figura 1.14 – Exemplo de representação gráfica da aplicação do método de rankit [42].....	34
Figura 1.15 – Método de rankit aplicado a um conjunto de dados antes (a) e depois (b) da eliminação de dois outliers [42].	34
Figura 1.16 - Estrutura do ácido gálico (adaptado de [50]).	39
Figura 1.17 – Reação do ácido gálico com o molibdénio VI (adaptado de [50]).....	39
Figura 1.18 – Estrutura do radical DPPH* (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	40
Figura 1.19 – Reação entre o radical livre DPPH* e um composto antioxidante (adaptado de [51]).....	40
Figura 1.20 – Estrutura do Trolox.	41
Figura 1.21 – Reação química ocorrida no método de FRAP [47].	41
Figura 1.22 – Estrutura do ácido ascórbico.	42
Figura 3.1 – Representação da superfície de resposta do teor fenólico total em função dos fatores concentração (A) e tempo (B) para temperatura (C) constante (C=0).....	63

Figura 3.2 - Representação da superfície de resposta do teor fenólico total em função dos fatores concentração (A) e temperatura (C) para tempo (B) constante (B=0).....	63
Figura 3.3 - Representação da superfície da atividade anti-radicalar em função dos fatores concentração (A) e temperatura (C).	64
Figura 3.4 - Representação da superfície do poder de redução férrica em função dos fatores concentração (A) e temperatura (C).	65
Figura 3.5 - Representação da superfície de resposta do teor fenólico total em função dos fatores concentração (A) e temperatura (C).	66
Figura 3.6 - Representação da superfície de resposta da atividade anti-radicalar em função dos fatores concentração (A) e temperatura (C).....	66
Figura 3.7 - Representação da superfície de resposta do poder de redução férrica em função dos fatores concentração (A) e temperatura (C).....	67
Figura 3.8 – Representação gráfica dos valores experimentais e valores ajustados pelo MINItab para o método de DPPH para folhas secas de eucalipto.	68
Figura 3.9 – Representação gráfica dos valores experimentais de duas extrações de folhas secas de eucalipto.....	68
Figura 3.10 - Representação gráfica dos valores experimentais e valores ajustados pelo MINItab para o método de FRAP.	69
Figura 3.11 - Representação da superfície de resposta do teor fenólico total em função dos fatores concentração (A) e temperatura (C).	70
Figura 3.12 - Representação gráfica dos valores experimentais e valores ajustados pelo MINItab para o método de DPPH para agulhas secas de pinheiro.	70
Figura 3.13 - Representação gráfica dos valores experimentais de duas extrações de agulhas secas de pinheiro.	71
Figura 3.14 - Representação da superfície de resposta do poder de redução férrica em função dos fatores concentração (A) e tempo (B).	71
Figura B.1 - Curvas de calibração para o TPC para as amostras verdes e secas.	85
Figura B.2 - Curvas de calibração para folhas verdes de Eucalyptus globulus.	85
Figura B.3 - Curvas de calibração para agulhas verdes de Pinus pinaster.	86
Figura B.4 - Curvas de calibração para folhas secas de Eucalyptus globulus.	86
Figura B.5 - Curvas de calibração para agulhas secas de Pinus pinaster.	86
Figura C.1 – Gráficos de resíduos para o método TPC de folhas verdes de Eucalyptus globulus.	87
Figura C.2 - Gráficos de resíduos para o método DPPH de folhas verdes de Eucalyptus globulus.....	88

Figura C.3 - Gráficos de resíduos para o método FRAP de folhas verdes de <i>Eucalyptus globulus</i>	89
Figura C.4 - Gráficos de resíduos para o método TPC de agulhas verdes de <i>Pinus pinaster</i>	90
Figura C.5 - Gráficos de resíduos para o método DPPH de agulhas verdes de <i>Pinus pinaster</i>	91
Figura C.6 - Gráficos de resíduos para o método FRAP de agulhas verdes de <i>Pinus pinaster</i>	92
Figura C.7 - Gráficos de resíduos para o método TPC de folhas secas de <i>Eucalyptus globulus</i>	93
Figura C.8 - Gráficos de resíduos da primeira etapa de otimização para o método DPPH de folhas secas de <i>Eucalyptus globulus</i>	94
Figura C.9 - Gráficos de resíduos da segunda etapa de otimização para o método DPPH de folhas secas de <i>Eucalyptus globulus</i>	95
Figura C.10 - Gráficos de resíduos para o método FRAP de folhas secas de <i>Eucalyptus globulus</i>	96
Figura C.11 - Gráficos de resíduos para o método TPC de agulhas secas de <i>Pinus pinaster</i>	97
Figura C.12 - Gráficos de resíduos para o método DPPH de agulhas secas de <i>Pinus pinaster</i>	98
Figura C.13 - Gráficos de resíduos para o método FRAP de agulhas secas de <i>Pinus pinaster</i>	99

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Métodos quantitativos totais e respetivos teores da avaliação do perfil antioxidante em folhas da espécie de eucalipto <i>Eucalyptus camaldulensis</i> [14].	7
Tabela 1.2 - Diferentes tipos de radicais livres produzidos e os respetivos sistemas de defesa antioxidante [15].	9
Tabela 1.3 - Frações produzidas e respetivos eluentes utilizados.	15
Tabela 1.4 – Comparação entre algumas técnicas de extração recentes e tradicionais (adaptado de [27]).	20
Tabela 1.5 – Exemplo de um planeamento fatorial completo com dois fatores e dois níveis.	28
Tabela 1.6 - Tabela de análise de variância para o método dos mínimos quadrados de um modelo de parâmetros lineares (adaptado de [44]).	35
Tabela 2.1 - Condições limite para a otimização da técnica de extração.	48
Tabela 2.2 - Planeamento fatorial para a otimização das condições de extração.	49
Tabela 2.3 – Especificações relativas aos padrões dos métodos TPC, DPPH e FRAP.	50
Tabela 3.1 – Teor de humidade relativo às matrizes verdes secas.	55
Tabela 3.2 – Parâmetros avaliados na validação dos métodos analíticos.	56
Tabela 3.3 – Conjunto de dados experimentais para extratos de folhas verdes de <i>Eucalyptus globulus</i> .	57
Tabela 3.4 - Conjunto de dados experimentais obtidos para extratos de agulhas verdes de <i>Pinus pinaster</i> .	58
Tabela 3.5 - Conjunto de dados experimentais obtidos para extratos de folhas secas de <i>Eucalyptus globulus</i> .	59
Tabela 3.6 - Conjunto de dados experimentais para extratos de agulhas secas de <i>Pinus pinaster</i> .	60
Tabela 3.7 - Fatores e respetivos códigos.	61
Tabela 3.8 - Resumo de resultados para os modelos polinomiais.	61
Tabela A.1 – Layout utilizado para preparação das placas de 96 poços do leitor de microplacas.	85
Tabela C.1 - ANOVA das respostas para o teor fenólico total de folhas verdes de <i>Eucalyptus globulus</i> .	87
Tabela C.2 - ANOVA das respostas para a atividade anti-radicalar de folhas verdes de <i>Eucalyptus globulus</i> .	88
Tabela C.3 - ANOVA das respostas para o poder de redução férrica de folhas verdes de <i>Eucalyptus globulus</i> .	89

Tabela C.4 - ANOVA das respostas para o teor fenólico total de agulhas verdes de Pinus pinaster.	90
Tabela C.5 - ANOVA das respostas para a atividade anti-radicalar de agulhas verdes de Pinus pinaster.	91
Tabela C.6 - ANOVA das respostas para o poder de redução férrica de agulhas verdes de Pinus pinaster.	92
Tabela C.7 - ANOVA das respostas para o teor fenólico total de folhas secas de Eucalyptus globulus.....	93
Tabela C.8 - ANOVA-A das respostas para a atividade anti-radicalar de folhas secas de Eucalyptus globulus.	94
Tabela C.9 - ANOVA-B das respostas para a atividade anti-radicalar de folhas secas de Eucalyptus globulus.	95
Tabela C.10 - ANOVA das respostas para o poder de redução férrica de folhas secas de Eucalyptus globulus	96
Tabela C.11 - ANOVA das respostas para o teor fenólico total de agulhas secas de Pinus pinaster.	97
Tabela C.12 - ANOVA-A das respostas para a atividade anti-radicalar de agulhas secas de Pinus pinaster.	98
Tabela C.13 - ANOVA das respostas para o poder de redução férrica de agulhas secas de Pinus pinaster.	99

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Designação
AA	Ácido ascórbico
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AH	Composto antioxidante
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ERO	Espécies reativas de oxigénio
FC	Folin-Ciocalteu
FRAP	Poder de redução férrica (<i>ferric reducing antioxidant power</i>)
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GC	Cromatografia gasosa (<i>Gas chromatography</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High-performance liquid chromatography</i>)
LC	Cromatografia líquida (<i>Liquid chromatography</i>)
LOF	Ausência de ajuste (<i>lack-of-fit</i>)
MBB	Modelo de Box-Behnken
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido na forma reduzida
NBT	Azul de nitrotetrazólio
NMP	Nématodo da madeira do pinheiro
PMS	Metossulfato de fenazina
R·	Espécies reativas
RSA	Atividade anti-radicalar (<i>radical scavenging activity</i>)
TAH	Transferência de átomo de hidrogénio
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
TE	Transferência de eletrão
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>)
TLC	Cromatografia em camada fina (<i>Thin layer chromatography</i>)
TPC	Teor fenólico total
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
UE	União Europeia

Capítulo 1 - Introdução

1 Introdução

Portugal continental apresenta uma ampla área florestal¹, sendo a principal ocupação do solo, representando 35,4%, cerca de 3 154 800 ha em 2010, colocando Portugal na média dos 27 países da União Europeia (UE) [1].

Espécies comuns na floresta Portuguesa, tais como o eucalipto (*Eucalyptus globulus*) e o pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*) apresentam uma elevada importância a nível económico, designadamente pela integração setorial em território nacional das respetivas fileiras de transformação industrial [1].

A floresta de Portugal continental gera riqueza num valor de cerca de 344€/ha, valor este que inclui, não só os produtos comerciais, mas também serviços não transacionáveis. A floresta continental apresenta um valor económico, por unidade de área, que supera valores registados para outros países mediterrâneos [2].

O valor acrescentado das fileiras florestais representa cerca de 2% do Produto Interno Bruto (PIB), sendo apenas ultrapassado pela Finlândia e Suécia, a nível da UE. No período de 2000 a 2009, as indústrias de base florestal representaram cerca de 11% do PIB industrial [2].

1.1 Áreas de uso de solo em Portugal continental

Através da análise da Figura 1.1 é possível compreender melhor a distribuição dos usos do solo em Portugal continental. Tal como mencionado, anteriormente, as florestas representam o principal uso do solo continental (35%), seguido por áreas de matos e pastagens (32%).

Segundo resultados preliminares do 6º Inventário Florestal Nacional [3], durante o período de 1995 a 2010, verificou-se uma diminuição da área florestal a uma taxa líquida de 0,3%/ano. No entanto, a área arborizada aumentou cerca de 0,4%/ano, nesse mesmo período. A diminuição de áreas florestais deve-se, principalmente, à sua conversão em áreas de mato e pastagens, bem como áreas de uso urbano.

Outro fator associado à diminuição de áreas florestais está relacionado com acontecimentos adversos ocorridos nas duas últimas décadas, como os incêndios (entre 1990 e 2012, arderam mais de 2,5 milhões de hectares de floresta) e a proliferação de doenças como o nemátodo da madeira do pinheiro (NMP)² [3].

¹ As áreas de uso florestal compreendem as áreas arborizadas, que correspondem aos denominados povoamentos florestais, e às áreas temporariamente desarborizadas, que correspondem às superfícies ardidas, cortadas e em regeneração.

² O nemátodo da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*, é um agente causal da murchidão dos pinheiros, originário da América do Norte e Canadá.

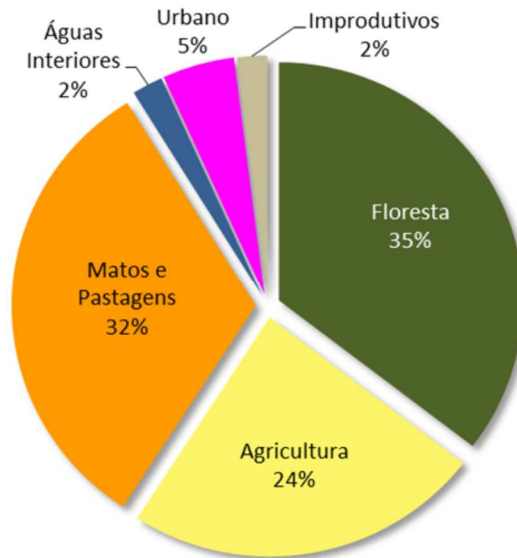


Figura 1.1 - Distribuição dos usos do solo em Portugal continental para 2010 (adaptado de [3])

1.2 Espécies florestais

As espécies florestais estão divididas em dois grandes grupos: as espécies folhosas e as espécies resinosas. As espécies folhosas incluem árvores como o eucalipto, o carvalho, o castanheiro e a azinheira. Estas árvores apresentam uma enorme variedade em relação às resinosas, quer a nível de porte, de folhas e de conformação geral da copa. Estas espécies encontram-se em grande número a nível nacional, não só devido à diversidade de flora natural, mas também devido à introdução de espécies exóticas, como é o caso do eucalipto. Relativamente às espécies resinosas, estas caracterizam-se pelas suas folhas em forma de agulhas e os frutos em forma cónica. Em Portugal, este grupo é representado, essencialmente, por espécies de árvores como o pinheiro-bravo e o pinheiro-manso.

Atualmente, em Portugal continental, o eucalipto representa cerca de 812 mil ha em área florestal, o sobreiro representa 737 mil ha e o pinheiro-bravo 714 mil ha. A área ocupada por espécies resinosas representa 31% da floresta portuguesa, sendo os restantes 69% ocupados por espécies folhosas, como se pode observar na Figura 1.2 [3].

As principais alterações a denotar, no período de 1995 e 2010, passam pela diminuição na percentagem ocupada pelo pinheiro-bravo e, relativamente ao eucalipto, um aumento da área ocupada em cerca de 95 mil ha. Alterações menos significativas, registadas sobretudo entre 2005 e 2010, estão relacionadas com o aumento das áreas de pinheiro-manso e de castanheiro [3].

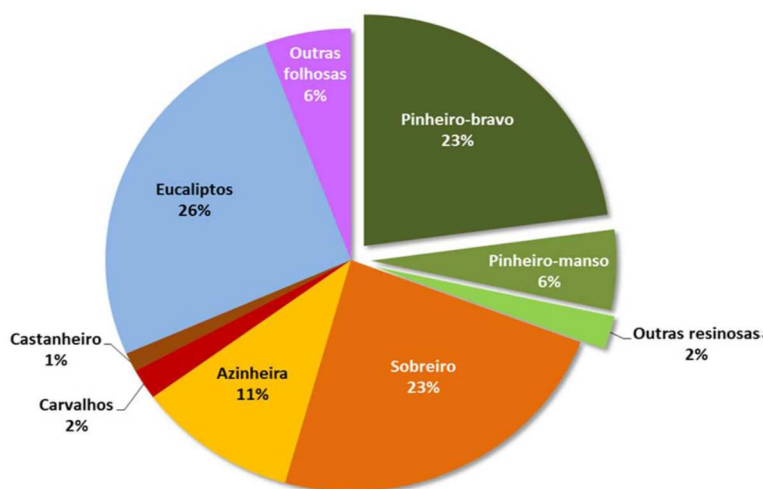


Figura 1.2 - Distribuição das áreas totais por espécie/grupo de espécies [3].

1.3 Valorização de produtos florestais

Atualmente, a procura por antioxidantes naturais tem vindo a aumentar devido à incerteza no uso de alguns antioxidantes sintéticos como é o caso do BHT (butil-hidroxitolueno)³ e do BHA (butil-hidroxianisol). Alguns estudos revelam que estes antioxidantes, entre outros, podem causar danos a nível do sistema hepático e efeitos carcinogénicos em animais. Assim sendo, os consumidores dão preferência à utilização de antioxidantes de origem natural uma vez que oferecerem maior nível de confiança no que diz respeito à saúde e bem-estar; existe, portanto, uma necessidade real e crescente de investigar e descobrir novas fontes naturais destes compostos antioxidantes [4].

Existem inúmeros registos da importância do uso de plantas, desde a sua aplicação na medicina à utilização em vários tipos de indústria. Muitas plantas contêm óleos essenciais e outras substâncias que podem ser utilizadas como aromas em alimentos ou em remédios à base de plantas. Também os seus subprodutos têm demonstrado conter características interessantes, podendo apresentar um elevado valor económico como fontes naturais de antioxidantes, quando devidamente valorizadas.

A biomassa florestal, designada por subprodutos florestais, consiste numa mistura de folhas, agulhas, frutos, casca e madeira. Em Portugal, uma parte considerável desta biomassa corresponde a subprodutos das duas espécies dominantes, *Eucalyptus globulus* e *Pinus pinaster*. Os compostos polifenólicos derivados de subprodutos florestais têm recebido particular interesse devido ao seu potencial antioxidante e às suas propriedades antimicrobianas [5].

³ Antioxidante sintético amplamente utilizado na indústria alimentar.

O eucalipto, *Eucalyptus globulus*, é uma das principais fontes para a indústria de celulose e papel em Portugal e Espanha. A primeira fase do processo de produção de pasta de papel consiste em separar a casca da madeira. Este processo gera uma quantidade significativa de casca de eucalipto, que representa, aproximadamente, 11% do peso seco total. Este resíduo de biomassa florestal é utilizado para a geração de energia (eletricidade e aquecimento), uma vez que não pode ser utilizado no processo de polpação, especialmente devido ao seu alto teor em compostos extraíveis. Contudo, este inconveniente da casca pode ser visto como uma vantagem, nomeadamente, na sua valorização como fonte de compostos polifenólicos [6].

Os eucaliptos são árvores de crescimento rápido cuja exploração se destina, como foi referido, principalmente, à produção de pasta de papel mas, também, para a produção de óleos essenciais. Os óleos essenciais provenientes do eucalipto, particularmente de subprodutos como as suas folhas, têm uma especial importância na produção de fármacos, sendo vulgarmente utilizados para o alívio de constipações, dores musculares e bronquites [7].

Relativamente aos pinheiros, estes são uma das espécies mais importantes a nível industrial em todo o mundo e são valorizados, principalmente, devido à sua madeira, casca, agulhas e sementes comestíveis (pinhões) [8].

Há uns anos atrás, as aparas da madeira de pinheiro eram vistas como um resíduo inconveniente proveniente da indústria madeireira, contudo, atualmente, são utilizadas como substrato vegetal e como combustível. De um ponto de vista químico esta espécie apresenta muito interesse pois é rica em compostos fenólicos como flavonoides, compostos estes que têm suscitado particular interesse em áreas como nutrição, saúde e medicina [9].

Os compostos fenólicos encontram-se em plantas superiores terrestres e aquáticas e são compostos extraordinariamente diversificados. Um aspeto interessante destes compostos está relacionado com o seu envolvimento na resposta das plantas ao *stress* ambiental, tais como a presença de poluentes ou mesmo variações de temperatura. Os incêndios são uma constante ameaça para as florestas e para as populações. Diversas estratégias de gestão têm vindo a ser desenvolvidas para a prevenção de incêndios, tais como o tratamento mecânico e o fogo controlado. O fogo controlado foi desenvolvido com os principais objetivos de reduzir a carga de combustível e riscos de incêndio, para recriar a dinâmica das perturbações naturais e para restaurar o ecossistema.

Alguns estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de estudar os efeitos do fogo controlado na produção de compostos fenólicos em espécies como o *Pinus pinaster*.

Estes compostos fenólicos, quer na forma de misturas (fenólicos totais) quer individualmente, têm sido avaliados com o objetivo de serem utilizados como bioindicadores de *stress* térmico,

uma vez que são detetadas variações nos seus níveis após danos por calor em hastes e coroas de pinheiros [10].

Outro estudo indica, ainda, o potencial das agulhas de pinheiro como bioindicadores de poluição atmosférica, uma vez que, a presença de poluentes atmosféricos provoca um aumento do teor fenólico. Assim sendo, o estudo em questão comprova a viabilidade na utilização de compostos fenólicos totais e simples como indicadores biológicos da qualidade do ar [11].

O crescente interesse na extração de compostos polifenólicos provenientes de eucalipto e pinheiro, bem como de outras fontes naturais, aumentou significativamente na última década devido não só à necessidade de substituição dos antioxidantes sintéticos, mas também à necessidade de valorização dos subprodutos industriais [6].

Foram detetados diferentes compostos polifenólicos em extratos obtidos a partir de folhas de várias espécies de eucaliptos e pinheiros [10, 12].

No entanto, apesar de todas estas evidências e potenciais aplicações, apenas algumas espécies de plantas identificadas, são utilizadas à escala comercial [13].

Na Tabela 1.1 encontram-se descritos alguns métodos utilizados na quantificação total de compostos antioxidantes, tais como atividade anti-radicalar pelos métodos do DPPH, da desoxirribose e do anião superóxido, a determinação do teor fenólico total (TPC) e do teor de flavonoides total.

*Tabela 1.1 - Métodos quantitativos totais e respetivos teores da avaliação do perfil antioxidante em folhas da espécie de eucalipto *Eucalyptus camaldulensis* [14].*

Extrato	Teores				
	DPPH ($\mu\text{g/mL}$)	Desoxirribose ($\mu\text{g/mL}$)	Superóxido ($\mu\text{g/mL}$)	TPC (mg GAE/g)	Teor de flavonoides total (mg QE/g)
Extrato Total	14 \pm 0,2	ND	106,6 \pm 0,8	364,1 \pm 8,2	80,5 \pm 0,9
Fração I (100% Água)	47,8 \pm 0,7	97,0 \pm 1,3	491,1 \pm 11,4	110,1 \pm 18,1	53,0 \pm 0,6
Fração II (30% MeOH)	14,0 \pm 0,6	22,0 \pm 1,1	43,9 \pm 0,9	653,5 \pm 21,5	129,5 \pm 1,1
Fração III (60% MeOH)	13,4 \pm 0,3	37,4 \pm 1,1	50,9 \pm 4,2	729,1 \pm 8,9	91,9 \pm 0,8
Fração IV (100% MeOH)	13,4 \pm 0,1	19,2 \pm 1,1	58,5 \pm 1,9	701,1 \pm 16,7	64,8 \pm 0,3

GAE – ácido gálico, QE – quercetina, ND – não detetado.

1.4 Antioxidantes

Os radicais livres e os oxidantes podem apresentar efeitos tóxicos para o organismo. Estas espécies químicas podem ser provenientes do metabolismo normal de células do organismo, *in situ*, ou de fontes externas, como poluição, fumo de cigarro, radiação ou medicamentos. Quando se verifica uma acumulação de radicais livres no organismo vivo ocorre um fenómeno designado de *stress oxidativo*, fenómeno este que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de doenças crónicas e degenerativas [15], como o cancro, insuficiências imunitárias, envelhecimento precoce, artrite, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Figura 1.3).

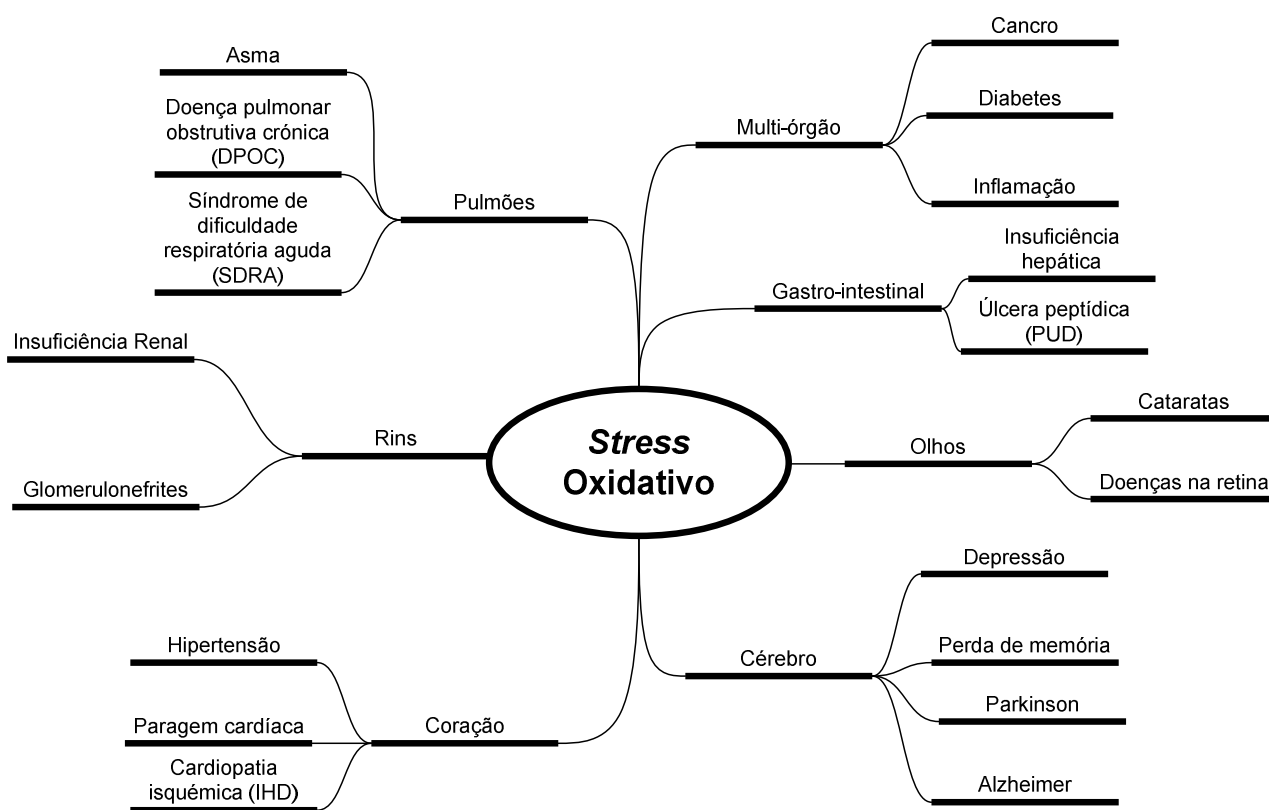


Figura 1.3 - Órgãos afetados pelo efeito oxidativo de radicais-livres (adaptado de [15]).

A maioria dos organismos vivos tem vários mecanismos de combate ao *stress oxidativo*, através da utilização de compostos antioxidantes que podem ser produzidos de forma natural, endógena, ou fornecidos através de alimentos e/ou suplementos [16].

Na Tabela 1.2 é possível identificar vários tipos de radicais livres existentes nos seres vivos bem como os compostos antioxidantes usados para neutralizar/inativar ou eliminar estes radicais. Este processo é designado de mecanismo de defesa antioxidante.

Tabela 1.2 - Diferentes tipos de radicais livres produzidos e os respectivos sistemas de defesa antioxidante [15].

Tipo de Radical livre	Sistema de defesa
Superóxido ($O_2^{\cdot -}$)	Superóxido dismutase
Hidroxilo (OH^{\cdot})	Glutathione
Peroxilo (ROO^{\cdot})	Tocoferóis, ubiquinona
Oxigênio singleto (O_2^{\cdot})	Carotenóide
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Catalase, Peroxidase
Hidroperóxidos (ROO^{\cdot})	Glutathione peroxidase, glutathione reductase
Metais de transição (Fe^{2+} , Cu^{2+})	Quelantes

Define-se como antioxidante, qualquer composto que, quando presente em baixas concentrações, comparativamente ao substrato oxidável, é capaz de impedir ou retardar danos provocados pela oxidação. Uma outra propriedade importante destes compostos prende-se com o facto de, após a inibição do radical livre, originarem um novo radical que não é tóxico para o organismo humano [17].

Os antioxidantes, do ponto de vista químico, são compostos aromáticos com pelo menos um grupo hidroxilo. Podem ser de origem sintética, como é o caso do BHT, ou de origem natural, como é o caso dos compostos fenólicos [18].

O sistema de defesa antioxidante encontra-se dividido em dois grandes grupos, o sistema enzimático e o sistema não enzimático. Relativamente ao sistema enzimático, este encontra-se subdividido em dois tipos de defesa: o sistema de defesa enzimático primário e o sistema secundário. O sistema primário é composto por três enzimas importantes, de origem endógena: a glutathione peroxidase, a superóxido dismutase e a catalase. O sistema secundário inclui a glutathione reductase e a glucose-6-fosfato-dihidrogenase.

O sistema de defesa não enzimático inclui vários compostos antioxidantes, que podem ser diferenciados como antioxidantes metabólicos, de origem endógena, como é o exemplo da glutathione, da Coenzima Q10 e do ácido úrico. Os antioxidantes de origem exógena são provenientes da alimentação, como é o exemplo das vitaminas A, C, E e K, dos carotenóides,

dos minerais (selênio, zinco), os ácidos fenólicos e os flavonoides [15, 17]. A Figura 1.4 descreve a classificação de compostos antioxidantes referida anteriormente.

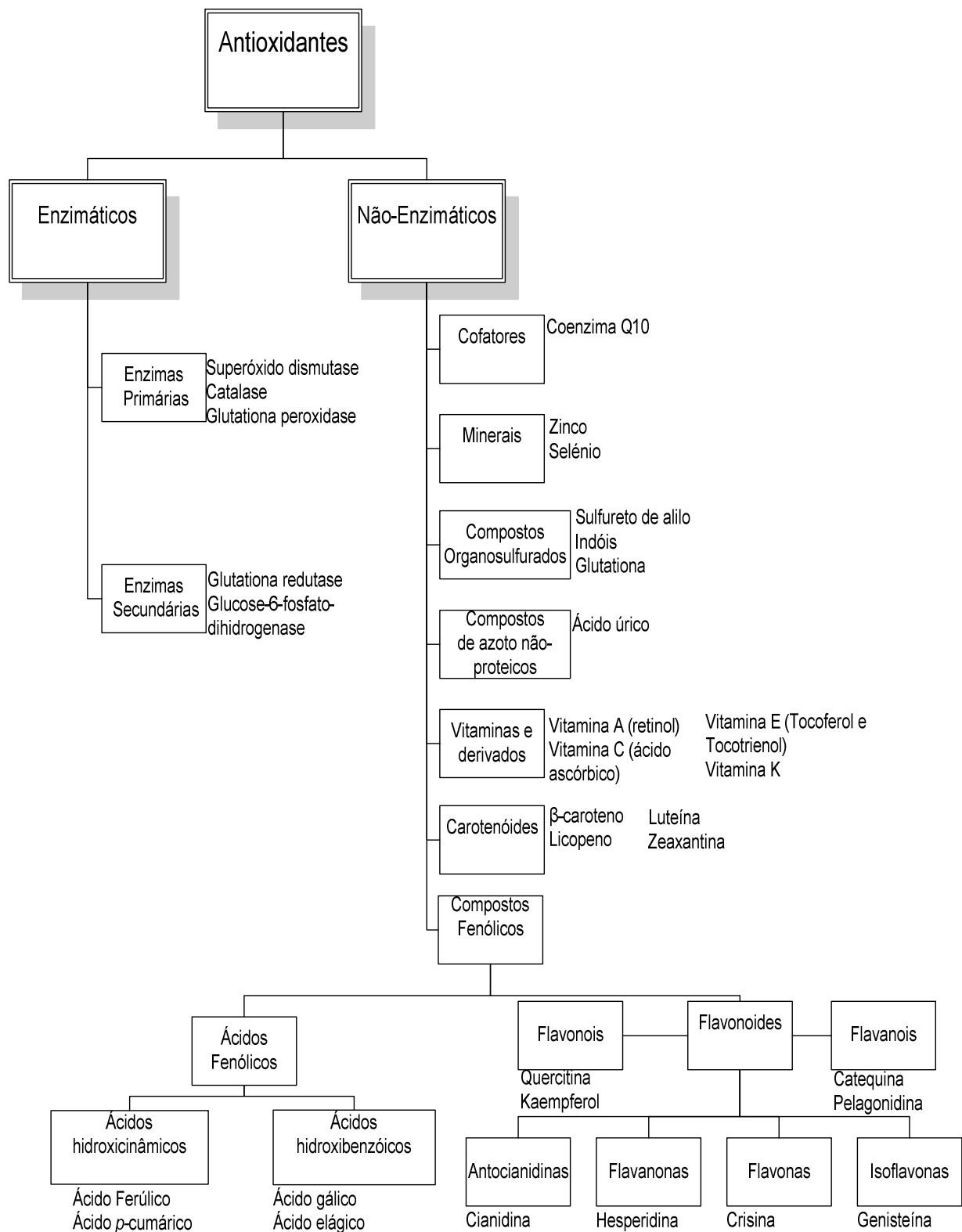


Figura 1.4 - Compostos antioxidantes naturais por classes (adaptado de [17]).

1.4.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos encontram-se presentes de forma ubíqua nas plantas, assim como nos produtos de transformação e subprodutos, podendo ainda estar associados a ésteres e glicosídeos [19].

Os compostos fenólicos são uma parte essencial da dieta humana devido às suas propriedades antioxidantes. Os efeitos benéficos destes compostos, para a saúde, têm sido associados ao consumo elevado de vegetais e frutas.

1.4.1.1 Ácidos fenólicos

Do ponto de vista estrutural, os compostos fenólicos apresentam um anel aromático e um ou mais grupos hidroxilo. Estes compostos variam desde moléculas fenólicas simples até compostos altamente complexos e polimerizados [20].

Os ácidos fenólicos encontram-se divididos em dois grupos, os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos. O primeiro grupo compreende compostos como o ácido gálico, o ácido *p*-hidroxibenzóico, o ácido protocatequínico, o ácido vanílico e o ácido sirínico, que apresentam a estrutura comum (C6-C1). O segundo grupo, os ácidos hidroxicinâmicos, que apresentam uma cadeia lateral de três carbonos (C6-C3), compreendem compostos como o ácido cafeico, o ácido ferúlico, o ácido *p*-cumárico e o ácido sinápico, sendo este último o mais comum. Na Figura 1.5 é possível visualizar e comparar a estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos e dos ácidos hidroxicinâmicos [20].

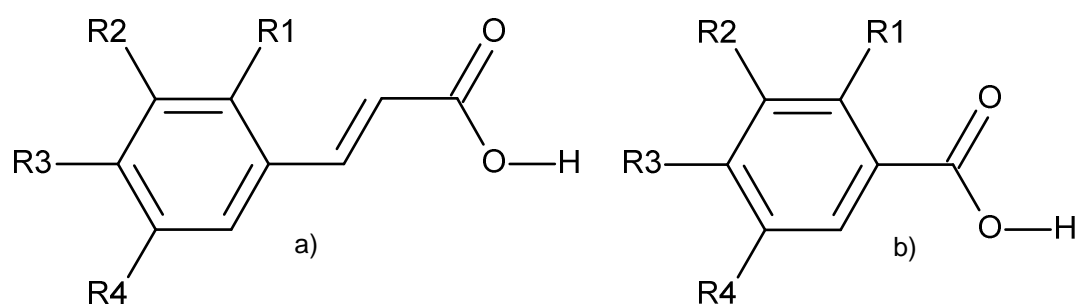


Figura 1.5 - Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e dos ácidos hidroxicinâmicos (b) (adaptado de [21]).

Estes compostos apresentam propriedades antioxidantes importantes devido à sua capacidade de eliminar radicais livres, protegendo o organismo contra danos oxidativos associados a espécies reativas de oxigênio (ERO) [19]. Estes compostos têm especial

impacto sobre os radicais hidroxilo e superóxido. Um dos principais compostos estudados e mais promissor é o ácido gálico, uma vez que é, de igual forma, precursor de taninos [6].

1.4.1.2 Flavonoides

Os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos provenientes das plantas. Este grupo de compostos representa cerca de metade dos compostos fenólicos de ocorrência natural.

Esta família de compostos apresenta baixo peso molecular. Do ponto de vista estrutural, apresentam uma estrutura complexa, sendo constituídos por 15 átomos de carbono dispostos numa configuração C6-C3-C6. A sua estrutura é representada por dois anéis aromáticos unidos por uma ponte de carbono, geralmente disposta sob a forma de um anel heterocíclico [20], como é possível observar na Figura 1.6.

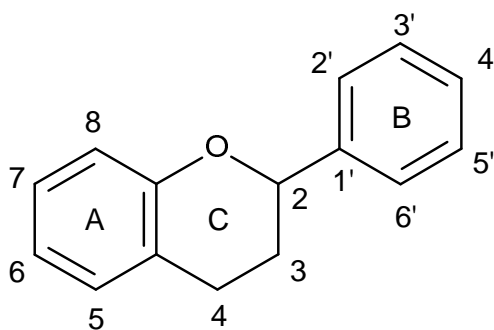


Figura 1.6 - Estrutura genérica de um flavonoide (adaptado de [20]).

Os flavonoides encontram-se divididos em seis subclasses, que diferem entre si estruturalmente. Estas subclasses incluem as flavonas, os flavonóis, as flavanonas, os flavanóis ou família das catequinas, as antocianidinas e as isoflavonas.

Cada subclasse apresenta uma estrutura singular, como se pode observar na Figura 1.7, devido a variações nos padrões de substituição do anel heterocíclico. Ocorrem ainda alterações a nível dos anéis aromáticos, dando origem a diferentes compostos dentro de cada classe dos flavonoides. Estas substituições podem incluir reações como a oxigenação, a alquilação, a glicosilação, a acilação, e a sulfatação [20]. Na Figura 1.7 encontra-se representada a estrutura genérica de cada subclasse da família dos flavonoides.

Relativamente à sua ocorrência em alimentos e subprodutos, é comum encontrar flavanonas e flavonas na mesma matriz, ligadas por enzimas específicas, enquanto as flavonas e flavonóis raramente são encontrados em conjunto. Também é comum as antocianinas estarem ausentes em plantas ricas em flavanonas [17]. A maioria destes compostos podem

ser conjugados com açúcares, mas apenas ocasionalmente são encontrados como agliconas [22].

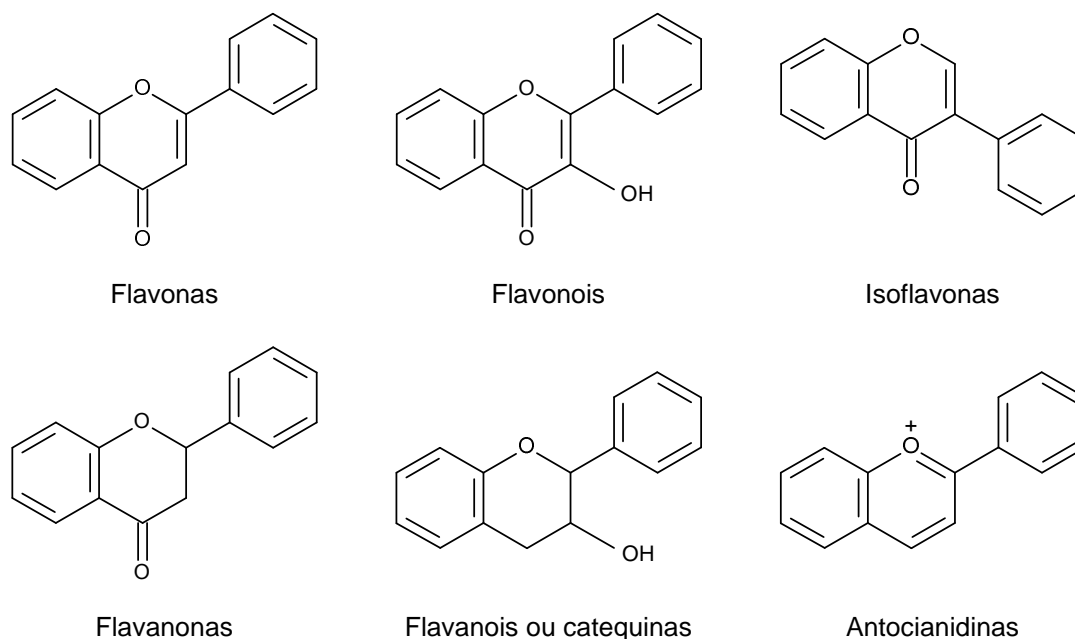


Figura 1.7 - Estrutura genérica das subclasses de flavonoides [22].

Esta classe dos compostos fenólicos tem sido amplamente reconhecida devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antialérgicas, antimicrobianas, antivirais e antimutagênicas/anticancerígenas. As catequinas têm recebido particular atenção devido a potenciais propriedades anticancerígenas, sendo umas das classes mais importantes dos flavonoides [22].

Considerando que estes compostos estão presentes nos subprodutos florestais, nomeadamente, nas folhas, casca e madeira do eucalipto e do pinheiro, é de todo o interesse conseguir extraí-los de forma eficaz. O sucesso deste estudo depende, numa fase inicial, da seleção do método de extração. Na seleção do método é importante não só ter em consideração a eficiência do método, mas também os custos acarretados.

1.5 Métodos de extração de antioxidantes

A seleção do método de extração de compostos antioxidantes de uma determinada matriz, neste caso em particular de subprodutos florestais, constitui um passo fundamental para o sucesso do estudo. O objetivo do processo de extração é, principalmente, proporcionar o máximo de rendimento da extração dos compostos, de forma a que seja possível avaliar o teor dos compostos alvo e o poder antioxidante dos extratos [23].

As condições de operação desempenham, de igual forma, um papel importante na qualidade e eficiência da extração. Parâmetros como a temperatura, o tempo de extração, a proporção sólido:líquido e o solvente são alguns dos fatores mais determinantes a ser considerados na otimização do processo de extração [6].

A extração deve ser um processo exaustivo, eficiente, de simples e rápida concepção, e de baixo custo. Ao longo dos anos foram desenvolvidos diversos métodos de extração tais como: extração em *Soxhlet*, percolação, maceração, por digestão, por refluxo e destilação por arrastamento de vapor. Outras técnicas mais recentes foram igualmente desenvolvidas como é o caso da extração assistida por micro-ondas, da extração com fluidos supercríticos e da extração por ultrassons [24].

1.5.1 Extração por solvente

A extração por solvente é uma das técnicas mais utilizadas como processo extrativo na avaliação do perfil antioxidante. A extração sólido-líquido e líquido-líquido são processos amplamente utilizados na extração de compostos de fontes naturais.

1.5.1.1 Extração sólido-líquido

Este método consiste no contacto entre a matriz sólida e o solvente líquido escolhido. Apesar de esta técnica ter como base o contacto sólido-solvente, são descritas várias versões desta técnica, que podem depender de diversos fatores, como por exemplo da matriz analisada, do solvente utilizado e até mesmo da disponibilidade de material.

No caso de um método descrito na literatura [14], para folhas de eucalipto, são efectuadas três extrações sucessivas com uma solução aquosa de acetona a 70%. Após a extração, procede-se à remoção do solvente por evaporação sob vácuo, sendo a solução restante liofilizada, de modo a obter um pó desidratado que representa o extrato total. Este extrato é, posteriormente, submetido a uma cromatografia preparativa, usando como eluentes água e soluções de água e metanol de polaridades decrescentes, sendo produzidas quatro frações segundo as condições apresentadas na Tabela 1.3 [14].

No que diz respeito à extração sólido-líquido de compostos existentes na casca de eucalipto, outro estudo utilizou uma mistura de metanol e água como solvente, numa proporção sólido:líquido de 80:20, sendo as amostras extraídas, durante um período de 24 h, à temperatura ambiente. Posteriormente, procedeu-se à filtração das suspensões e à remoção do metanol, por destilação sob vácuo. A solução aquosa foi extraída com éter e, após eliminação do solvente, o extrato seco foi redissolvido em metanol [12].

Outro método de extração sólido-líquido descrito na literatura utiliza o Modelo de Box-Behnken (MBB) para a otimização do processo de extração de compostos fenólicos de diferentes fontes. As variáveis consideradas são o tempo de extração (30, 195 e 360 min), a temperatura (25, 82,5 e 140°C) e a percentagem de etanol (0, 40 e 80%).

No processo de extração, é utilizado um sistema digestor em *batch*, com controlo de temperatura e tempo, e com recirculação da solução extratora. Testaram-se diferentes misturas de etanol/água, cujas proporções foram otimizadas pelo MBB. A razão líquido:sólido utilizada foi de 8:1 (8L de solução extratora por kg de casca seca).

Previamente a cada extração, verificou-se o teor de humidade da casca, de modo a que o volume de água utilizado na extração seja o correto. Caso contrário, torna-se necessário proceder à sua correção. Após cada extração, o líquido é rapidamente arrefecido até à temperatura ambiente, filtrado e desarejado fazendo borbulhar azoto [6].

Tabela 1.3 - Frações produzidas e respetivos eluentes utilizados.

Fração	Eluente
I	100% Água
II	30% Metanol
III	60% Metanol
IV	100% Metanol

1.5.1.2 Extração líquido-líquido

Vários compostos com propriedades antioxidantes importantes têm vindo a ser extraídos em plantas, sendo atualmente dedicada especial atenção à extração destes compostos a partir de resíduos florestais, tais como a madeira de eucalipto.

Antes do processo de extração, as amostras de eucalipto são hidrolisadas com ácido sulfúrico (2,5 a 5%), numa gama de temperatura conhecida e na proporção líquido:sólido de 8:1 (p/p). Em paralelo, é efetuado um ensaio de controlo sem adição de ácido. O hidrolisado é separado da fase sólida, composta por celulose e lenhina, por filtração a vácuo.

No processo de extração líquido-líquido do hidrolisado, foi utilizado como solvente o acetato de etilo e uma proporção hidrolisado:solvente de 1:3 (v/v), sendo efetuada numa etapa de extração única. Após a extração, o solvente é removido por evaporação sob vácuo e reutilizado [25].

A utilização de compostos antioxidantes naturais como substitutos de antioxidantes sintéticos tem vindo a ser incentivada devido à incerteza da segurança dos compostos sintéticos. Contudo, apesar da origem natural, estes compostos não garantem a ausência de efeitos nefastos, sendo a sua avaliação experimental estritamente importante [25].

1.5.2 Extração por digestão

No caso da extração por digestão, inicialmente, as amostras são expostas a um processo de hidrodestilação exaustiva procedendo-se, posteriormente, à secagem do resíduo, sob vácuo, à temperatura ambiente. A extração é efetuada através de um processo de digestão, sendo a amostra digerida, sucessivamente, com hexano e etanol durante 24h, à temperatura ambiente e no escuro. Após a extração os solventes são filtrados e evaporados, sob vácuo, em condições de temperatura e pressão controladas, sendo, para isso, utilizado um evaporador rotativo [20].

1.5.3 Extração sob refluxo

A extração sob refluxo consiste em submeter a matriz a uma extração com um solvente em ebulição. Em alguns estudos, como é o caso do efetuado em [26], utiliza-se a extração sob refluxo com o objetivo de extrair o corante natural de folhas de eucalipto. Na execução deste processo, uma quantidade conhecida de amostra é misturada com água destilada e submetida a refluxo durante um determinado intervalo de tempo.

Numa fase final, a amostra é filtrada e a solução de corante é separada em duas partes, sendo uma evaporada sob pressão reduzida, através de um evaporador rotativo, e a remanescente utilizada para tingimento [26].

1.5.4 Extração assistida por micro-ondas

A extração assistida por micro-ondas é um processo extrativo que utiliza a ação da energia de micro-ondas para aquecer um solvente em contacto com uma amostra com o objetivo da partição de compostos presentes na matriz em análise para o solvente.

Uma das principais vantagens associadas a esta técnica é a sua capacidade de aquecer rapidamente a mistura amostra-solvente. A utilização de frascos fechados faz com que o processo extrativo possa ser realizado a temperaturas elevadas, facto este que acelera a transferência de massa dos compostos de interesse presentes na matriz.

Esta técnica consiste na mistura da amostra e de um solvente capaz de absorver radiação de micro-ondas num recipiente fechado e que é, posteriormente, irradiado com energia micro-ondas.

Normalmente, este processo apresenta um tempo máximo de extração de 30 minutos e volumes de solvente que nunca ultrapassam os 40 mL. Esta técnica apresenta um maior

rendimento de extração, quando em comparação com métodos tradicionais, uma vez que é possível extrair várias amostras simultaneamente [27].

1.5.5 Extração assistida por micro-ondas com solvente focalizado

Esta técnica de extração tem como base o mesmo conceito da técnica de extração assistida por micro-ondas convencional, mas com mais vantagens associadas à sua utilização.

Na extração assistida por micro-ondas com solvente focalizado são utilizados frascos abertos e o sistema é operado à pressão atmosférica, contrariamente, à técnica convencional onde são utilizados frascos fechados. Estes frascos consistem em células de quartzo cobertas por um condensador de vapor. O solvente é aquecido e submetido a refluxo através da amostra, enquanto as micro-ondas são focadas sobre a amostra o que permite um aquecimento homogêneo e bastante eficiente. A temperatura máxima de operação é determinada pelo ponto de ebulição do solvente utilizado.

A amostra em estudo pode ser colocada num cartucho de celulose, não requerendo uma etapa de filtração subsequente, ou pode ser diretamente imersa no solvente.

Quando comparada com técnicas em frascos abertos, este tipo de extração oferece uma maior segurança relativamente à manipulação da amostra e, permite ainda, a extração de maior quantidade de amostra [28, 29].

1.5.6 Extração com líquido pressurizado

Originalmente, esta técnica de extração era utilizada principalmente na extração de poluentes ambientais presentes em amostras de solo, sedimentos e lamas. No entanto, mais recentemente, esta técnica tem vindo a ser explorada em áreas como a biologia e as indústrias farmacêuticas e alimentar.

Esta técnica consiste na utilização de solventes líquidos convencionais em condições de temperatura e pressão controlada. A utilização de temperaturas elevadas faz com que a viscosidade do solvente diminua, o que resulta num aumento da capacidade do solvente em interagir com a matriz sólida e solubilizar os compostos alvo.

A extração com líquido pressurizado promove uma redução nos volumes de solvente, assim como no tempo de extração, sendo um processo automático e a retenção da amostra ocorre num ambiente livre de luz e oxigénio.

São várias as vantagens associadas ao uso desta técnica. Por exemplo, em comparação à extração assistida por micro-ondas, esta técnica não requer nenhuma etapa de filtração adicional, pois os compostos que não se dissolvem no solvente são retidos na célula de extração. Alguns estudos referem, ainda, que este processo é mais eficiente e rápido do que

a extração com fluidos supercríticos, nomeadamente, com dióxido de carbono. Contudo, o extrato obtido por extração supercrítica contém menos impurezas polares que esta técnica [30, 31].

1.5.7 Extração com fluidos supercríticos

A extração com fluidos supercríticos é amplamente utilizada na extração de produtos naturais. Esta técnica apresenta algumas vantagens comparativamente aos métodos tradicionais, uma vez que proporciona extratos sem vestígios de solvente, utiliza baixas temperaturas e tempos de operação curtos, com a conseqüente diminuição do risco de degradação de compostos mais sensíveis ao calor. No entanto, desvantagens como o número de parâmetros a otimizar e a extração paralela de compostos indesejados, tornam outros métodos mais aliciantes. O dióxido de carbono é o fluido supercrítico mais utilizado, uma vez que é uma substância não tóxica, inerte, não inflamável e não corrosiva [32]. No entanto, devido à sua apolaridade, este fluido não é eficiente na extração de moléculas polares, como é o caso dos compostos fenólicos, sendo necessário recorrer à introdução de solventes, como o metanol e o etanol, que aumentem o poder de solvatação do CO₂. Assim pode-se garantir o aumento da seletividade e do rendimento de extração do composto alvo [33, 34].

1.5.8 Extração por ultrassons

Esta técnica pode ser utilizada para aumentar a eficiência de extração de compostos naturais através do aumento da transferência de massa, a rutura das paredes celulares e a diminuição do tamanho das partículas que originam um aumento do rendimento do processo extrativo e uma redução do tempo de extração e consumo de solventes.

O aumento do rendimento de extração desta técnica tem sido atribuído à propagação de ondas de pressão através do solvente e aos fenómenos de cavitação resultantes. A indução destes efeitos sobre os tecidos foliares e as paredes celulares provocam um aumento da permeabilidade dos materiais sólidos, permitindo que os solventes consigam penetrar nas áreas internas. Também as correntes de turbulência e acústicas podem aumentar significativamente os coeficientes de transferência de massa sólido-líquido devido aos efeitos microescala no sistema. Uma outra razão está relacionada com os efeitos mecânicos que podem aumentar a área de superfície entre a fase sólida e a fase líquida.

A extração por ultrassons consiste na imersão da amostra no solvente, previamente definido, num banho de ultrassons. No caso particular da extração de compostos fenólicos, solventes como o etanol e metanol são evidenciados como solventes preferenciais e, alguns estudos

indicam que apenas 15 minutos de extração apresentam resultados significativamente mais elevados comparativamente a uma extração por *Soxhlet*, quando se utiliza um banho de ultrassons a operar a 25 kHz [27, 35].

A extração de compostos ativos de elevado valor económico de fontes naturais é uma área de grande interesse para a indústria química. A utilização de técnicas de extração tradicionais está associada a elevados tempos de extração, baixos rendimentos e elevados consumos de solventes orgânicos. Contudo, fatores como o alto investimento económico requerido por técnicas mais recentes fazem com que a extração por solvente, nomeadamente, a extração sólido-líquido seja, ainda hoje, um dos processos mais utilizados como processo extrativo deste tipo de compostos.

A Tabela 1.4 apresenta uma comparação entre técnicas de extração recentes e a técnica tradicional de extração por *Soxhlet*.

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE ANTIOXIDANTES DE SUBPRODUTOS FLORESTAIS PELO MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Tabela 1.4 – Comparação entre algumas técnicas de extração recentes e tradicionais (adaptado de [27]).

	Técnicas de extração					
	Extração assistida por micro-ondas	Extração assistida por micro-ondas com solvente	Extração com líquido pressurizado	Extração com fluidos supercríticos	<i>Soxhlet</i>	Extração por ultrassons
Descrição	A amostra é imersa num solvente absorvente de micro-ondas num recipiente fechado e irradiado com energia de micro-ondas.	A amostra é imersa num solvente absorvente de micro-ondas num recipiente aberto e irradiado com energia de micro-ondas.	A amostra e solvente são aquecidos e pressurizados num vaso de extração. Depois da extração terminar, o extrato é automaticamente transferido para um frasco.	A amostra é colocada num vaso de alta pressão e extraída com fluido supercrítico (normalmente CO ₂ a pressões de 150-450 bar e temperaturas de 40-150 ° C. Os extratos são recolhidos num pequeno volume de solvente ou num sistema de fase sólida e lavado com solvente posteriormente.	A amostra é colocada num cartucho de fibra de vidro e, por meio de um extrator de <i>Soxhlet</i> , é repetidamente percolada com vapores condensados de solvente.	A amostra é imersa no solvente num recipiente e colocada num banho de ultrassons.
Tempo de extração	3-30 min	10-60 min	5-30 min	10-60 min	3-48 h	10-60 min
Tamanho da amostra (g)	1-10	1-30	1-30	1-5	1-30	1-30 g
Volume de solvente (mL)	10-40	10-150	10-100 L	2-5 (sólida) e 5-20 (líquido)	100-500	30-200
Investimento	Moderado	Moderado	Alto	Alto	Baixo	Baixo
Vantagens	Extrações rápidas e múltiplas; Pequenos volumes de solvente; Temperaturas elevadas.	Processo extrativo rápido; Pequenos volumes de solvente.	Processo extrativo rápido; Pequenos volumes de solvente; Temperaturas elevadas; Não requer filtração posterior; Sistema automático.	Processo extrativo rápido; Pequenos volumes de solvente; Temperaturas elevadas; Relativamente seletivo face a interferências da matriz; Não requer filtração ou limpeza posterior; Sistema automático;	Não requer filtração posterior.	Extrações múltiplas.
Inconvenientes	O solvente deve ser capaz de absorver micro-ondas; Requer limpeza posterior; Tempos de espera para os frascos arrefecerem.	O solvente deve ser capaz de absorver micro-ondas; Requer limpeza posterior; Tempos de espera para os frascos arrefecerem.	Requer um passo de limpeza posterior.	Requer a otimização de muitos parâmetros analíticos,	Longos tempos de extração; Grandes volumes de solvente; Requer limpeza posterior.	Grandes volumes de solvente; Podem ser necessárias repetições; Requer limpeza posterior.

1.6 Planeamento Experimental

Nesta secção serão descritos todos os conceitos importantes relativamente à formulação de um planeamento experimental, bem como todos os passos necessários para a análise e posterior validação.

1.6.1 Definição de Planeamento Experimental

Um sistema ou processo é definido pelos seus limites, pelo que transpõe esses limites e pelo que acontece no processo em si [36].

Às variáveis que descrevem a performance de um sistema atribui-se o termo de resposta e as variáveis independentes do sistema são designadas por fatores.

O conjunto de experiências definidas pelas diferentes combinações dos níveis dos fatores designa-se por planeamento experimental [37]. Num planeamento experimental, os valores dos fatores, são alterados de forma controlada para que seja possível o estudo da sua influência no sistema bem como o efeito das suas interações.

Em qualquer ensaio experimental são gerados resultados com o intuito de avaliar a qualidade ou descrever o sistema em estudo. O planeamento experimental tem por objetivo a planificação dessas experiências de modo a garantir que se obtém, com a máxima eficiência, o tipo e a quantidade de resultados necessários para responder às questões de interesse [38].

1.6.2 Otimização e modelos ótimos

O termo otimização é definido como o desenvolvimento de um conjunto de condições que resultem num aumento da eficiência de um determinado sistema sendo, vulgarmente, utilizado em química analítica com o objetivo de obter a melhor resposta possível.

O conjunto de condições que visam o aumento da eficiência de um sistema leva ao desenvolvimento de modelos ótimos, que estabelecem valores para os fatores. Habitualmente, as condições ótimas resultantes do processo de otimização passam pelo máximo ou mínimo da função de resposta. Contudo, em algumas situações estas hipóteses não são obrigatoriamente as melhores [37, 39]. O ponto ótimo do sistema pode corresponder ao máximo ou mínimo da resposta em estudo, mas existem casos em que esta situação não se verifica ou em que o ponto ótimo do sistema não é de interesse, mas sim uma região em que os resultados sejam suficientemente bons.

Tradicionalmente, o processo de otimização consiste na monitorização da influência de uma só variável, mantendo as restantes como fatores de valor constante ao longo de toda a

experiência. Contudo, esta abordagem apresenta notáveis desvantagens uma vez que não traduz os efeitos interativos entre as variáveis em estudo e, conseqüentemente, não descreve completamente os efeitos dos fatores sobre a resposta. Esta técnica resulta ainda num aumento do número de ensaios necessários para que seja viável, que se traduz num aumento de tempo de trabalho experimental, bem como de material e reagentes.

De forma a ultrapassar estes problemas são utilizadas técnicas de otimização baseadas em modelos estatísticos. Regra geral, existem vários fatores, o que torna o planeamento experimental um problema de análise multivariável. Uma das técnicas mais utilizadas neste âmbito para a otimização é a metodologia da superfície de resposta [37].

1.6.3 Metodologia da superfície de resposta

Os planeamentos experimentais podem ser utilizados para desenvolver modelos empíricos (superfícies de resposta) em casos onde não é possível obter um modelo com base teórica para a função de resposta [37]. Os modelos obtidos devem descrever o comportamento do conjunto de dados com o intuito de gerar previsões estatísticas e otimizar os níveis dos fatores de forma a obter o melhor sistema. Quando se pretende otimizar várias respostas geralmente são modeladas separadamente e depois são combinados os modelos obtidos com vista à otimização. Esta metodologia pode ser aplicada quando a resposta em estudo é influenciada por vários fatores e resulta de um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas baseadas no ajuste de uma equação polinomial a um conjunto de dados experimentais. Por exemplo, as funções características de um sistema com uma resposta (y) e dois fatores (x_1 e x_2) são traduzidas pelas seguintes equações:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad \text{Equação 1.1}$$

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad \text{Equação 1.2}$$

Este tipo de modelo é válido para fatores de processo. É usual utilizar fatores codificados no desenvolvimento de planeamentos experimentais, sendo denominados de planeamentos fatoriais [39].

1.6.4 O Planeamento fatorial

O planeamento fatorial é utilizado de forma a desenvolver um sistema mais eficiente baseado num conjunto de condições ótimas. Assim sendo, pretende-se compreender o efeito dos

fatores e/ou a modelação entre fatores e respostas com um número mínimo de ensaios experimentais, sendo que se este planeamento se adequar corretamente irá resultar na diminuição de custos inerentes à sua realização.

O planeamento fatorial é não só usado para se alcançar respostas ótimas, mas também para se obter modelos ótimos [39]. O seguinte organograma (Figura 1.8) apresenta a base sequencial para o desenvolvimento de um planeamento fatorial.

Numa fase inicial, são identificados os fatores que influenciam a resposta, bem como a extensão do seu efeito nas respostas. Posteriormente, é necessário obter um modelo que descreva quantitativamente essa influência. Assim, a primeira etapa consiste em identificar as respostas a estudar e os fatores a otimizar. Esta seleção de fatores passa por enumerar todos os fatores que possam ter algum efeito na resposta e por vezes recorre-se a informação prévia acerca do seu efeito nas respostas. Quanto às respostas geralmente são estudadas em separado, sendo posteriormente feita a combinação das diferentes funções.

Após esta seleção é necessário definir os limites do domínio experimental que consistem nos valores experimentais correspondentes aos níveis mínimo e máximo em que cada fator será avaliado. É importante que os limites sejam bem definidos, uma vez que estes influenciam diretamente a precisão do modelo.

Diversos fatores podem afetar a resposta do sistema em estudo, sendo praticamente impossível identificar e controlar pequenas contribuições de cada um especialmente quando o seu número é elevado. Neste caso é necessário identificar e selecionar os fatores com efeito mais significativo nas respostas recorrendo a planeamentos fatoriais de varrimento rápido, tal como o planeamento de Plackett-Burman, para efetuar a triagem dos fatores.

Uma vez realizada a triagem dos fatores podem ser usados dois tipos de planeamento, sequencial ou simultâneo, para a realização da otimização.

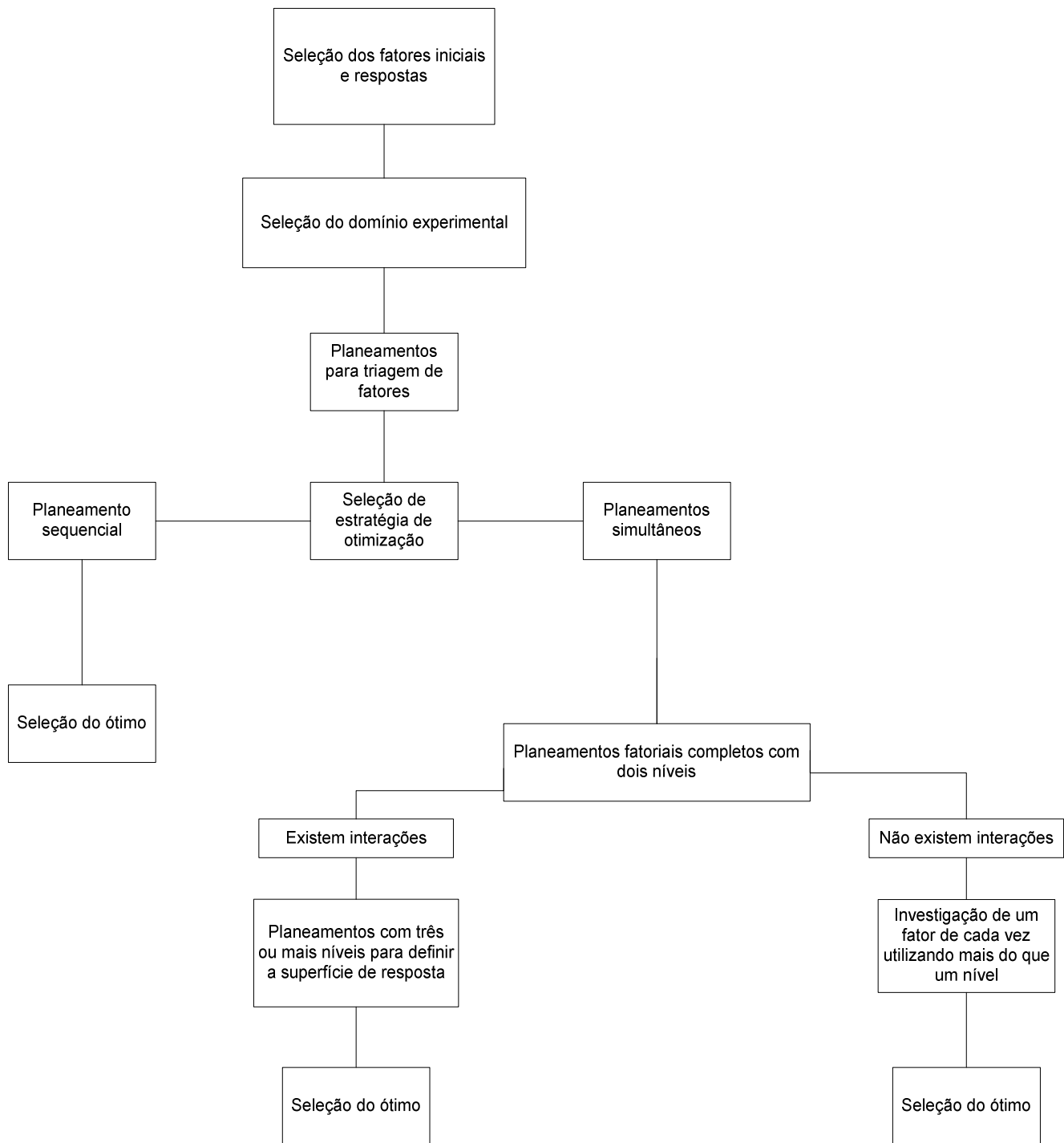


Figura 1.8 – Principais etapas de um planeamento experimental (adaptado de [40]).

1.6.5 Planeamentos sequenciais

A estratégia de otimização sequencial consiste na concretização de um número reduzido de experiências de cada vez, com o objetivo de utilizar essa informação para determinar a experiência a realizar posteriormente. O método *Simplex* é um exemplo de otimização

sequencial amplamente utilizado para planeamento experimental. Este método é apresentado sob a forma de uma figura geométrica cujos vértices correspondem a $n+1$ experiências, em que n representa o número de fatores a otimizar. A Figura 1.9 representa um exemplo de aplicação de otimização com o método Simplex, em que se pretende otimizar uma resposta como função de dois fatores, x_1 e x_2 .

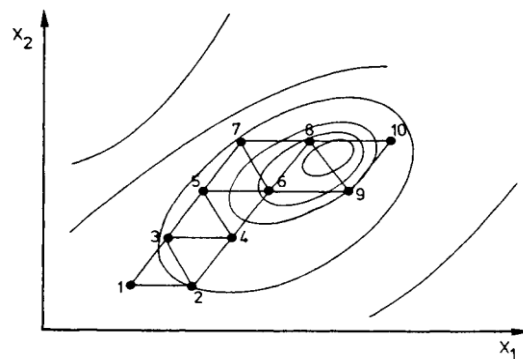


Figura 1.9 – Otimização sequencial com o método Simplex para dois fatores, x_1 e x_2 [40].

Assim sendo, o processo deve iniciar-se com três experiências. A experiência 1 na Figura 1.9 corresponde à pior resposta, sendo que a partir desta é gerado um novo Simplex, na direção oposta, utilizando quase todos os vértices da experiência anterior, sendo obtido um novo vértice. Assim sendo, este processo é repetido sequencialmente até ser atingido um critério de convergência, anteriormente estabelecido. O método Simplex é uma estratégia bastante eficiente para a determinação do ponto ótimo de um sistema e foram propostas várias modificações de forma a aumentar a sua eficiência e precisão. Por conseguinte, surgiu o método de Simplex modificado (Figura 1.10)

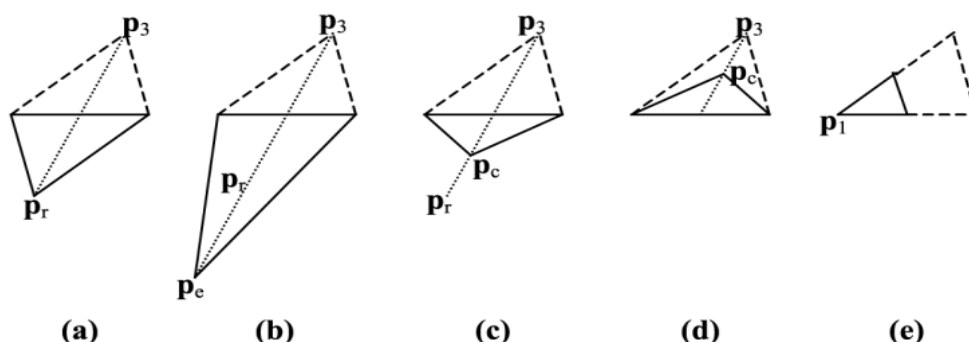


Figura 1.10 – Possíveis movimentos do Simplex em duas dimensões com pontos característicos: (a) reflexão; (b) expansão; (c) contração no sentido exterior; (d) contração interior; (e) redução [41].

O método apresentado pela Figura 1.10 mantém o *Simplex* no espaço, armazena os seus vértices e avalia os resultados nesses pontos. Este método consiste num conjunto de etapas, descritas pela figura, sendo que cada passo dado é decidido através de sucessivas tentativas e decidido pela comparação dos valores da função resultante. O pior ponto, o qual corresponde ao maior valor da função, será refletido (etapa a) em primeiro lugar sobre os restantes pontos. Posteriormente, é feita uma avaliação e, se o valor da função do ponto refletido for inferior ao original, recorre-se a uma segunda etapa, que consiste numa expansão (etapa b), caso contrário, o ponto é movido para o ponto de reflexão. Se mesmo após a etapa b não se obtiver um resultado melhor, então, o pior ponto será movido em direção ao centro dos restantes pontos (etapa d). Caso ainda não seja obtido um bom ponto, seguidamente, todos os pontos são movidos para a melhor hipótese (etapa e) [41].

A informação obtida por esta estratégia permite a modelação da superfície de resposta, contudo, a qualidade do modelo obtido não é assegurada, uma vez que o trajeto percorrido pelo Simplex poderá não ser representativo da superfície de resposta.

As estratégias de otimização sequencial são um processo eficiente quando o único objetivo da otimização é conhecer o ótimo de uma única resposta. Contudo, se o objetivo da otimização requerer a determinação do modelo de superfície de resposta é aconselhável a utilização de uma estratégia de otimização simultânea [40, 42].

1.6.6 Planeamentos simultâneos

O planeamento fatorial é baseado numa estratégia multivariável que deve ser utilizada quando existem interações entre fatores, sendo neste caso completamente desapropriada a utilização de uma estratégia univariável, uma vez que esta não é sensível a interações entre fatores. Na realidade, existem mais casos em que se verificam interações entre os fatores do que a situação contrária pelo que uma estratégia multivariável é, geralmente, mais eficiente que uma estratégia univariável [39]. Por conseguinte, depois de efetuar o rastreio dos fatores para se decidir quanto à estratégia de otimização mais adequada, univariável ou multivariável, recorre-se a planeamentos fatoriais simultâneos, por exemplo um planeamento fatorial completo com dois níveis para cada fator.

Os planeamentos simultâneos são, geralmente, designados por planeamentos fatoriais. Estes planeamentos podem ser divididos em dois grupos principais: i) o primeiro inclui os planeamentos que têm como objetivo detetar quais os fatores com mais influência na resposta do sistema e obter uma estimativa para esse efeito; e ii) o outro grupo, que inclui planeamentos para definir superfícies de resposta.

1.6.6.1 Planeamentos para análise do efeito de fatores experimentais

Este tipo de planeamento tem como principal objetivo determinar os fatores que mais influenciam a resposta do sistema em análise e a obtenção de uma estimativa para essa influência. O planeamento fatorial completo com dois níveis é um dos planeamentos mais elementares desta classe, sendo que para cada fator são estabelecidos dois níveis (limites) e são estudadas as diferentes combinações entre estes. O número de experiências é estabelecido pela relação 2^{nf} , em que nf representa o número de fatores do sistema. Assim sendo, estes desenhos permitem avaliar o efeito de cada fator, bem como a interação entre os mesmos e, ainda, obter um modelo de primeira ordem [40].

O caso mais simples deste tipo de planeamentos apresenta apenas dois fatores e dois níveis. Como descrito anteriormente, o número de experiências é estabelecido pela relação 2^{nf} , sendo que no caso de um planeamento com dois fatores e três fatores o número de experiências seria 4 e 8, respetivamente (Figura 1.11).

Normalmente, são utilizadas variáveis codificadas, pois só assim é possível reduzir o intervalo de variação experimental a um intervalo de $[-1, +1]$ e diminuir as desigualdades provocadas pelas escalas dos fatores. Assim, no caso de um planeamento com dois níveis, o nível -1 corresponde ao limite inferior estabelecido para o fator e o nível $+1$ para o limite superior. No caso de um planeamento com três níveis é, ainda incluído um ponto central representado por 0 .

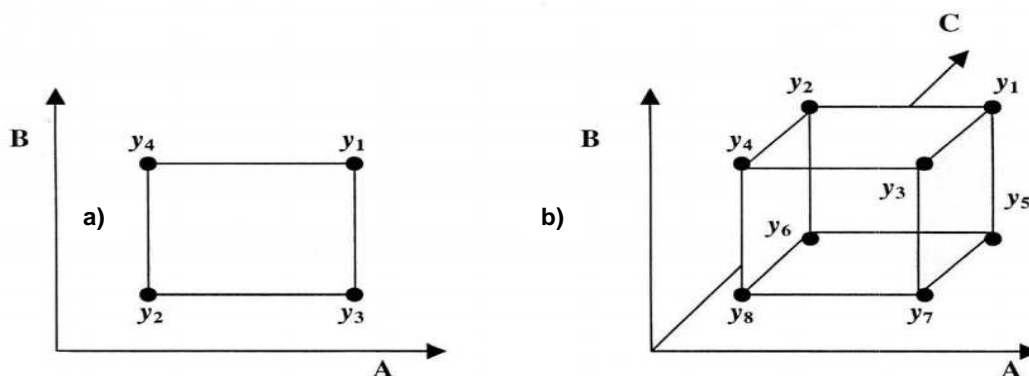


Figura 1.11 – Esquema de um planeamento fatorial completo com dois níveis e dois fatores (a) e três fatores e dois níveis (b) [42].

Após estabelecidos os respetivos níveis, é estabelecida uma matriz de planeamento (Tabela 1.5) que inclui as experiências a executar e que devem ser efetuadas aleatoriamente. Também são muito importantes as réplicas das experiências para que seja possível obter mais informação acerca do sistema em análise.

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE ANTIOXIDANTES DE SUBPRODUTOS FLORESTAIS PELO MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Tabela 1.5 – Exemplo de um planeamento fatorial completo com dois fatores e dois níveis.

Experiência	Fator A	Fator B	Interação AxB	Resposta (y_i)
1	+1	+1	+1	y_1
2	-1	-1	+1	y_2
3	+1	-1	-1	y_3
4	-1	+1	-1	y_4

Posteriormente, é feita a análise da resposta de forma a que seja possível determinar o efeito dos fatores considerados. Estes efeitos podem ser divididos em efeitos principais, que incluem os efeitos dos fatores e, efeitos secundários, que correspondem aos efeitos das interações de fatores. Relativamente ao caso de um planeamento com dois fatores e dois níveis é necessário considerar os efeitos de A, B e da interação de A com B. No caso de um planeamento com três fatores e dois níveis, o número de efeitos a considerar é superior, pois é necessário estimar o efeito principal de A, B e C, as interações AB, AC e BC e, ainda a interação entre os três fatores, ABC.

O efeito de um fator é calculado através da sua variação no sistema, enquanto os restantes fatores permanecem constantes. No caso particular de um sistema de dois fatores e dois níveis exemplificado na Figura 1.11, o efeito de A e B é dado por:

$$\text{Efeito A} = \frac{[(y_1 - y_4) + (y_3 - y_2)]}{2} \quad \text{Equação 1.3}$$

$$\text{Efeito B} = \frac{[(y_1 - y_3) + (y_4 - y_2)]}{2} \quad \text{Equação 1.4}$$

No que diz respeito ao efeito de uma interação binária, esta corresponde à média da diferença do efeito do fator A quando B está no nível mais elevado e quando B está no nível mais baixo. Este efeito é traduzido, assim, pela equação:

$$\text{Efeito interação AB} = \frac{(y_1 + y_2 - y_3 - y_4)}{2} \quad \text{Equação 1.5}$$

Apesar de uma análise permitir estimar quais os fatores mais importantes no sistema é necessária uma avaliação pormenorizada dos seus efeitos, que só será possível após uma análise estatística. Um dos melhores métodos para realizar esta análise é a análise de variância (ANOVA) [43].

Com o aumento do número de fatores ocorre, também, o aumento de experiências, fazendo com que seja praticamente inexequível o estudo de alguns sistemas através de planeamentos

como o mencionado anteriormente. A fim de solucionar este problema, são utilizados planejamentos fatoriais fracionados, que consistem na utilização de uma fração do conjunto de experiências. Apesar de solucionar o problema prático, esta solução faz com que não se obtenha uma informação completa relativamente à interação de alguns fatores.

Contudo, em determinados casos não é necessário conhecer todas as interações de fatores, mas sim determinar quais os fatores que mais influenciam a resposta do sistema em estudo.

O segundo grupo de planejamentos simultâneos inclui planejamentos que se focam na modelação e na construção de superfícies de resposta, o que significa modelos que sejam capazes de traduzir relações curvas, sendo necessários modelos de segunda ordem como o descrito anteriormente (Equação 1.2).

Sendo assim, devem ser considerados pelo menos três níveis de cada fator. Os planejamentos de compósito central são planejamentos típicos deste grupo, contudo, podem ser utilizados planejamentos fatoriais completos de três níveis (3^{nf}) [40].

O primeiro grupo inclui planejamentos como o planejamento fatorial completo com dois níveis.

1.6.6.2 Planejamentos para definir superfícies de resposta

Os planejamentos de compósito central são um dos tipos mais usados para definir superfícies de resposta. Estes planejamentos permitem a determinação de modelos polinomiais de primeira e segunda ordem, sendo uma alternativa bastante favorável, relativamente ao planejamento fatorial completo com três níveis, pois exige um menor número de experiências e fornece resultados comparáveis.

Este planejamento combina um planejamento fatorial completo com dois níveis, um planejamento adicional, normalmente, um planejamento em estrela em que os pontos experimentais estão a uma distância α do centro e, ainda, um ponto central [37, 44].

A Figura 1.12 representa planejamentos de compósito central para a otimização de sistemas com duas (a) e três variáveis (b).

Os planejamentos de compósito central apresentam as seguintes características:

- Requerem um número de experiências (N) de acordo com a seguinte relação:

$N = 2^k + 2k + c_p$, em que k representa o número de fatores e c_p o número de réplicas do ponto central;

- O valor de α depende do número de variáveis em jogo e pode ser calculado através de: $\alpha = 2^{k/4}$;
- Todos os fatores são estudados em cinco níveis diferentes ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$) [37].

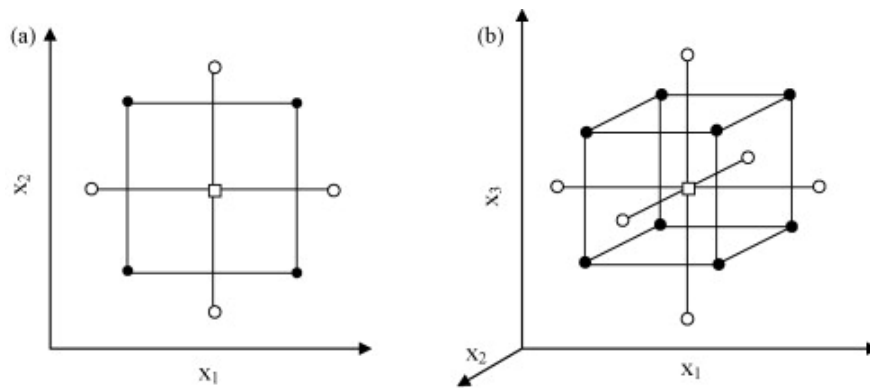


Figura 1.12 – Planejamento de composto central para as experiências: (a) duas variáveis (com $\alpha = 1,41$) e (b) três variáveis (com $\alpha = 1,68$); (●) representam o planejamento fatorial, (○) os pontos axiais e (□) os pontos centrais [37].

Nestes planejamentos, as variáveis são codificadas e apenas correspondem às posições relativas dos pontos do planejamento experimental, sendo os valores experimentais reais estabelecidos pelo investigador. Estes valores experimentais estão linearmente relacionados com os valores codificados.

1.6.7 Regressão múltipla

Um modelo multivariável é obtido quando prevemos uma dependência de vários fatores, sendo que este modelo é linear nos coeficientes de regressão, b_z , e pode ser descrito de uma forma geral pela seguinte equação:

$$y = b_0 + b_1x_1 + \dots + b_mx_m = b_0 + \sum_{(i=1,m)} b_ix_i \quad \text{Equação 1.6}$$

Em determinados casos, se necessário, pode-se rearranjar os modelos de forma a que se apresentem nesta forma genérica através de, por exemplo, uma mudança de variável.

Os polinômios são casos especiais de modelos lineares. Admita-se como exemplo que a relação entre a resposta e os fatores pode ser representada por um polinômio de grau m :

$$y = b_0 + b_1x + \dots + b_mx^m = b_0 + \sum_{(i=1,m)} b_ix^i \quad \text{Equação 1.7}$$

Para $m = 1$ o modelo obtido é definido por uma reta e, nos restantes casos, os modelos obtidos correspondem a representações gráficas não lineares, denominando-se assim como modelos lineares curvilíneos [42].

1.6.7.1 Estimativa dos coeficientes da regressão

O método dos mínimos quadrados é um dos métodos mais utilizados na estimativa de coeficientes de regressão. Admita-se um ensaio com n experiências, sendo obtidos n valores para a resposta y ($y_1, y_2 \dots y_n$), cada um com uma variância σ^2 , depois de n combinações dos fatores x ($x_1, x_2 \dots x_m$), em que $n > m$. Assim sendo, e assumindo um modelo linear, cada experiência pode ser representada pela seguinte equação:

$$y_i = b_0 + b_1 x_{i1} + \dots + b_m x_{im} + \varepsilon_i \quad x = 1, 2 \dots m \quad \text{Equação 1.8}$$

Em que:

y_i - resposta da experiência i ;

x_{im} - valor do fator m para a experiência i ;

ε_i - resíduo da experiência i .

O método dos mínimos quadrados permite estimar os coeficientes da regressão através da minimização da soma dos quadrados dos resíduos, SQR, em que é gerado um sistema de p equações com p incógnitas. Assim, estamos presente um problema de perfil matricial e começa-se por definir o vetor coluna das respostas y ($n \times 1$), o vetor coluna dos coeficientes b ($p \times 1$) e a matriz dos fatores x ($n \times p$). A primeira linha da matriz X será $[1 \ x_{11} \ x_{12} \ x_{1m}]$, em que a primeira coluna permite estimar o coeficiente da interceção b_0 . É ainda necessário definir o vetor coluna dos resíduos ε ($n \times 1$). O modelo pode ser, assim, representado matricialmente:

$$y = Xb + \varepsilon \quad \text{Equação 1.9}$$

Pelo método dos mínimos quadrados e multiplicando a equação anterior pela matriz transposta de X , X^T , temos:

$$X^T Xb = X^T y \quad \text{Equação 1.10}$$

Se a matriz for não singular é possível calcular o vetor b , sendo denominado por b' através do produto da Equação 1.10 pela matriz inversa:

$$b' = (X^T X)^{-1} X^T y \quad \text{Equação 1.11}$$

Uma vez que as variáveis foram definidas como ortogonais através de um planejamento experimental, a matriz $X^T X$ é uma matriz diagonal, o que significa que facilmente se obtém a sua inversa. Através da estimativa dos coeficientes de regressão é possível estimar o vetor resposta y , neste âmbito representado por y' . Assim, relacionando as Equações 1.9 e 1.11 obtêm-se:

$$y' = Xb' = X(X^T X)^{-1} X^T y \quad \text{Equação 1.12}$$

Com base no conjunto de valores experimentais, vetor y , e nas suas estimativas, vetor y' , é possível determinar a variância residual, s_e^2 . Este termo representa uma estimativa do erro experimental, σ^2 , no caso do modelo se ajustar ao conjunto de valores. A variância residual pode ser calculada através de:

$$s_e^2 = \frac{\sum e_i^2}{(n-p)} = \frac{\sum (y_i - y'_i)^2}{(n-p)} \quad e_i = (y_i - y'_i) \quad \text{Equação 1.13}$$

Em que e_i representa o resíduo da experiência i .

Relativamente à variância do vetor b' são determinados pela matriz da covariância, $Cov(b)$, onde os elementos da diagonal da matriz são os valores das variâncias dos coeficientes da regressão. A $Cov(b)$ é determinada através do produto da matriz inversa de $X^T X$ e o erro experimental, como é possível verificar na Equação 1.14:

$$Cov(b') = \sigma^2 (X^T X)^{-1} \quad \text{Equação 1.14}$$

1.6.7.2 Coeficientes da regressão e efeito dos fatores

Admita-se um planejamento fatorial completo com dois fatores e dois níveis. O seu modelo implícito pela análise da ANOVA dos efeitos pode ser descrito por:

$$y = \mu + a + b + (ab) + \varepsilon \quad \text{Equação 1.15}$$

Em que:

- a – efeito do fator x_1 ;
- b – efeito do fator x_2 ;
- ab – interação entre x_1 e x_2 .

Esta equação pode ser apresentada como a Equação 1.1, pois ambas representam a equação da regressão. Nesta equação b_1 representa o efeito de y quando o fator x_1 varia entre o nível 0 e o -1. Os valores de b representam metade do valor dos efeitos pois estão definidos como a diferença de y entre os níveis -1 e 1 do fator.

1.6.7.3 Análise do modelo

De seguida, serão descritos os parâmetros avaliados para analisar a qualidade do modelo de ajuste dos valores experimentais.

Análise dos resíduos e teste de normalidade

Através da análise dos resíduos é possível determinar a qualidade do conjunto de resultados experimentais obtidos. Uma maneira simples para verificar consiste na representação gráfica dos valores de resíduos e_i em função dos valores estimados para y' . A Figura 1.13 representa três exemplos de gráficos de resíduos.

Pela sua análise podemos compreender que, no caso do gráfico a), a dispersão dos resíduos é coerente, uma vez que o número de resíduos positivos ao longo de y' é semelhante ao número de resíduos negativos. No caso do gráfico b) o mesmo não se verifica, uma vez que a dispersão dos resíduos não é feita de forma uniforme. O gráfico c) representa um exemplo de resíduos associados a um conjunto de valores experimentais que deveriam ser modelados por uma curva ou superfície curva.

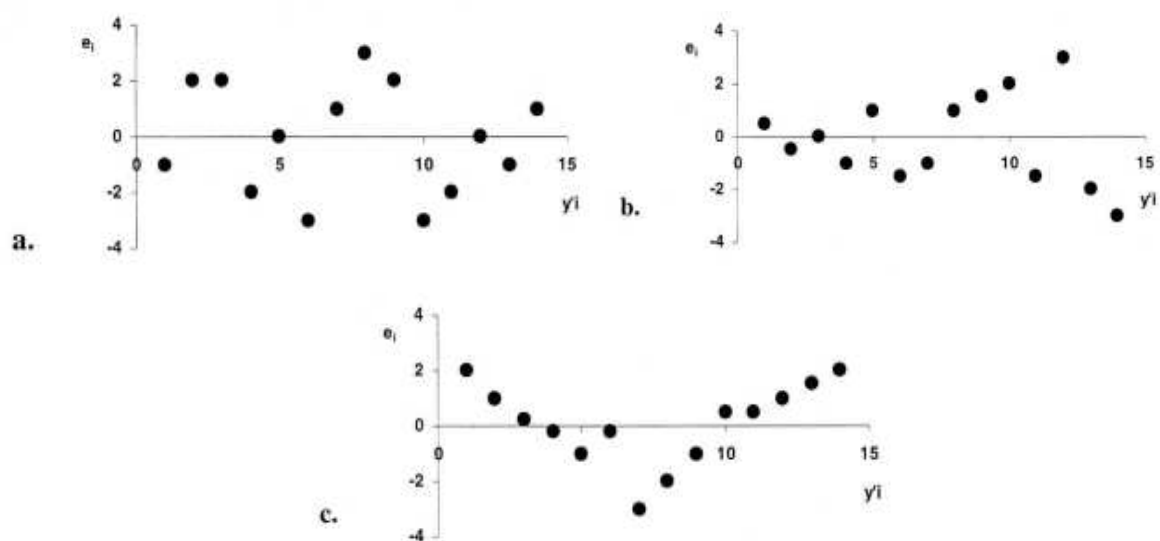


Figura 1.13 – Exemplo de gráficos e_i vs y' (adaptado de [42]).

Na maioria dos casos, os testes estatísticos são baseados em distribuições normais. Um método gráfico simples que permite avaliar se a distribuição dos resíduos se ajusta à distribuição normal consiste em ordenar por ordem crescente os resíduos obtidos, atribuindo-lhes uma frequência de ocorrência cumulativa e representar essa frequência em função dos valores experimentais. O gráfico obtido deverá apresentar uma tendência linear caso estes valores estejam distribuídos segundo uma distribuição normal (Figura 1.14).

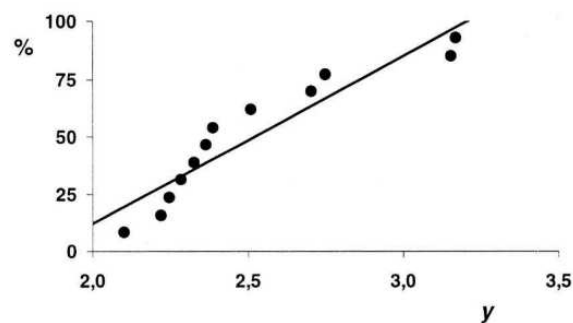


Figura 1.14 – Exemplo de representação gráfica da aplicação do método de rankit [42].

Outra aplicação deste método é a detecção de pontos experimentais anormais, denominados de *outliers*. Em determinados casos, a falta de ajuste do modelo pode-se dever apenas à existência de *outliers*, como é possível verificar na Figura 1.15, onde a eliminação de dois pontos permitiu o ajuste normal dos restantes pontos [42, 45].

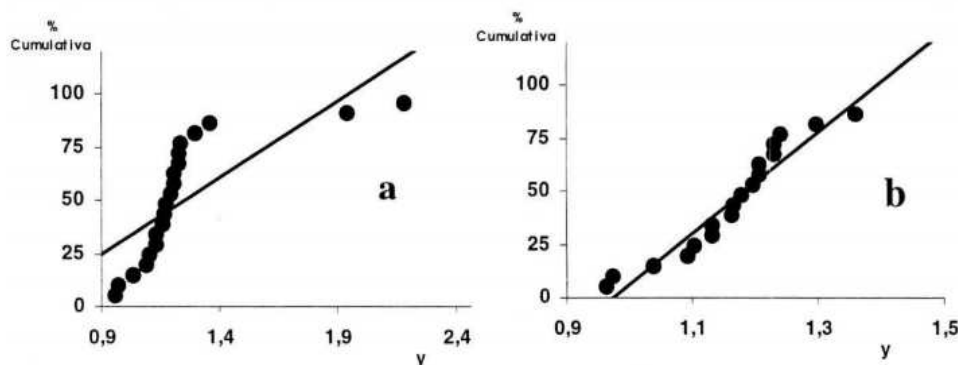


Figura 1.15 – Método de rankit aplicado a um conjunto de dados antes (a) e depois (b) da eliminação de dois outliers [42].

Análise da variância (ANOVA) da regressão e coeficiente de correlação múltipla

Um dos melhores métodos para analisar a significância dos efeitos dos fatores num planeamento experimental, como já explicitado anteriormente, é utilizando uma ANOVA. A tabela ANOVA utilizada é igual em todos os casos de validação de modelos (Tabela 1.6).

Tabela 1.6 - Tabela de análise de variância para o método dos mínimos quadrados de um modelo de parâmetros lineares (adaptado de [44]).

Fonte da variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	$SS_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MS_R = \frac{SS_R}{(p - 1)}$
Resíduos	$SS_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - p$	$MS_r = \frac{SS_r}{(n - p)}$
Ausência de ajuste (<i>Lack of fit</i>)	$SS_{lof} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MS_{lof} = \frac{SS_{lof}}{(m - p)}$
Erro puro	$SS_{pe} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MS_{pe} = \frac{SS_{pe}}{(n - m)}$
Total	$SS_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	

A variância total está dividida em duas contribuições principais: a soma de quadrados da regressão, SS_R , e a soma dos quadrados dos resíduos, SS_r . Os dois somatórios são obtidos para todos os níveis do planejamento experimental ($i = 1, 2 \dots m$), assim como todas as réplicas realizadas em todos os níveis ($j = 1, 2 \dots n_i$). O parâmetro de SS_R resulta da diferença entre a soma dos quadrados dos valores previstos pela regressão e média de todos os valores da resposta, sendo que este parâmetro apresenta $p - 1$ graus de liberdade, onde p representa o número de coeficientes do modelo.

A SS_r representa a diferença (ou resíduos) entre o somatório dos quadrados dos valores experimentais e os valores previstos para o modelo em estudo. Este parâmetro apresenta $n - p$ graus de liberdade, em que n representa o número total de valores experimentais utilizados na determinação do modelo.

Modelos que traduzem com precisão o conjunto de dados experimentais obtidos tendem a apresentar valores elevados para SS_R e valores pequenos no caso da SS_r , sendo que a sua soma resulta da SS_T ou seja, a soma total dos quadrados das diferenças entre os valores experimentais e a soma do conjunto de dados.

A fração entre a SS_R e SS_T representa o coeficiente de correlação múltipla, R^2 , que varia entre 0 e 1, sendo que se existir erro puro é impossível que R^2 atinja o valor de 1. A Equação 1.16 permite o cálculo deste coeficiente:

$$R^2 = \frac{SS_R}{SS_T} = \frac{(SS_T - SS_r)}{SS_T} = 1 - \frac{SS_r}{SS_T} \quad \text{Equação 1.16}$$

Este coeficiente tem como função avaliar o ajuste do modelo aos dados experimentais, ou seja é a correlação entre y e y' . Contudo, não pode ser utilizado para avaliar a falta de ajuste do modelo, pois não tem em conta o número de graus de liberdade para a determinação do modelo. Devido às limitações de R^2 , por vezes, utiliza-se o coeficiente de correlação ajustado. Deste modo, a Equação 1.17 representa um ajuste para diferentes números de graus de liberdade nos modelos que estão a ser comparados:

$$R_a^2 = 1 - (1 - R^2) \times \frac{(n-1)}{(n-p)} \quad \text{Equação 1.17}$$

Este coeficiente, geralmente, não aumenta com o número de variáveis. Na realidade, R_a^2 tem tendência a diminuir se se considerarem variáveis não necessárias no modelo.

A qualidade de ajuste do modelo pode apenas ser avaliada se a SS_r for dividida em duas contribuições, a soma dos quadrados da ausência de ajuste (*lack-of-fit*) e a soma dos quadrados de erro puro, representados por SS_{lof} e SS_{pe} , respetivamente. A SS_{pe} traduz o somatório dos quadrados da diferença entre os dados experimentais individuais e a média dos dados experimentais no mesmo nível. Este parâmetro apresenta $n - m$ graus de liberdade, em que m representa o número de níveis no planeamento experimental.

A SS_{lof} é a soma dos quadrados da diferença entre os valores previstos em cada nível e o valor médio experimental nesse mesmo nível e, apresenta $m-p$ graus de liberdade. Este parâmetro é determinado através da realização do teste- F , que compara a relação SS_{lof}/SS_{pe} com um valor tabelado de F para $m - p$ e $n - m$ graus de liberdade, a um nível de confiança de, normalmente, 95%. Se o quociente calculado for superior ao valor de F tabelado significa que o modelo não é adequado. Se se verificar o contrário, o modelo pode ser aceite para este nível de confiança como uma boa representação do conjunto de valores experimentais. A significância da regressão pode ser avaliada pela comparação da razão entre SS_R e SS_r e o valor tabelado da distribuição- F para $p - 1$ e $n - p$ graus de liberdade.

A regressão é significativa se o valor da razão for superior ao tabelado. Contudo, este último teste só é válido para modelos em que não haja evidência de *lack of fit*.

Uma vez que o modelo de regressão não explica o erro experimental, a percentagem máxima da variação é dado pela Equação 1.18:

$$\% \text{máxima de variação} = \frac{(SS_T - SS_{pe})}{SS_T} \times 100\% \quad \text{Equação 1.18}$$

Além disso, o modelo de validação ANOVA deve conter ainda uma análise dos erros das razões entre coeficientes e padrões, bem como gráficos residuais [37, 42, 44, 46].

A análise da significância dos coeficientes de regressão está, intrinsecamente, relacionada com a seleção de variáveis. Uma das melhores técnicas para solucionar este problema é efetuar uma análise de todos os possíveis modelos com todas as variáveis. Uma vez que os coeficientes de regressão estão relacionados com o efeito dos fatores, o significado dos coeficientes é semelhante ao significado dos efeitos que pode também ser avaliado através da ANOVA [42].

1.6.7.4 Validação do método

Depois de analisar a qualidade do modelo recorrendo aos processos descritos na alínea anterior deve-se proceder à sua validação. Para o efeito, deve ser estudada a capacidade do modelo prevê a resposta y_i em ensaios com combinações dos níveis dos fatores diferentes das do planeamento fatorial usado. Por vezes, os resultados desta validação permitem identificar situações de sobreajuste levando a selecionar modelos que explicam uma fração menor da variância dos resultados experimentais (menor R^2) mas em que os erros da previsão nos ensaios de validação podem ser explicados pelo erro experimental.

1.7 Avaliação da capacidade antioxidante total

Os compostos polifenólicos derivados de subprodutos florestais têm suscitado particular interesse devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, sendo por isso importante não só determinar essas propriedades, mas também determinar quantitativamente o seu teor.

Vários artigos científicos descrevem diferentes métodos para a quantificação de compostos fenólicos em matrizes como as folhas de eucalipto e agulhas de pinheiro.

1.7.1 Métodos quantitativos

Os métodos quantitativos para a avaliação da capacidade antioxidante total podem ser divididos em dois tipos de mecanismo principais, transferência de átomo de hidrogénio (TAH) e transferência de eletrão (TE). Independentemente do mecanismo, o resultado final será o mesmo, no entanto, a cinética e o potencial das reações são diferentes [47].

Os métodos baseados no mecanismo de TAH medem a capacidade que um composto antioxidante tem para eliminar um radical livre através da doação de um átomo de hidrogénio. As reações presentes neste mecanismo são independentes do solvente e do pH e são,

normalmente, reações rápidas. Contudo, a presença de agentes redutores, como metais, podem conduzir a conclusões erradas [47].

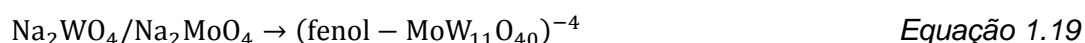
Relativamente, aos métodos baseados no mecanismo de TE, estes métodos consistem na deteção da capacidade de um potencial antioxidante para reduzir qualquer composto, incluindo metais, carbonilos e radicais. Estas reações são, geralmente, lentas pelo que se baseiam numa redução percentual da amostra ao invés da cinética.

Estes dois mecanismos ocorrem, normalmente, em simultâneo, sendo o equilíbrio determinado pela estrutura antioxidante e pelo pH [47].

Neste trabalho serão apenas desenvolvidos métodos baseados no mecanismo TE, como os métodos TPC, atividade anti-radicalar – DPPH (DPPH-RSA) e poder de redução férrica (FRAP).

Teor fenólico total – método colorimétrico de Folin-Ciocalteu

A técnica mais utilizada para a determinação do teor fenólico total é baseada no método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. O método original foi desenvolvido em 1927, para a análise de tirosina, sendo posteriormente adaptado para a determinação de compostos fenólicos totais. O método do TPC consiste na utilização de um reagente de molibdénio e tungsténio que produz um complexo colorido (azul) com absorvância máxima a um comprimento de onda de 750 nm. As Equações 1.19 e 1.20 traduzem a reação colorimétrica do reagente de Folin-Ciocalteu.



O método original do TPC é um método simples, sensível e preciso, contudo a reação é lenta a pH ácido e o método é pouco específico [47]. Este método foi sofrendo algumas alterações de forma a ultrapassar alguns dos problemas verificados na formulação original.

Atualmente, o reagente de Folin, consiste numa mistura dos ácidos fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) e fosfotungstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$), os quais se encontram no estado de oxidação 6, que em meio alcalino reagem com os compostos fenólicos e formam complexos de coloração azul de óxido de molibdénio (Mo_8O_{23}) e óxido de tungsténio (W_8O_{23}). Estes complexos metálicos encontram-se num estado de oxidação entre 5 e 6.

A coloração azul apresentada pelos complexos formados após a reação de redução permite a leitura da absorvância a um comprimento de onda de 760 nm. O ácido gálico (Figura 1.16)

é, vulgarmente, utilizado como composto fenólico padrão, sendo o resultado expresso em equivalente de ácido gálico (GAE). Na Figura 1.17 é possível observar a reação que ocorre entre o ácido gálico e o molibdénio (VI) com a formação do molibdénio (V), sendo este composto detetado espectrofotometricamente.

Apesar da sua simplicidade e sensibilidade, são diversas as substâncias, particularmente, açúcares, aminas aromáticas, dióxido de enxofre, ácido ascórbico, ácidos orgânicos, Fe (II) e Cu (I) e outros compostos redutores que interferem na determinação do teor fenólico total, sendo por isso importante considerar uma prévia eliminação destas substâncias [47-49].

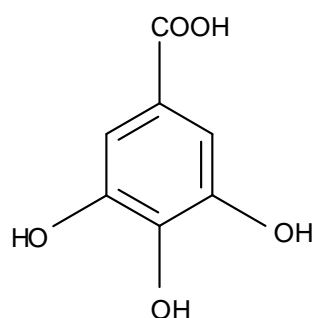


Figura 1.16 - Estrutura do ácido gálico (adaptado de [50]).

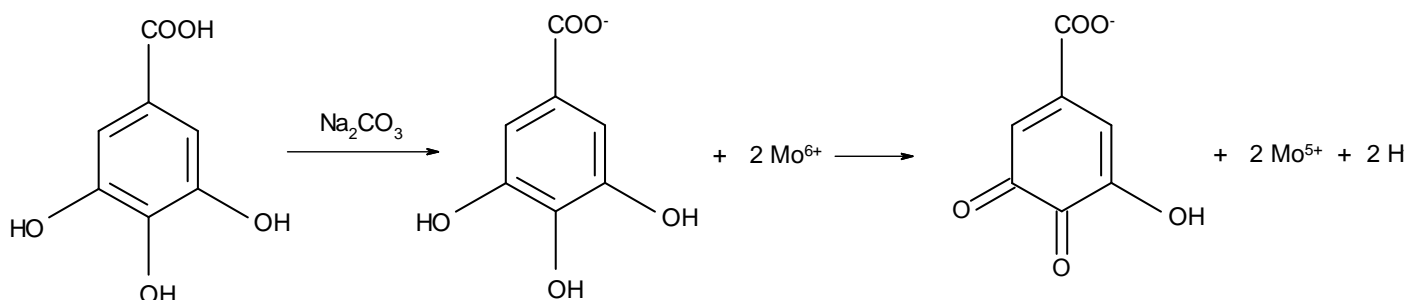


Figura 1.17 – Reação do ácido gálico com o molibdénio VI (adaptado de [50]).

Atividade anti-radicalar – DPPH (RSA)

O DPPH•, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, Figura 1.18, é um dos poucos radicais livres de azoto orgânico que apresenta uma forte coloração púrpura. Este radical está disponível comercialmente e é amplamente utilizado para a avaliação do perfil antioxidante.

A técnica para a avaliação da atividade anti-radicalar utilizando o radical DPPH• (DPPH-RSA) foi desenvolvida originalmente pela equipa de Brand-Williams [51] e mais tarde modificada, sendo ainda hoje um dos métodos mais utilizados para a avaliação da atividade anti-radicalar na análise do perfil antioxidante.

A atividade anti-radicalar é baseada numa reação de redução do radical DPPH[•], acompanhada pela perda da coloração púrpura, monitorizada por espectrofotometria a 517 nm. Este método consiste na capacidade do radical DPPH[•] de captar elétrons desemparelhados de compostos, como é o caso dos compostos antioxidantes (AH) ou outras espécies reativas (R[•]). Sendo assim, em presença de compostos que apresentam uma forte atividade antioxidante verifica-se um rápido declínio na absorvância do DPPH. Na Figura 1.19 é possível observarmos, de um ponto de vista estrutural, a reação entre o radical DPPH e um composto antioxidante. Devido à reação dos compostos fenólicos, o processo de transferência de elétrons do anião fenóxido com o radical DPPH[•] é uma reação rápida. As Equações 1.21 e 1.22 traduzem a reação entre o radical DPPH e um composto antioxidante (AH).

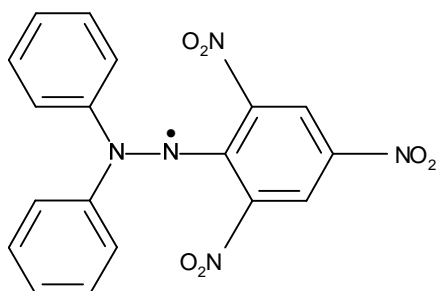


Figura 1.18 – Estrutura do radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

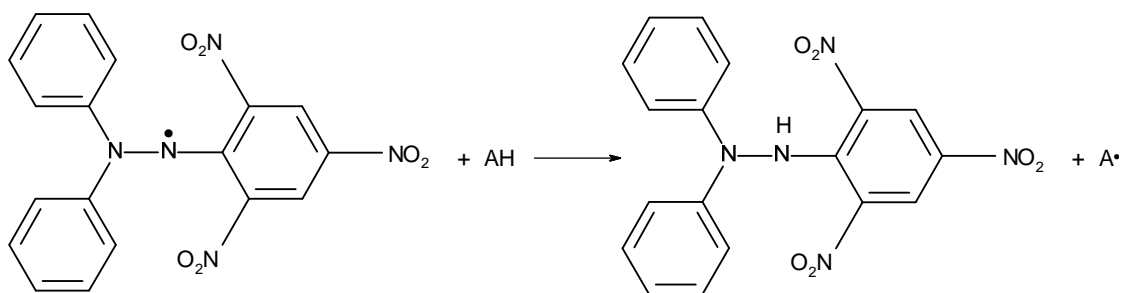


Figura 1.19 – Reação entre o radical livre DPPH[•] e um composto antioxidante (adaptado de [51]).

Usualmente são utilizados solventes orgânicos (alcoólicos), como por exemplo o etanol, para a preparação da solução de DPPH. O decréscimo de absorvância é monitorizado, normalmente, num intervalo de comprimentos de onda que pode variar entre 515 a 517 nm,

sendo o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Figura 1.20) um dos principais compostos utilizados como padrão e os resultados expressos em equivalentes de trolox [51-53].

Este método é simples e rápido, contudo apresenta algumas desvantagens, nomeadamente, a interpretação de resultados quando os compostos em análise apresentam um espectro de absorvância que se sobrepõe ao do radical DPPH a 517 nm como, por exemplo, os carotenóides [47].

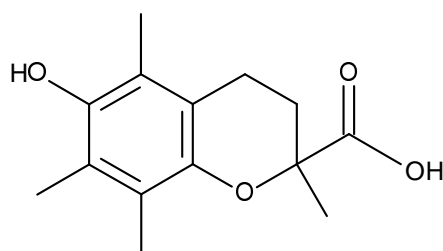


Figura 1.20 – Estrutura do Trolox.

Poder de redução férrica – FRAP

O método de FRAP, poder de redução férrica, foi inicialmente desenvolvido para análise do poder de redução em plasma, sendo posteriormente adaptado para a análise do perfil antioxidante de diferentes matrizes, como é o caso de plantas.

Este método consiste na redução, a pH ácido, do complexo ferro (III) - 2,4,6-tripiridil-s-triazina (Fe^{3+} -TPTZ), à forma de Fe^{2+} que apresenta uma coloração azul com absorção máxima a um comprimento de onda de 593 nm. O complexo Fe^{3+} -TPTZ encontra-se estequiometricamente em excesso. A reação de redução ocorre devido à presença de compostos redutores nos extratos em análise, sendo que, a formação de cor representa a capacidade de redução da amostra [54]. A Figura 1.21 representa a reação descrita anteriormente. Esta reação é não específica e, em condições de reação, qualquer composto com um potencial redox inferior ao complexo Fe^{3+} -TPTZ irá conduzir à sua redução, portanto a reação deteta compostos com um potencial redox inferior a 0,7 V [47, 54].

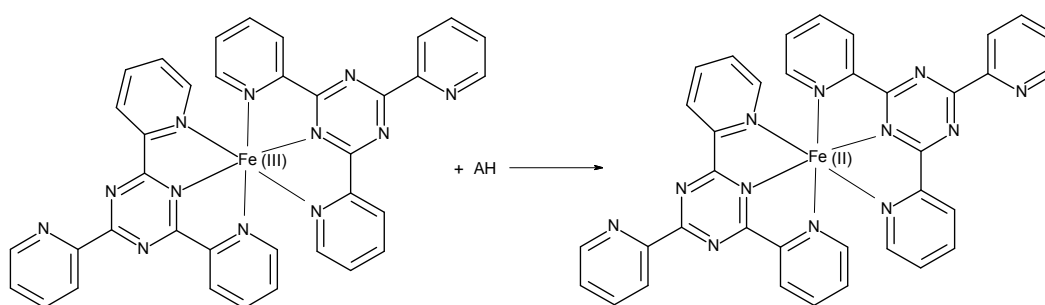


Figura 1.21 – Reação química ocorrida no método de FRAP [47].

Compostos como o ácido ascórbico, Figura 1.22, são vulgarmente utilizados como antioxidante padrão na execução deste método analítico.

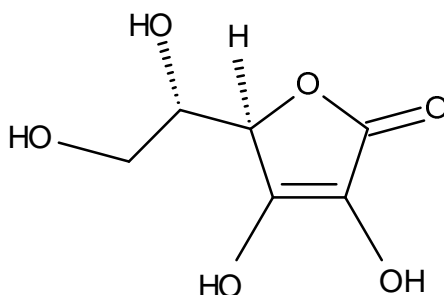


Figura 1.22 – Estrutura do ácido ascórbico.

Seguidamente serão apresentados de forma sucinta outros métodos também utilizados na avaliação da capacidade antioxidante de compostos de fontes naturais que, contudo, não foram utilizados na parte experimental deste trabalho.

Determinação do teor de flavonoides total

O método descrito para a determinação do teor de flavonoides total ou método do cloreto de alumínio, consiste na capacidade que o cloreto de alumínio tem em formar complexos estáveis com os flavonoides. Inicialmente, o extrato é oxidado com nitrito de sódio, seguido de uma reação de nitrosilação e da formação do complexo com o ião alumínio. Posteriormente, é adicionado hidróxido de sódio e o complexo vai produzir uma cor em tons rosa, confirmando, assim a presença de flavonoides, sendo a absorvância medida a 510 nm. Uma das principais desvantagens associadas a este método é o facto de que não se adequa a todas as classes de flavonoides [14, 53, 55].

Capacidade antioxidante equivalente ao trolox – TEAC

Este método é amplamente utilizado para a avaliação da capacidade de um composto eliminar radicais, ou seja a sua capacidade antioxidante total. O TEAC consiste na adição de uma solução que contém o radical ABTS[•] [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico)] e, após um determinado tempo de repouso, a concentração de ABTS[•] é quantificada espectralmente a 763 nm. Este método destaca-se devido à rápida e fácil execução e, correlaciona-se com a atividade biológica de antioxidantes [56].

Atividade anti-radicalar: Desoxirribose

Este método consiste em determinar a constante de velocidade para reações de radicais hidroxilo baseadas na degradação da desoxirribose [57].

A desoxirribose é oxidada quando exposta a radicais hidroxilo provenientes do reagente de Fenton. A extensão da degradação da desoxirribose é medida através do aquecimento dos extratos com ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), sob condições ácidas, de forma a produzir um composto rosa, sendo a absorvância medida a 532 nm [1414, 57, 58].

Atividade anti-radicalar: Anião Superóxido

O método em questão consiste na redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) [59]. Os radicais superóxido são gerados através da redução do metossulfato de fenazina (PMS) pelo NADH e posterior reação com o oxigénio. O radical superóxido é capaz de doar um electrão ao NBT, reduzindo-o a formazano, que apresenta um máximo de absorção a 550 nm. O ácido ascórbico é, normalmente, utilizado como controlo positivo [14].

1.8 Objetivos e âmbito do trabalho

A preocupação e a preferência do consumidor pela utilização de antioxidantes de origem natural demonstram a necessidade e importância do estudo destes compostos, para que sejam encontradas novas fontes naturais.

Vários estudos demonstram que espécies como o *Eucalyptus globulus* e *Pinus pinaster* são ricas fontes destes compostos aromáticos. Assim o crescente interesse na extração de compostos antioxidantes, tem vindo a aumentar significativamente com a procura pela substituição dos compostos sintéticos até então amplamente utilizados na indústria.

Outro facto importante visa a extração de compostos fenólicos através da valorização de subprodutos florestais. Assim, este trabalho focou-se em dois grandes objetivos: avaliar: avaliar capacidade antioxidante total de extratos florestais e otimizar as condições operacionais pelo método de superfície de resposta.

O primeiro objetivo consistiu na extração de compostos fenólicos de matrizes florestais, nomeadamente folhas de eucalipto e agulhas de pinheiro, através de um planeamento experimental, especificamente o planeamento de compósito central, e posteriormente da avaliação da capacidade antioxidante total dos extratos obtidos pelos métodos TPC, DPPH-RSA e FRAP. Após obtidos dos os resultados, denominados de respostas, foi efetuado um

tratamento estatístico pelo método de superfície de resposta que nos permitiu obter o conjunto de condições operacionais ótimo para o processo de extração de cada matriz analisada.

Capítulo 2 – Materiais e métodos

2 Materiais e métodos

Neste capítulo serão descritos todos os procedimentos utilizados na realização do presente trabalho, bem como todos os reagentes e padrões utilizados. Será, ainda, apresentada uma explicação sucinta da preparação de todos os padrões e soluções envolvidas na realização dos diferentes procedimentos experimentais, assim como todos os equipamentos utilizados ao longo do trabalho.

2.1 Reagentes e soluções

Para a realização do trabalho experimental em questão foram adquiridos diferentes padrões e reagentes de forma a satisfazer as condições requeridas por cada método desenvolvido.

Todos os reagentes utilizados são de elevado grau de pureza e de qualidade *p.a.*. Para a preparação das diferentes soluções foi utilizada água desionizada com resistividade superior a 5 M Ω .cm.

O ácido gálico e o Trolox (um análogo solúvel da vitamina E) foram adquiridos à empresa Sigma-Aldrich. O ácido L (+)-ascórbico foi obtido à Merck. Todos os padrões foram preparados diariamente e armazenados na ausência de luz. O reagente de Folin-Ciocalteu, o carbonato de sódio, o DPPH, o TPTZ e o cloreto de ferro (III) hexahidratado foram adquiridos à Sigma-Aldrich. O cloreto de alumínio e o hidróxido de sódio foram adquiridos à Merck. Outros reagentes como etanol absoluto e o acetato de sódio trihidratado (0.1 mol/L, pH 4,3) foram adquiridos à Merck. O ácido clorídrico (37%) foi adquirido à ACS Basic e o ácido acético glacial adquirido à Carlo Erber Reagents.

2.2 Amostragem, materiais e equipamentos

De seguida, serão descritas as fases de amostragem e extração, assim como os materiais e equipamentos utilizados nas diferentes fases do trabalho experimental.

2.2.1 Amostragem e preparação da amostra

As folhas de *Eucalyptus globulus* e agulhas de *Pinus pinaster* foram colhidas na zona norte de Portugal continental. Foram recolhidas amostras secas (resíduos da floresta) e frescas das duas espécies. No caso das amostras frescas, depois de colhidas, foram secas à temperatura

ambiente durante um período máximo de 24 horas. Relativamente às amostras secas, estas foram obtidas diretamente da floresta sem necessidade de se efetuar a etapa de secagem. Posteriormente à amostragem, foi medido o teor de humidade dos materiais, sendo que no caso das amostras frescas este processo foi efetuado antes e após a etapa de secagem.

2.2.2 Extração - Equipamento geral e condições operatórias

Numa fase inicial, as folhas de *Eucalyptus globulus* e as agulhas de *Pinus pinaster* foram trituradas, sendo utilizada para o efeito uma trituradora Moulinex® (moulinette). De seguida, 1,5 g de amostra foram pesadas numa balança analítica Kern EW 220 3NM em frascos de Erlenmeyer. Por último, foi adicionado a mistura de água-etanol perfazendo um volume total de 50 mL, nas proporções estabelecidas pelo modelo experimental em estudo e, posteriormente, colocadas num banho termostaticado ShakerBath SBS30.

2.2.2.1 Planeamento Experimental

Um dos principais objetivos do trabalho em questão foi a otimização das condições operatórias da extração sólido-líquido utilizando-se uma mistura de água-etanol como solvente. A otimização das condições operatórias foi promovida através de um planeamento fatorial de compósito central para três variáveis importantes: a temperatura, o tempo de extração e a composição da mistura água/etanol. As condições limite para cada parâmetro analisado foram fixadas, como se pode verificar na Tabela 2.1 e o respetivo planeamento fatorial encontra-se exposto na Tabela 2.2. As experiências do planeamento foram realizadas por sequência aleatória.

Tabela 2.1 - Condições limite para a otimização da técnica de extração.

Parâmetros	Limite inferior	Limite superior
Tempo (min)	10	60
Composição da mistura solvente (% água)	0	100
Temperatura (°C)	25	55

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE ANTIOXIDANTES DE SUBPRODUTOS FLORESTAIS
PELO MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

Tabela 2.2 - Planejamento fatorial para a otimização das condições de extração.

Variáveis codificadas			Variáveis reais		
Composição de solvente	Tempo	Temperatura	Composição de solvente (% de água)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
-1	-1	-1	20	20	31
-1	-1	1	20	20	49
-1	1	-1	20	50	31
-1	1	1	20	50	49
1	-1	-1	80	20	31
1	-1	1	80	20	49
1	1	-1	80	50	31
1	1	1	80	50	49
-1,682	0	0	0	35	40
1,682	0	0	100	35	40
0	-1,682	0	50	10	40
0	1,682	0	50	60	40
0	0	-1,682	50	35	25
0	0	1,682	50	35	55
0	0	0	50	35	40
0	0	0	50	35	40
0	0	0	50	35	40
0	0	0	50	35	40
0	0	0	50	35	40
0	0	0	50	35	40
0	0	0	50	35	40
0	0	0	50	35	40

2.2.3 Avaliação da capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total dos extratos foi avaliada por espectrofotometria, sendo utilizado para o efeito um leitor de microplacas Synergy HT (BioTek®). As amostras foram preparadas, diretamente, em placas de 96 poços indicadas para análise espectrofotométrica. O *layout* utilizado na preparação das amostras para os métodos de análise poderá ser consultado no Anexo A.

2.3 Métodos analíticos

Nesta secção serão descritos os procedimentos experimentais dos métodos utilizados e a preparação dos respetivos padrões e soluções.

Todos os padrões foram preparados diariamente aquando da realização das respetivas experiências, sendo sempre armazenados em frascos de vidro escuro de modo a ficarem resguardado da luz.

A Tabela 2.3 apresenta as especificações relativas à preparação dos padrões utilizados para a construção da curva de calibração dos métodos utilizados. As curvas de calibração podem ser consultadas no Anexo B.

Tabela 2.3 – Especificações relativas aos padrões dos métodos TPC, DPPH e FRAP.

Método			
Parâmetro	TPC	DPPH	FRAP
Padrão	Ácido gálico	Trolox	Ácido ascórbico
Solvente	Água desionizada	Etanol	Água desionizada
Concentração da solução de padrão mais concentrado	200 µg/mL	500 µmol/mL	100 µg/mL
Número de padrões	6	6	6
Gama de concentrações de curva de calibração	15 – 300 µg/mL	20 – 200 µmol/mL	5 – 100 µg/mL

2.3.1 Caracterização dos extratos

Após o processo de extração todos os extratos foram armazenados em frascos de vidro escuro e devidamente identificados, sendo posteriormente congelados até ao momento da análise. Posteriormente, mediu-se a capacidade antioxidante total de todos os extratos através de métodos quantitativos como o TPC, a DPPH-RSA e o FRAP.

Todos os métodos descritos foram devidamente validados para o leitor de placas, sendo a leitura da absorvância de todas as amostras e a respetivas curvas de calibração efetuadas em placas de 96 poços. Todas as medições analíticas foram efetuadas em triplicado.

2.3.1.1 Teor fenólico total – método de Folin-Ciocalteu

Inicialmente, é adicionado a cada poço 25 µL de amostra, padrão ou água desionizada, no caso dos ensaios em branco, de seguida é adicionado 75 µL de água desionizada e 25 µL do

reagente de Folin-Ciocalteu, previamente diluído com água desionizada numa proporção de 1:1, sendo esta diluição preparada diariamente. Após 6 minutos adiciona-se 100 µL de solução de carbonato de sódio (75 g/L) a cada poço. Posteriormente, a placa foi introduzida no leitor de placas onde se procede a uma ligeira agitação. Por último, a absorvância é medida a 765 nm após 90 minutos no escuro.

2.3.1.2 Atividade anti-radicalar – DPPH (RSA)

Inicialmente, são adicionados 25 µL de padrão e amostra de acordo com o *layout* apresentado na Tabela A.1 do Anexo A. Para a preparação dos ensaios brancos é utilizado etanol perfazendo um total de 225 µL. Posteriormente, é adicionado a cada poço, exceto os ensaios de branco, 200 µL de uma solução alcoólica de DPPH (0,1mmol/L) preparada diariamente e resguardada da luz. Após 30 minutos no escuro, a absorvância é medida a 517 nm.

2.3.1.3 Poder de redução férrica - FRAP

Todos os reagentes são preparados diariamente, assim como os respetivos padrões. Inicialmente, 20 µL de amostra ou padrão são colocados nos respetivos poços e, de seguida, são adicionados 180 µL de Reagente de FRAP. Este reagente é composto por tampão acetato, cloreto de ferro (III) hexahidratado e uma solução fresca de TPTZ, numa proporção 10:1:1, respetivamente. Posteriormente, a absorvância é medida a 593 nm, após uma agitação suave de 10 minutos.

2.3.2 Estudo estatístico

Os parâmetros de regressão linear para as respetivas curvas de calibração dos métodos utilizados na avaliação da capacidade antioxidante foram determinados usando a ferramenta Excel do MS Office.

Os cálculos da ANOVA, bem como o ajuste do conjunto de dados experimentais a modelos de superfície de resposta foram realizados com o programa Minitab 16, da Minitab Inc. Nos testes estatísticos foi usado um nível de significância 5%.

Capítulo 3 – Resultados e discussão

3 Resultados e discussão

Neste capítulo apresenta-se os resultados obtidos na validação dos métodos analíticos utilizados (TPC, DPPH-RSA e FRAP), a avaliação da capacidade antioxidante total das matrizes estudadas, assim como a otimização dos diferentes conjuntos de resultados obtidos para cada método de análise. Serão ainda explicadas as etapas utilizadas no processo de otimização e todos os resultados devidamente apresentados e discutidos.

3.1 Amostras verdes e secas

A Tabela 3.1 apresenta os resultados obtidos para o teor de humidade das matrizes verdes e secas para a avaliação do perfil antioxidante. No caso das matrizes verdes a determinação foi efetuada antes e após a etapa de secagem.

Tabela 3.1 – Teor de humidade relativo às matrizes verdes secas.

Teor de humidade (%)				
Matriz	Antes a secagem	Após a secagem	Matriz	
Folhas verdes de eucalipto	≈40	≈20-30	Folhas secas de eucalipto	≈10-15
Folhas verdes de pinheiro	≈70	≈60	Folhas secas de pinheiro	≈20

Após a análise da tabela acima apresentada é possível verificar que as folhas verdes de pinheiro apresentam um teor de humidade muito superior ao teor das folhas verdes de eucalipto, o que pode ser explicado devido à época de recolha das amostras. Relativamente às matrizes secas o teor de humidade apresenta resultados bastante semelhantes, uma vez que a sua recolha foi efetuada em simultâneo.

3.2 Avaliação do perfil antioxidante

A fase inicial deste trabalho consistiu na validação dos métodos experimentais (TPC, DPPH-RSA e FRAP) usados para a determinação da capacidade antioxidante total. Para isso, foram construídas, diariamente, curvas de calibração, sendo que cada padrão/amostra foi quantificado em triplicado. A validação do método foi efetuada através da obtenção de uma gama de linearidade para o antioxidante padrão de cada método utilizado, pela determinação do limite de deteção (LOD), do limite de quantificação (LOQ), da precisão e reprodutibilidade dos métodos. O LOD e o LOQ foram definidos como sendo, respetivamente, 3 e 10 vezes o

desvio padrão de 10 sinais do branco a dividir pelo declive da curva de calibração. A precisão dos métodos foi calculada a partir da determinação dos desvios padrão relativos (RSD) de ensaios realizados várias vezes ao longo do dia de trabalho.

Após a apresentação da etapa de validação, serão apresentados os resultados relativos ao perfil antioxidante das matrizes em estudo: folhas verdes e secas de *Eucalyptus globulus* e agulhas verdes e secas de *Pinus pinaster*. Os diferentes conjuntos de dados experimentais encontram-se ordenados segundo as respetivas condições de extração. A avaliação do perfil antioxidante foi obtida através da determinação do TPC, da DPPH-RSA, e do FRAP.

A Tabela 3.2 apresenta os resultados obtidos no processo de validação dos métodos analíticos. Conforme se pode observar, as zonas de linearidade obtidas foram de 15 a 300 µg/mL de AG no método TPC, de 20 a 200 µmol/mL de Trolox no método DPPH-RSA e de 5 a 100 µg/mL de AA no método FRAP. Os valores de LOD calculados foram de 1,18 µg AG/mL, 4,23 µmol Trolox/mL e 1,63 µg AA/mL respetivamente para os métodos TPC, DPPH-RSA e FRAP. Os valores de LOQ foram de 3,94 µg AG/mL para o método TPC, 14,10 µmol Trolox/mL para o método DPPH-RSA e 5,45 µg de AA/mL para o método FRAP. Os métodos mostraram ser precisos e reprodutíveis visto o RSD variar entre 3 e 4 % (inferior a 10%).

Tabela 3.2 – Parâmetros avaliados na validação dos métodos analíticos.

Parâmetros	Métodos analíticos		
	TPC	DPPH-RSA	FRAP
Antioxidante padrão	AG	Trolox	AA
Gama de linearidade	15 – 300 µg/mL	20 – 200 µmol/mL	5 – 100 µg/mL
Declive (x10 ⁻³)	6,97 ± 0,21 mL/µg	1,57 ± 0,01 mL/µmol	6,89 ± 0,88 mL/ µg
Ordenada na origem	9,66x10 ⁻³ ± 2,20x10 ⁻²	(8,44 ± 0,43) x10 ⁻¹	- 8,80x10 ⁻³ ± 0,016
r	0,998	0,995	0,997
LOD	1,18 µg/mL	4,23 µmol/mL	1,63 µg/mL
LOQ	3,94 µg/mL	14,1 µmol/mL	5,45 µg/mL
RSD	4,2 (100 µg/mL)	3,3 (300 µmol/mL)	4,1 (75 µg/mL)

3.2.1 Amostras verdes

3.2.1.1 Folhas verdes de *Eucalyptus globulus*

A Tabela 3.3 apresenta os resultados obtidos para cada método utilizado na avaliação do perfil antioxidante de extratos de folhas verdes de *Eucalyptus globulus* para as diferentes experiências realizadas.

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE ANTIOXIDANTES DE SUBPRODUTOS FLORESTAIS
PELO MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

Tabela 3.3 – Conjunto de dados experimentais para extratos de folhas verdes de Eucalyptus globulus.

Amostra	Composição (% de água)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	TPC (µgAG/g)	DPPH (mgTrolox/g)	FRAP (µgAA/g)
1	20	20	31	557±3	839±25	420±6
2	20	20	49	686±4	1122±21	581±9
3	20	50	31	577±4	953±12	405±6
4	20	50	49	665±7	1113±13	527±38
5	80	20	31	622±0	1083±17	554±11
6	80	20	49	704±22	1240±7	667±16
7	80	50	31	674±18	1122±13	574±15
8	80	50	49	848±7	1231±22	678±15
9	0	35	40	298±11	501±22	191±9
10	100	35	40	563±13	990±21	401±1
11	50	10	40	677±27	985±17	597±30
12	50	60	40	870±9	1278±18	722±24
13	50	35	25	737±1	1264±31	526±5
14	50	35	55	908±0	1242±3	707±9
15	50	35	40	726±15	1239±20	640±17
16	50	35	40	718±15	1311±13	665±5
17	50	35	40	794±18	1216±22	673±31
18	50	35	40	827±36	1207±27	640±2
19	50	35	40	747±9	1117±28	735±6
20	50	35	40	830±16	1247±33	651±3

Conforme se pode ver na Tabela 3.3 os valores obtidos para o TPC variaram entre 298 e 908 µg AG/g de amostra, no caso do método DPPH-RSA os valores obtidos variaram entre 501 e 1278 mg Trolox/g de amostra, enquanto para o método FRAP os valores experimentais oscilaram entre 191 e 735 µg AA/g de amostra.

No entanto, é de salientar que o valor mínimo obtido para os três métodos utilizados (amostra 9) corresponde à utilização das condições experimentais de extração com 100 % de etanol durante 35 minutos à temperatura de 40 °C.

No que concerne ao teor máximo de composto fenólicos totais obtido no método TPC, este localiza-se no ponto operatório de extração de 50 % de água durante 35 min e 55 °C (amostra 14). No caso da determinação do DPPH-RSA a atividade anti-radicalar máxima foi obtida quando se usaram as condições experimentais de 50% de água, como solvente extrator, durante 60 minutos e a 40°C (amostra 12). O valor máximo obtido no método FRAP corresponde à amostra 19, onde se usaram as condições de extração de 50 % de água durante 35 minutos a 40 °C. É de realçar que os teores máximos obtidos de capacidade antioxidante total nos três métodos correspondem à utilização de uma composição de solvente de água/etanol de 50/50.

3.2.1.2 Agulhas verdes de *Pinus pinaster*

A Tabela 3.4 apresenta os valores de capacidade antioxidante total obtidos para extratos de agulhas verdes de *Pinus pinaster*.

Tabela 3.4 - Conjunto de dados experimentais obtidos para extratos de agulhas verdes de Pinus pinaster.

Amostra	Composição (% de água)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	TPC (µgAG/g)	DPPH (mgTrolox/g)	FRAP (µgAA/g)
1	20	20	31	116±2	289±2	232±4
2	20	20	49	179±3	345±2	297±4
3	20	50	31	127±7	308±1	239±2
4	20	50	49	179±0	330±9	306±3
5	80	20	31	140±1	325±7	287±5
6	80	20	49	245±1	425±4	437±2
7	80	50	31	191±6	337±8	325±1
8	80	50	49	257±28	445±5	490±2
9	0	35	40	72±4	219±7	146±2
10	100	35	40	117±3	364±3	222±7
11	50	10	40	200±7	355±8	331±4
12	50	60	40	220±4	367±14	383±7
13	50	35	25	213±7	395±8	378±8
14	50	35	55	324±3	501±12	538±4
15	50	35	40	309±6	465±6	512±6
16	50	35	40	282±10	466±9	488±1
17	50	35	40	300±10	486±1	518±3
18	50	35	40	294±20	457±1	523±6
19	50	35	40	291±2	452±4	498±2
20	50	35	40	297±8	465±7	502±4

Os teores em compostos fenólicos totais obtidos no método TPC variaram entre 72 e 324 µg AG/g de amostra, enquanto que no DPPH-RSA os teores variaram entre 219 e 501 mg trolox/g de amostra, e no método FRAP os valores obtidos oscilaram entre 146 e 538 µg AA/g de amostra.

É de salientar que os valores mínimos para os três métodos foram obtidos para a amostra 9, com as condições experimentais de 100 % de etanol, 35 minutos e 40 °C. Relativamente aos teores máximos, estes foram obtidos na amostra 14 (50% de água, 35 minutos e 55°).

3.2.2 Amostras secas

3.2.2.1 Folhas secas de *Eucalyptus globulus*

A Tabela 3.5 apresentam os dados experimentais obtidos para os extratos de folhas secas de *Eucalyptus globulus* para as diferentes experiências estabelecidas pelo planeamento experimental utilizado.

Tabela 3.5 - Conjunto de dados experimentais obtidos para extratos de folhas secas de Eucalyptus globulus.

Amostra	Composição (% de água)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	TPC (µg/g)	DPPH (mg/g)	FRAP (µg/g)
1	20	20	31	488±3	635±10	345±6
2	20	20	49	346±5	608±7	311±6
3	20	50	31	560±1	648±9	398±10
4	20	50	49	417±7	663±1	434±3
5	80	20	31	516±8	666±1	570±6
6	80	20	49	614±1	658±3	515±4
7	80	50	31	638±5	663±2	555±0
8	80	50	49	715±7	659±3	468±2
9	0	35	40	171±20	297±1	130±3
10	100	35	40	872±10	662±2	633±5
11	50	10	40	582±4	666±1	494±9
12	50	60	40	643±18	661±6	599±5
13	50	35	25	616±6	666±0	523±4
14	50	35	55	771±20	664±1	542±3
15	50	35	40	654±8	662±4	538±1
16	50	35	40	656±	663±2	538±7
17	50	35	40	575±7	663±1	539±1
18	50	35	40	670±4	662±3	522±8
19	50	35	40	626±12	661±3	537±3
20	50	35	40	637±11	662±1	530±3

Analisando a Tabela 3.5 verifica-se que os valores experimentais mínimos obtidos para os três métodos situam-se no ponto experimental 9 (100 % de etanol, 35 minutos e 40 °C) correspondendo aos valores de 171 µg AG/g de amostra; 297 µg trolox/g de amostra e 130 µg AA/g de amostra, respetivamente para os métodos TPC, DPPH-RSA e FRAP.

Os teores máximos de capacidade antioxidante total correspondem ao ensaio número 10 (100 % de água, 35 minutos e 40 °C), tendo-se obtido os valores de 872 µg AG/g de amostra; 662 µg trolox/g de amostra e 633 µg AA/g de amostra.

É de realçar que no caso do método DPPH-RSA, e como exceção da amostra 9 (onde se obteve o valor 297 µg trolox/g de amostra), os valores experimentais obtidos foram muito semelhantes oscilando entre 608 e 666 µg trolox/g de amostra.

3.2.2.2 Agulhas secas de *Pinus pinaster*

A Tabela 3.6 apresenta as respostas analíticas obtidas para os extratos de agulhas secas de *Pinus pinaster* para as diferentes experiências estabelecidas pelo planejamento experimental utilizado.

Tabela 3.6 - Conjunto de dados experimentais para extratos de agulhas secas de Pinus pinaster.

Amostra	Composição (% de água)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	TPC (µg/g)	DPPH (mg/g)	FRAP (µg/g)
1	20	20	31	238±3	66±0	119±1
2	20	20	49	266±1	66±0	113±1
3	20	50	31	279±5	65±1	139±1
4	20	50	49	253±3	63±0	111±0
5	80	20	31	226±7	56±1	125±1
6	80	20	49	243±0	63±0	132±1
7	80	50	31	254±6	57±1	150±0
8	80	50	49	243±1	64±0	120±2
9	0	35	40	110±3	31±2	40±1
10	100	35	40	102±3	31±3	61±1
11	50	10	40	308±7	61±2	145±4
12	50	60	40	332±4	63±0	176±2
13	50	35	25	307±5	63±1	163±6
14	50	35	55	354±1	62±1	173±6
15	50	35	40	335±8	64±0	164±2
16	50	35	40	308±5	64±0	148±3
17	50	35	40	353±7	64±0	160±6
18	50	35	40	371±3	62±1	167±4
19	50	35	40	316±15	64±0	154±3
20	50	35	40	306±3	64±0	160±3

Conforme se pode observar na Tabela 3.6, os valores obtidos para o TPC variaram entre 102 e 371 µg AG/g de amostra correspondendo, respetivamente, ao ensaio 10 (100% de água, 35 minutos e 40 °C) e ao ensaio 18 (50% de água, 35 minutos e 40 °C).

No caso dos teores obtidos pelo método DPPH-RSA, estes variaram entre 31 mg trolox/g, ensaio 9 e 10), que corresponde exatamente às condições limite relativamente à percentagem de solvente (ensaio 9: 0 % de água; ensaio 10: 100 % de água) e 66 mg trolox/g de amostra (ensaios 1 e 2, correspondendo a situações de 20 % de água, 20 minutos e temperatura de 31 e 49 °C, respetivamente). É de realçar que, com exceção dos ensaios 9 e 10, os valores obtidos para o DPPH-RSA oscilaram entre 57 e 66 mg trolox/g de amostra.

Os teores obtidos para o método FRAP variaram entre 40 µg AA/g (ensaio 9: 0% de água, 35 minutos e 40°C) e 176 µg AA/g (ensaio 12: 50% de água, 60 minutos e 40 °C).

3.3 Otimização das condições operacionais na avaliação do perfil antioxidante

O presente trabalho consistiu na otimização das condições de extração de quatro matrizes distintas através de um planeamento de compósito central. Numa fase inicial foram analisados quais os fatores que teriam mais influência sobre a resposta do sistema em questão. Assim sendo, através da literatura e da experiência já adquirida foram selecionados três fatores, como sendo alguns dos fatores mais determinantes na qualidade da extração. Para cada matriz foram efetuadas duas extrações de forma a comprovar os resultados obtidos. O planeamento experimental utilizado foi, anteriormente, apresentado na secção 2.2.2.1 - Tabela 2.2. A Tabela 3.7 apresenta os fatores selecionados, bem como o respetivo código. Inicialmente, todos os fatores, assim como todas as interações entre fatores, foram consideradas para a construção do modelo polinomial. Posteriormente, através da ANOVA do modelo foi efetuada uma análise da significância de cada fator e interação e após essa análise foram apenas considerados os fatores com efeito significativo para o sistema (nível de significância de 5%).

Tabela 3.7 - Fatores e respetivos códigos.

Fator	Código
Composição de água (%)	A
Tempo (minutos)	B
Temperatura	C

A Tabela 3.7 apresenta um resumo da informação relativa ao ajuste dos diferentes modelos otimizados, cujos resultados serão explicados posteriormente.

As tabelas detalhadas relativas à análise de variância (ANOVA) da regressão encontram-se no Anexo C, bem como os respetivos gráficos de resíduos.

Tabela 3.8 - Resumo de resultados para os modelos polinomiais.

Amostra		Método	Coeficientes de regressão		Probabilidade associada à ausência de ajuste (LOF)	Coeficiente de correlação ajustado (R_a^2)
Matrizes verdes	Folhas de <i>Eucalyptus globulus</i>	TPC	Constante	783,49	0,552	0,8936
			A	59,15		
			B	38,13		
			C	55,49		
			AxA	-122,17		

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE ANTIOXIDANTES DE SUBPRODUTOS FLORESTAIS PELO MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

		DPPH	Constante	1243,52	0,046	0,8569
			A	107,752		
			C	49,1733		
			AxA	-169,315		
		FRAP	Constante	655,499	0,356	0,9366
			A	65,2845		
			C	58,8541		
			AxA	-119,602		
	Agulhas de <i>Pinus pinaster</i>	TPC	Constante	264,402	0,501	0,8037
			A	22,5750		
			C	34,5960		
			AxA	-68,4196		
		DPPH	Constante	430,079	0,412	0,7211
			A	37,0999		
			C	34,0229		
			AxA	-59,2148		
FRAP		Constante	455,708	0,507	0,7765	
		A	43,5261			
		C	52,5215			
		AxA	-107,052			
Matrizes secas	Folhas de <i>Eucalyptus globulus</i>	TPC	Constante	645,207	0,794	0,7655
			A	86,1236		
			AxA	-112,473		
		DPPH		0,000		
		FRAP		0,005		
		Agulhas de <i>Pinus pinaster</i>	TPC	Constante	320,769	0,615
	A			-3,22347		
	C			9,40243		
	AxA			-75,7766		
	DPPH			0,013		
	FRAP		Constante	162,099	0,904	0,9267
			A	5,86356		
			C	5,97120		
			AxA	-38,3021		

3.3.1 Amostras verdes

3.3.1.1 Folhas verdes de *Eucalyptus globulus*

Otimização do método para a determinação do teor fenólico total

Relativamente ao método TPC, através da ANOVA, foi possível verificar que os coeficientes que representam maior efeito são a composição e a temperatura, pois apresentam valores

superiores para F , relativamente ao tempo, que apesar de demonstrar significância, o seu efeito não é tão importante como o dos restantes fatores. Não se verificaram interações entre fatores. Outro aspeto importante a denotar, é que o LOF não é significativo, ou seja a variância não explicada pelo modelo polinomial pode ser justificada com o erro experimental (erro puro). Este modelo consegue explicar aproximadamente, 90 % da variância dos resultados.

O modelo polinomial obtido para a resposta do sistema é traduzido pela seguinte expressão:

$$\text{Resposta } (y) = 783,49 + 59,15A + 38,13B + 55,49C - 122,17A^2$$

Por último, foram construídas as respetivas superfícies de resposta do teor fenólico total em função dos fatores, representadas nas Figuras 3.1 e 3.2. Estas superfícies mostram que para a composição é possível definir um valor ótimo, correspondente a cerca de 50% de etanol na mistura e para os outros dois fatores o valor de TPC aumenta com a temperatura e com o tempo para a gama de valores experimentais estudada.

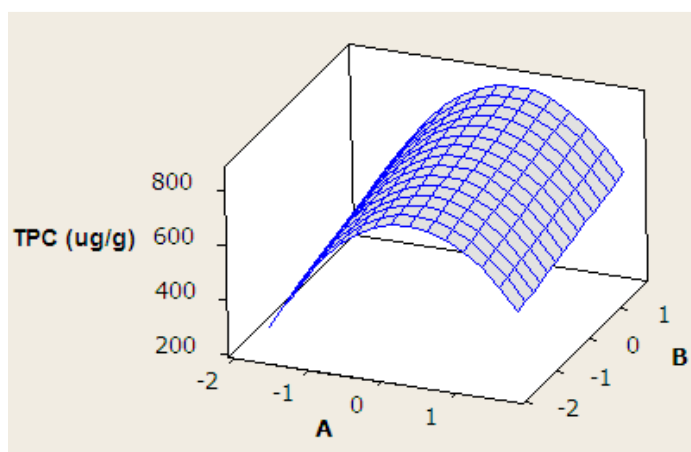


Figura 3.1 – Representação da superfície de resposta do teor fenólico total em função dos fatores concentração (A) e tempo (B) para temperatura (C) constante (C=0).

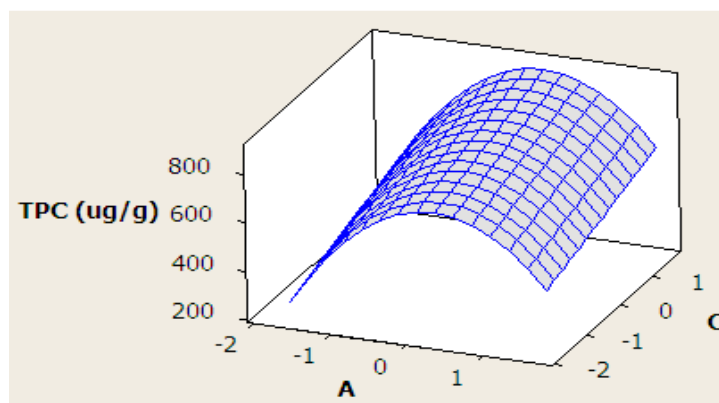


Figura 3.2 - Representação da superfície de resposta do teor fenólico total em função dos fatores concentração (A) e temperatura (C) para tempo (B) constante (B=0).

Otimização do método para a determinação da atividade anti-radicalar

Os coeficientes identificados, no caso do método de DPPH, foram a composição e a temperatura. Tal como no modelo obtido para TPC não se verificam interações entre fatores. Relativamente ao LOF, apesar do seu valor se encontrar no limite ($\approx 0,05$) o modelo é considerado válido uma vez que apresenta valores satisfatórios para R_a^2 , pois consegue explicar, aproximadamente, 86 % da variância dos resultados.

Pela análise dos resíduos, numa fase inicial, foi identificado um *outlier*, ponto este que foi, posteriormente, desprezado para que fosse possível ajustar os dados a um modelo. O ponto desprezado foi a experiência 11 que representava o ponto axial extremo de tempo (nível -1,682). Embora os pontos extremos sejam muito importantes no planeamento experimental, uma vez que o tempo não foi identificado como um fator com efeito significativo para o sistema, decidiu-se prosseguir a análise depois de se desprezar esta experiência, tendo-se obtido um modelo significativo.

O modelo polinomial obtido para a resposta do sistema em estudo é traduzido por:

$$\text{Resposta (y)} = 1243,52 + 107,75A + 49,17C - 169,32A^2$$

A Figura 3.3 representa a superfície de resposta da atividade anti-radicalar em função da composição e da temperatura.

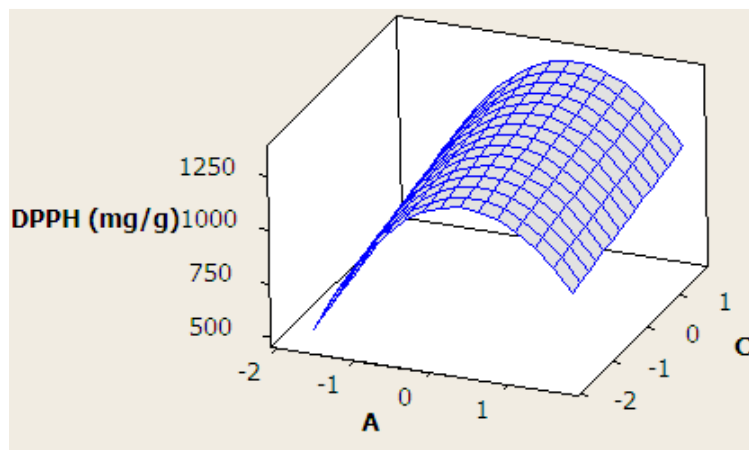


Figura 3.3 - Representação da superfície da atividade anti-radicalar em função dos fatores concentração (A) e temperatura (C).

Também neste caso se verificou que apenas a composição apresenta um valor ótimo (cerca de 50% de água) mas para a temperatura verificou-se que a resposta aumenta linearmente com esta variável.

Otimização do método do poder de redução férrica

Tal como na situação anterior, os fatores com efeito significativo na resposta do sistema em estudo foram a composição e a temperatura e não se verificam interações entre fatores. O modelo apresenta um ajuste, igualmente, satisfatório.

À semelhança do modelo anterior, foi identificado um *outlier*, igualmente desprezado de forma a que fosse possível ajustar um modelo. O ponto desprezado foi a experiência 19, que representava o ponto ao centro. Este ponto não é tão preocupante como o caso anterior, uma vez que foram efetuadas várias réplicas ao centro.

O polinómio obtido para a resposta do sistema em estudo foi:

$$\text{Resposta } (y) = 655,50 + 65,285A + 58,8541C - 119,60A^2$$

A Figura 3.4 representa a superfície de resposta do poder de redução férrica em função da composição e da temperatura.

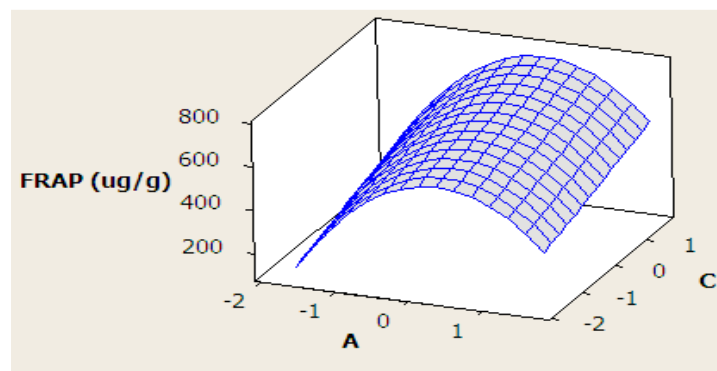


Figura 3.4 - Representação da superfície dado poder de redução férrica em função dos fatores concentração (A) e temperatura (C).

Mais uma vez a análise da superfície de resposta permitiu verificar que apenas a composição apresenta um valor ótimo (cerca de 50% de água) mas para a temperatura, a resposta aumenta linearmente com esta variável.

3.3.1.2 Agulhas verdes de *Pinus pinaster*

À semelhança da matriz anterior, folhas verdes de eucalipto, foram identificados a composição e a temperatura como os fatores com efeito significativo no sistema em estudo. Assim sendo, serão apresentados os respetivos modelos polinomiais e a representação das superfícies de resposta para cada método otimizado.

Os modelos obtidos apresentaram ajustes razoáveis, não sendo significativa a falta de ajuste em nenhum dos casos. Outro aspeto a denotar foi a ausência de *outliers*.

O polinómio obtido para o método do teor fenólico total foi:

$$\text{Resposta } (y) = 264,40 + 22,58A + 34,60C - 68,42A^2$$

A Figura 3.5 representa a superfície de resposta obtida:

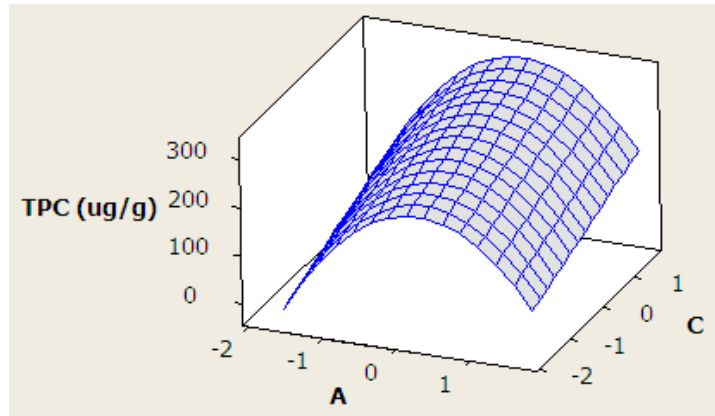


Figura 3.5 - Representação da superfície de resposta do teor fenólico total em função dos fatores concentração (A) e temperatura (C).

O polinómio obtido para o método da atividade anti-radicalar foi:

$$\text{Resposta } (y) = 430,08 + 37,10A + 34,02C - 59,22A^2$$

A Figura 3.6 representa a superfície de resposta obtida:

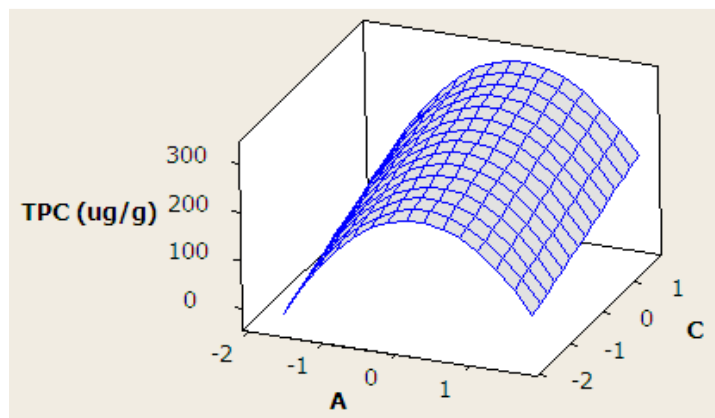


Figura 3.6 - Representação da superfície de resposta da atividade anti-radicalar em função dos fatores concentração (A) e temperatura (C).

O polinómio obtido para o método do poder de redução férrica foi:

$$\text{Resposta } (y) = 455,71 + 43,53A + 52,52C - 107,05A^2$$

A Figura 3.7 representa a superfície de resposta obtida:

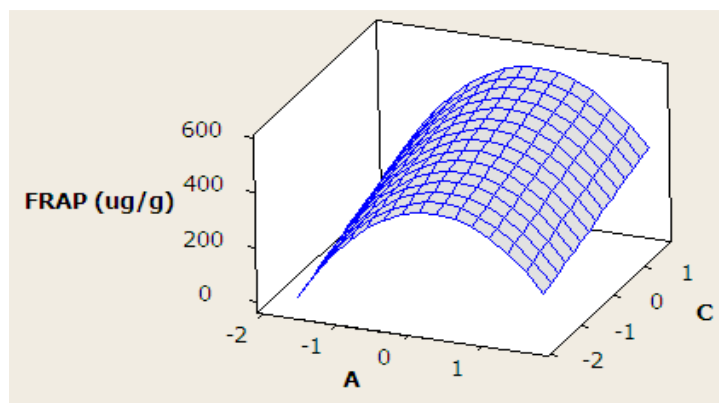


Figura 3.7 - Representação da superfície de resposta do poder de redução férrica em função dos fatores concentração (A) e temperatura (C).

Para estas três superfícies de resposta também se verificou que apenas a composição apresenta um valor ótimo (cerca de 50% de água) mas para a temperatura a resposta aumenta linearmente com esta variável.

3.3.2 Amostras secas

3.3.2.1 Folhas secas de *Eucalyptus globulus*

Otimização do método para a determinação do teor fenólico total

Através da ANOVA do modelo foi possível verificar que a composição é o único fator com efeito significativo no TPC. No que diz respeito ao R_a^2 , este apresenta um valor razoável e o LOF não é significativo.

Contudo, na fase inicial desta análise foi identificado um *outlier*, ponto este que foi, posteriormente, desprezado para que fosse possível melhorar o ajuste do modelo. O ponto desprezado foi a experiência 10 que representava o ponto axial máximo de composição (nível +1,682), sendo apenas possível o ajuste do modelo após a exclusão deste ponto. Contudo, esta situação deveria ser evitada, pois a composição é o único fator significativo para o modelo e o ponto 10 representa a experiência realizada para o máximo de composição.

O polinómio obtido para a resposta do sistema em estudo foi:

$$\text{Resposta (y)} = 645,21 + 86,12A - 112,47A^2$$

Otimização do método para a determinação da atividade anti-radicalar

No caso específico do método de DPPH não foi possível obter um bom modelo para descrever o efeito dos fatores estudados na extração sobre o DPPH.

O gráfico da Figura 3.8 apresenta o aspeto dos valores experimentais e os valores ajustados pelo *software* estatístico utilizado em função dos níveis de composição do solvente no planeamento experimental. É possível verificar o comportamento quadrático dos valores experimentais.

Foram efetuadas duas extrações segundo o mesmo planeamento experimental e sendo utilizada a mesma matriz em dias distintos. O segundo gráfico apresentado (Figura 3.9) representa uma comparação dos resultados obtidos para as duas extrações, o que vem comprovar a necessidade de executar um domínio experimental diferente. A nível experimental, é evidente que a utilização de etanol como solvente não é uma opção favorável.

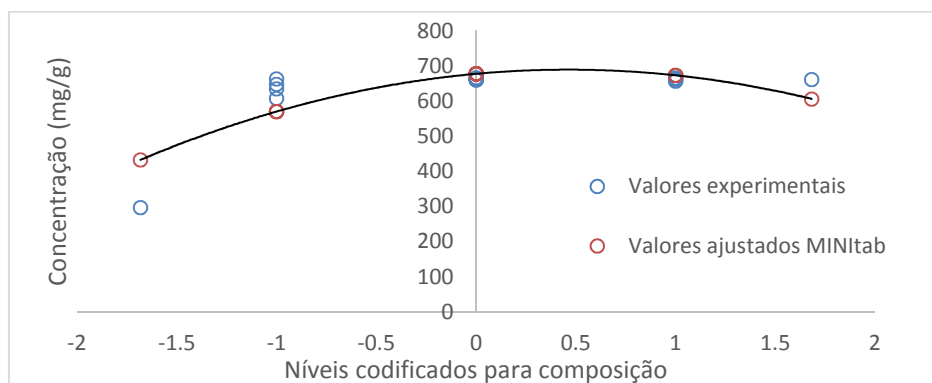


Figura 3.8 – Representação gráfica dos valores experimentais e valores ajustados pelo MINITab para o método de DPPH para folhas secas de eucalipto.

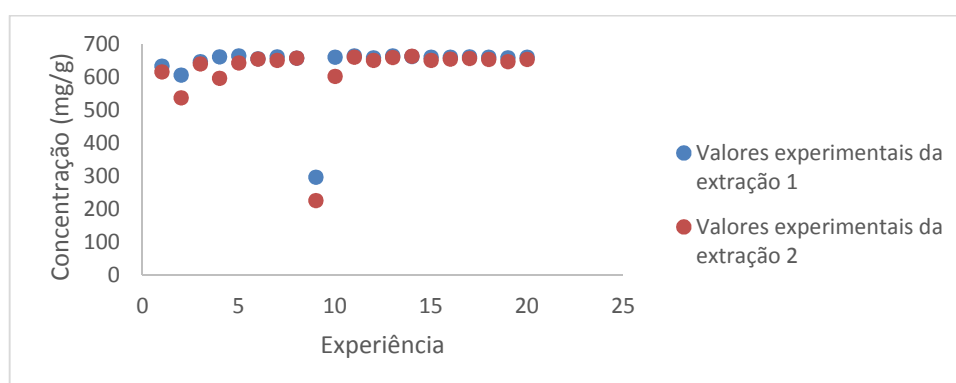


Figura 3.9 – Representação gráfica dos valores experimentais de duas extrações de folhas secas de eucalipto.

Otimização do método de poder de redução férrica

Analogamente ao sistema anterior, não foi possível obter um modelo adequado para descrever o efeito dos fatores estudados,

O gráfico da Figura 3.10 apresenta o aspeto dos valores experimentais e os valores ajustados pelo *software* estatístico utilizado em função dos níveis de composição do planeamento experimental.

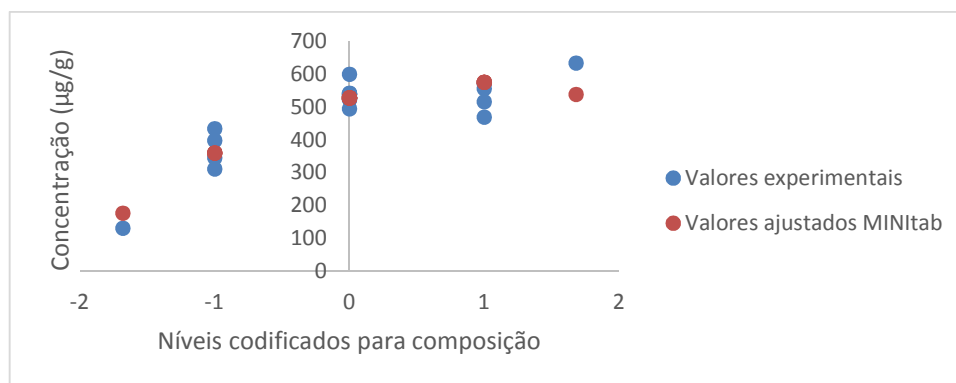


Figura 3.10 - Representação gráfica dos valores experimentais e valores ajustados pelo MINITab para o método de FRAP.

3.3.2.2 Agulhas secas de *Pinus pinaster*

Contrariamente à matriz anterior, apenas não foi possível a otimização do método de DPPH, o que vem comprovar que, de facto, o domínio experimental utilizado para este método no caso de matrizes de base seca deveria ser ajustado.

Otimização do método para a determinação do teor fenólico total

Através da ANOVA é possível verificar que apenas o efeito quadrático da composição e a temperatura teriam um efeito significativo sobre o sistema. Contudo, não faria sentido que o efeito linear da composição fosse desprezado. O efeito do tempo e das interações entre fatores não foram avaliados como significativos para o sistema em questão. Por análise do LOF ($> 0,05$) e do R_a^2 ($\approx 97\%$), estes apresentam valores razoáveis, o que justifica a validação do modelo, sendo que o modelo consegue explicar, mesmo assim, cerca de 97 % dos resultados.

É ainda de evidenciar que foi obtido um bom comportamento, relativamente aos resíduos dos dados experimentais e a ausência de *outliers*.

O polinómio obtido para a resposta do sistema em estudo foi:

$$\text{Resposta (y)} = 320,769 - 3,22347A + 9,40243C - 75,7766A^2$$

A Figura 3.11 representa a superfície de resposta obtida:

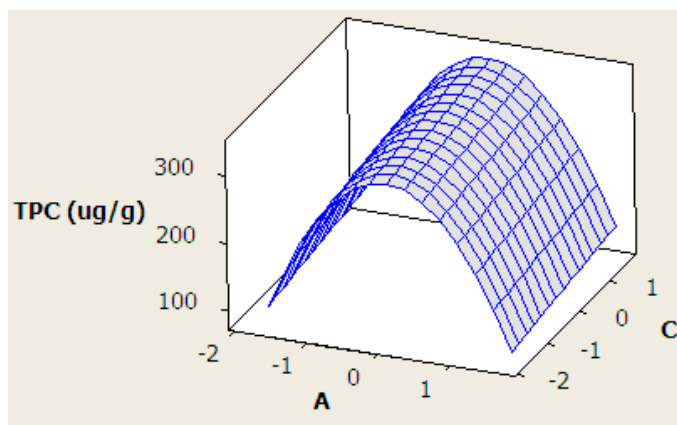


Figura 3.11 - Representação da superfície de resposta do teor fenólico total em função dos fatores concentração (A) e temperatura (C).

Otimização do método para a determinação da atividade anti-radicalar

Tal como já referido anteriormente, este sistema evidencia a mesma situação que no caso de folhas secas de eucalipto para o mesmo método. Através do gráfico da Figura 3.12, à semelhança das folhas secas de eucalipto, é possível verificar o comportamento quadráticos dos valores experimentais. Relativamente ao gráfico da Figura 3.13 é possível verificar uma coerência a nível experimental entre os dois conjuntos distintos de resultados obtidos para a mesma matriz.

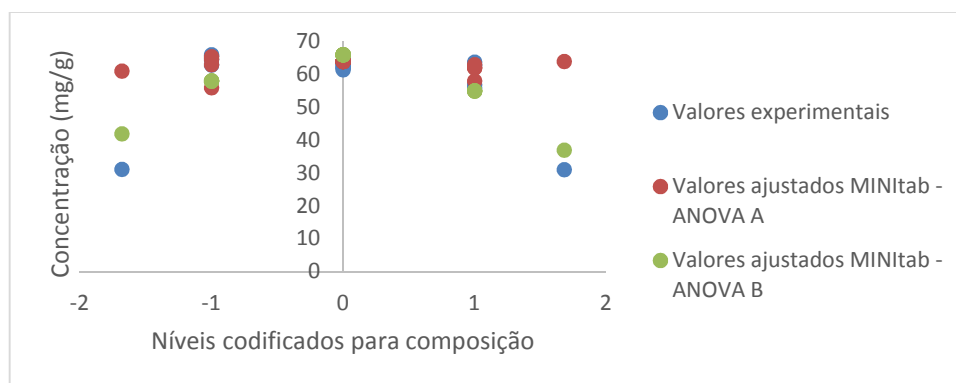


Figura 3.12 - Representação gráfica dos valores experimentais e valores ajustados pelo MINItab para o método de DPPH para agulhas secas de pinheiro.

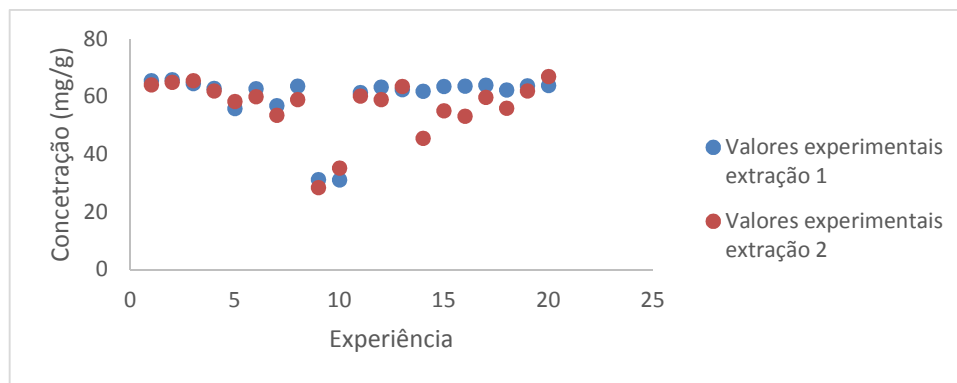


Figura 3.13 - Representação gráfica dos valores experimentais de duas extrações de agulhas secas de pinheiro.

Otimização do método de poder de redução férrica

Os efeitos da temperatura e das interações entre fatores não foram identificados como significativos.

Relativamente à qualidade do ajuste dos resultados experimentais, os fatores considerados conseguem justificar cerca de 93 % da variância dos resultados e a falta de ajuste é quase nula, uma vez que o valor de LOF se encontra bastante próximo de 1. Tal como no método TPC não foram identificados *outliers*.

O polinómio obtido para a resposta do sistema em estudo foi:

$$\text{Resposta } (y) = 162,10 + 5,86A + 5,97B - 38,30A^2$$

A Figura 3.14 representa a superfície de resposta obtida:

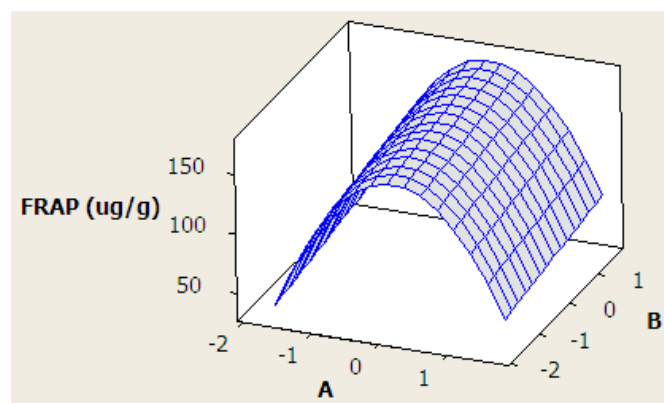


Figura 3.14 - Representação da superfície de resposta do poder de redução férrica em função dos fatores concentração (A) e tempo (B).

Capítulo 4 – Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

4 Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

Este trabalho teve por objetivo otimizar as condições de extração de compostos antioxidantes de subprodutos florestais correspondentes a quatro matrizes diferentes (folhas de eucalipto, verdes e secas, e agulhas de pinheiro, verdes e secas). A avaliação da capacidade antioxidante foi realizada através de três métodos analíticos: TPC, DPPH-RSA e FRAP.

No que se refere às matrizes verdes, os resultados apresentam alguma coerência uma vez que nos diferentes sistemas em estudo (folhas de eucalipto e agulhas de pinheiro) são identificados os mesmos fatores, composição e temperatura, como significantes.

No caso particular do teor fenólico total (TPC) para folhas de eucalipto foi, ainda, identificado o efeito do tempo, contudo, não tão significativo como os restantes, já que o coeficiente no modelo polinomial para o tempo é inferior aos coeficientes para composição e temperatura.

Apesar dos bons resultados obtidos é necessário fazer a validação dos modelos, ou seja, estudar a sua capacidade de previsão em condições ótimas.

Relativamente às matrizes secas, e no caso das folhas de eucalipto e do método TPC, a composição foi identificada como o único fator com efeito sobre o sistema, sendo obtido um ajuste razoável. Contudo, nos restantes métodos (DPPH e FRAP), não se verificou um ajuste do modelo.

Em relação às agulhas de pinheiro secas, verifica-se a mesma situação identificada nas amostras verdes. Os fatores com efeito sobre o sistema foram a composição e a temperatura. No método de FRAP foram identificados os efeitos da composição e tempo. Relativamente, ao método de DPPH, à semelhança das folhas de pinheiro, não foi possível modelar o sistema. De um ponto de vista geral, o planeamento experimental utilizado permitiu a obtenção de bons modelos no caso de amostras verdes, o mesmo não se verificando para todos os sistemas de amostras secas.

A composição (% de água) é sem dúvida o fator com mais efeito em todas as amostras (coeficientes de primeira e segunda ordem no modelo). Também a temperatura foi identificada como um fator com efeito significativo sobre os sistemas em análise.

Os resultados obtidos nas amostras secas sugerem que, no caso do método de DPPH, o domínio experimental utilizado não se adequa ao método. Outro aspeto importante seria a escolha de um solvente diferente, uma vez que os ensaios realizados com 100% de etanol denunciam a incapacidade de extração dos compostos antioxidantes, no caso de amostras secas, justificando-se também estudar gamas de temperaturas mais elevadas.

Como sugestões para trabalhos futuros, seria importante complementar este trabalho com a determinação do teor de flavonoides total, através de um método apropriado para as matrizes em estudo.

Outro aspeto igualmente interessante seria o estudo de outras matrizes de origem natural ou de outros resíduos de eucalipto e pinheiro, como a casca ou aparas de madeira, bem como a sua caracterização através de técnicas de cromatografia.

Referências Bibliográficas

- [1] INE. Estatísticas do Ambiente 2011. Instituto Nacional de Estatística; 2012.
- [2] ICFN. Estratégia Nacional para Florestas. 2006.
- [3] ICFN. IFN6, 6º Inventário Florestal Nacional – Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental em 1995, 2005 e 2010.: Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento de Território; 2013.
- [4] Piowarska N, González-Alvarez J. Extraction of antioxidants from forestry biomass: Kinetics and optimization of extraction conditions. *Biomass and Bioenergy* 2012;43:42.
- [5] Proestos C, Kapsokefalou M, Komaitis M. Analysis of naturally occurring phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS after silylation. *Journal of Food Quality* 2008;31:402.
- [6] Mota I, Rodrigues Pinto PC, Novo C, Sousa G, Guerreiro O, Guerra ÂR, et al. Extraction of Polyphenolic Compounds from *Eucalyptus globulus* Bark: Process Optimization and Screening for Biological Activity. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2012;51:6991.
- [7] Guimarães R, Sousa MJ, Ferreira ICFR. Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. *Industrial Crops and Products* 2010;32:152.
- [8] Ustun O, Senol FS, Kurkcuoglu M, Orhan IE, Kartal M, Baser KHC. Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus* species and pycnogenol. *Industrial Crops and Products* 2012;38:115.
- [9] Jerez M, Selga A, Sineiro J, Torres JL, Núñez MJ. A comparison between bark extracts from *Pinus pinaster* and *Pinus radiata*: Antioxidant activity and procyanidin composition. *Food Chemistry* 2007;100:439.
- [10] Cannac MC, Pasqualini V, Greff S, Fernandez C, Ferrat L. Characterization of Phenolic Compounds in *Pinus laricio* Needles and Their Responses to Prescribed Burnings. *Molecules* 2007;12:1614.
- [11] Pasqualini V, Robles C, Garzino S, Greff S, Bousquet-Melou A, Bonin G. Phenolic compounds content in *Pinus halepensis* Mill. needles: a bioindicator of air pollution. *Chemosphere* 2003;52:239.
- [12] Conde E, Cadahía E, Díez-Barra R, García-Vallejo MC. Polyphenolic composition of bark extracts from *Eucalyptus camaldulensis*, *E-globulus* and *E-rudis*. 1996;54:175.
- [13] Ben Hassine D, Abderrabba M, Yvon Y, Lebrihi A, Mathieu F, Couderc F, et al. Chemical composition and in vitro evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of *Eucalyptus gillii* essential oil and extracts. *Molecules* 2012;17:9540.

- [14] Singab A-N, Ayoub N, Al-Sayed E, Martiskainen O, Sinkkonen J, Pihlaja K. Phenolic Constituents of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, with Potential Antioxidant and Cytotoxic Activities. *Academy of Chemistry of Globe Publications* 2011;5:271.
- [15] Sailaja Rao P, Kalva S, Yerramilli A, Mamidi S. Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. *Free Radicals and Antioxidants* 2011;1:2.
- [16] Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science* 2008;4:89.
- [17] Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 2013;51:15.
- [18] Solutions FT. Dossiê Antioxidantes. *Food Ingredients Brasil*; 2009, p. 16.
- [19] Krimmel B, Swoboda F, Solar S, Reznicek G. OH-radical induced degradation of hydroxybenzoic- and hydroxycinnamic acids and formation of aromatic products—A gamma radiolysis study. *Radiation Physics and Chemistry* 2010;79:1247.
- [20] Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 2006;99:191.
- [21] Ramalho VC, Jorge N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova* 2006;29:755.
- [22] Galati LGd. Stabilization of sensitive substances by antioxidants from summer savory and encapsulation. *Faculdade de Engenharia da Universidade Ruhr-Bochum: Universidade Ruhr-Bochum* 2009.
- [23] Spigno G, Tramelli L, De Faveri DM. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 2007;81:200.
- [24] Pretoria Uo. Plant selection, collection, extraction and analysis of selected species.
- [25] González J, Cruz JM, Domínguez H, Parajó JC. Production of antioxidants from *Eucalyptus globulus* wood by solvent extraction of hemicellulose hydrolysates. *Food Chemistry* 2004;84:243.
- [26] Mongkholrattanasit R, Kryštůfek J, Wiener J, Studničková J. Properties of Wool and Cotton Fabrics Dyed with *Eucalyptus*, Tannin and Flavonoids. *Fibres & Textiles in Eastern Europe* 2011;19 - 2:90.
- [27] Sparr Eskilsson C, Björklund E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* 2000;902:227.

- [28] Letellier M, Budzinski H, Bellocq J, Connan J. Focused microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes from sediments and source rocks. *Organic Geochemistry* 1999;30:1353.
- [29] Kaufmann B, Christen P. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis* 2002;13:105.
- [30] Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E, Revilla-Ruiz P, Hernández-Méndez J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *Journal of Chromatography A* 2005;1089:1.
- [31] Jaime L, Rodríguez-Meizoso I, Cifuentes A, Santoyo S, Suarez S, Ibáñez E, et al. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT - Food Science and Technology* 2010;43:105.
- [32] Teixeira SdS. Determinação de Compostos Orgânicos de Grande Valor Comercial em Extratos de Espécies Vegetais - Estudo de Novas Técnicas de Extração. Engenharia Química. Porto: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto; 2003.
- [33] Santos SAO, Villaverde JJ, Silva CM, Neto CP, Silvestre AJD. Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from *Eucalyptus globulus* Labill bark. *The Journal of Supercritical Fluids* 2012;71:71.
- [34] El-Ghorab AH, El-Massry KF, Marx F, Fadel HM. Antioxidant activity of Egyptian *Eucalyptus camaldulensis* var. *brevirostris* leaf extracts. 2003;47.
- [35] Shirsath SR, Sonawane SH, Gogate PR. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 2012;53:10.
- [36] Chapter 1 System Theory. In: Stanley ND, Stephen LM, editors. *Data Handling in Science and Technology*: Elsevier; 1993, p. 1.
- [37] Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 2008;76:965.
- [38] Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J. Chapter 4 An introduction to hypothesis testing. *Data Handling in Science and Technology*: Elsevier; 1998, p. 73.
- [39] Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J. Chapter 23 Fractional factorial designs. *Data Handling in Science and Technology*: Elsevier; 1998, p. 683.
- [40] Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J. Chapter 21 An introduction to experimental design. *Data Handling in Science and Technology*: Elsevier; 1998, p. 643.

- [41] Rodič TCDGol. Optimal design of perform geometry and tribological conditions in can forming. *Engineering computations* 2005;972.
- [42] Dias JRM. Desenvolvimento e otimização de sistemas quimioluminescentes de detecção de espécies químicas em águas. *Química: Faculdade Ciências da Universidade do Porto*; 2001, p. 154.
- [43] Stanley ND, Stephen LM. Chapter 14 Factorial-Based Designs. *Data Handling in Science and Technology: Elsevier*; 1993, p. 317.
- [44] Ferreira SLC, Bruns RE, da Silva EGP, dos Santos WNL, Quintella CM, David JM, et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A* 2007;1158:2.
- [45] Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J. Chapter 22 Two-level factorial designs. *Data Handling in Science and Technology: Elsevier*; 1998, p. 659.
- [46] Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J. Chapter 6 Analysis of variance. *Data Handling in Science and Technology: Elsevier*; 1998, p. 121.
- [47] Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:4290.
- [48] Sousa CMdM, Silva HRe, Vieira-Jr. GM, Ayres MCC, Costa CLSd, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova* 2007;30:351.
- [49] Folin O, Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry* 1927;73:627.
- [50] Oliveira S. Determinação da capacidade anti-radicalar de produtos naturais utilizando-se a quimiluminiscência do luminol e ensaios fotométricos com radicais livres. *Química Fundamental: Universidade de São Paulo*; 2011, p. 95.
- [51] Harbaum B. *Characterization of Free and Cell-Wall-Bound Phenolic Compounds in Chinese Brassica Vegetables: Der Andere Verlag*; 2007.
- [52] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 1995;28:25.
- [53] Herald TJ, Gadgil P, Tilley M. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2012;92:2326.
- [54] Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* 1996;239:70.

- [55] Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50:3010.
- [56] Arts MJTJ, Sebastiaan Dallinga J, Voss H-P, Haenen GRMM, Bast A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry* 2004;88:567.
- [57] Cheng Z, Li Y, Chang W. Kinetic deoxyribose degradation assay and its application in assessing the antioxidant activities of phenolic compounds in a Fenton-type reaction system. *Analytica Chimica Acta* 2003;478:129.
- [58] Halliwell B, Gutteridge JMC. Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: The role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Letters* 1981;128:347.
- [59] Liu F, Ooi VEC, Chang ST. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences* 1997;60:763.

ANEXOS

Anexo A. Layout utilizado na preparação dos métodos de análise.

Tabela A.1 – Layout utilizado para preparação das placas de 96 poços do leitor de microplacas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK	BLK
B	STD1.1	STD1.2	STD1.3	STD2.1	STD2.2	STD2.3	STD3.1	STD3.2	STD3.3	STD4.1	STD4.2	STD4.3
C	STD5.1	STD5.2	STD5.3	STD6.1	STD6.2	STD6.3						
D	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL
E	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL
F	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL
G	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL
H	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL	SPL

BLK – ensaios branco; STD – padrões; SPL – amostras.

Anexo B. Curvas de calibração

1. Teor fenólico total – amostras verdes e secas

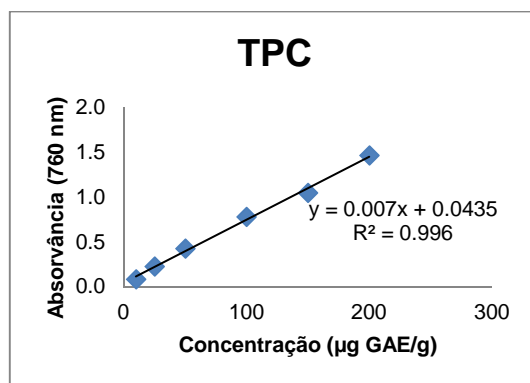


Figura B.1 - Curvas de calibração para o TPC para as amostras verdes e secas.

2. Amostras verdes

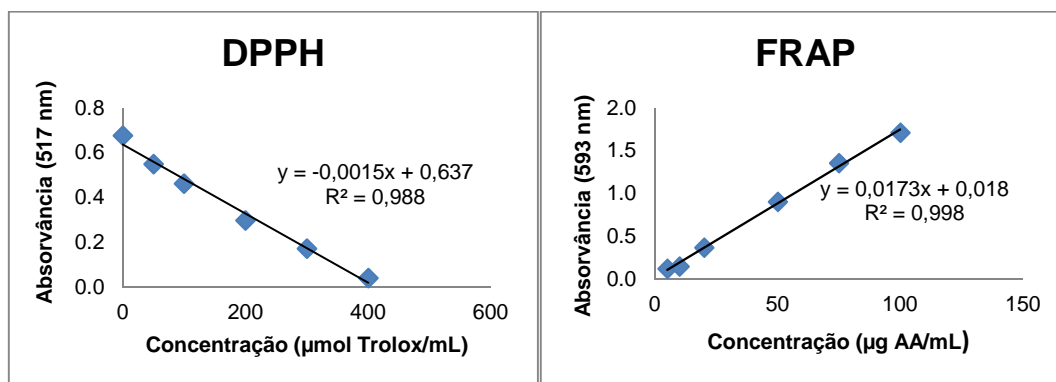


Figura B.2 - Curvas de calibração para folhas verdes de *Eucalyptus globulus*.

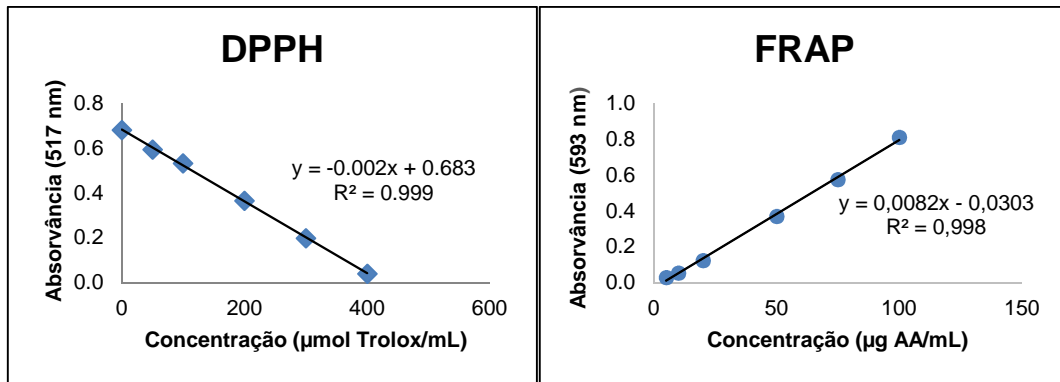


Figura B.3 - Curvas de calibração para agulhas verdes de *Pinus pinaster*.

3. Amostras secas

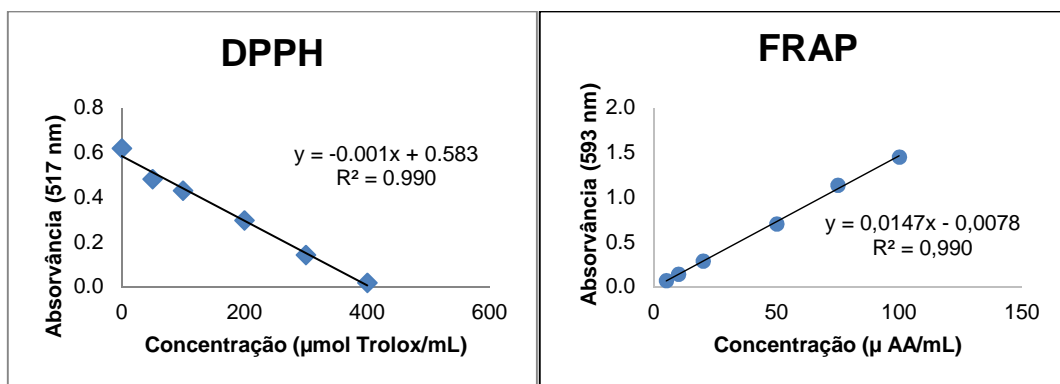


Figura B.4 - Curvas de calibração para folhas secas de *Eucalyptus globulus*.

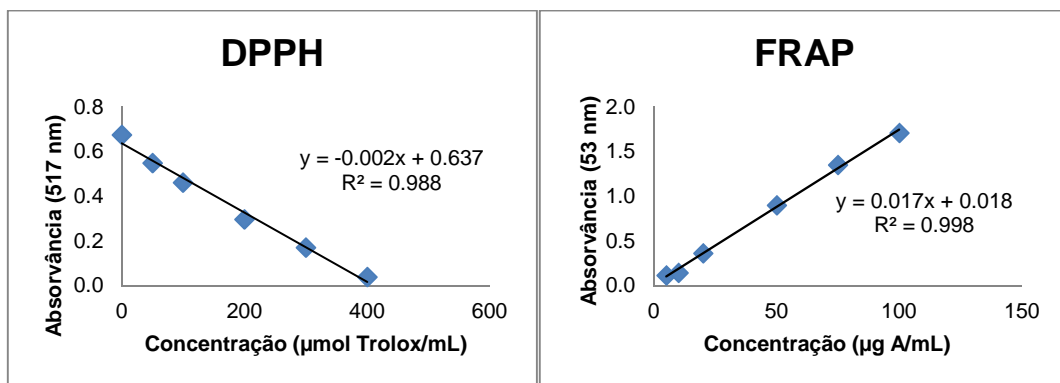


Figura B.5 - Curvas de calibração para agulhas secas de *Pinus pinaster*.

Anexo C. Análise da variância (ANOVA) da regressão e Gráficos de Resíduos

1. Folhas verdes de *Eucalyptus globulus*.

i) Teor fenólico total

Tabela C.1 - ANOVA das respostas para o teor fenólico total de folhas verdes de *Eucalyptus globulus*.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Soma de quadrados ajustada	Média quadrática ajustada	F	P
Regressão	4	328721	328721	82180	40,89	0,000
Linear	3	109687	109687	36562	18,19	0,000
A	1	47783	47783	47783	23,78	0,000
B	1	19853	19853	19853	9,88	0,000
C	1	42051	42051	42051	20,93	0,000
AxA	1	219034	219034	219034	108,99	0,000
Resíduos	15	30144	30144	2010		
Falta de ajuste (LOF)	10	109857	109857	1986	0,97	0,552
Erro puro	5	10287	10287	2057		
Total	19	358865				
R_a²	0,8936					

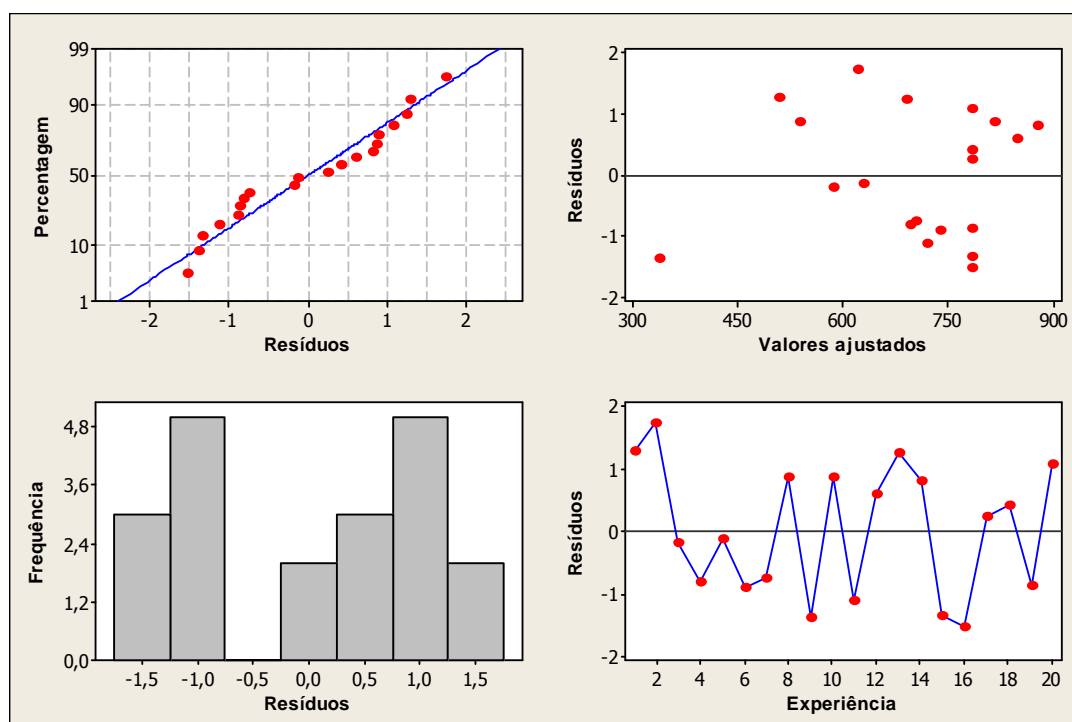


Figura C.1 – Gráficos de resíduos para o método TPC de folhas verdes de *Eucalyptus globulus*.

ii) Atividade anti-radicalar

Tabela C.2 - ANOVA das respostas para a atividade anti-radicalar de folhas verdes de Eucalyptus globulus.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Soma de quadrados ajustada	Média quadrática ajustada	F	P
Regressão	3	598200	598200	199400	36,92	0,000
Linear	2	191586	191586	95793	17,74	0,000
A	1	158564	158564	158564	29,36	0,000
C	1	33023	33023	33023	6,11	0,026
AxA	1	406613	406613	406613	75,30	0,000
Resíduos	15	81004	81004	5400		
Falta de ajuste (LOF)	5	51103	51103	10221	3,42	0,046
Erro puro	10	29901	29901	2990		
Total	18	679201				
R_a^2	0,8569					

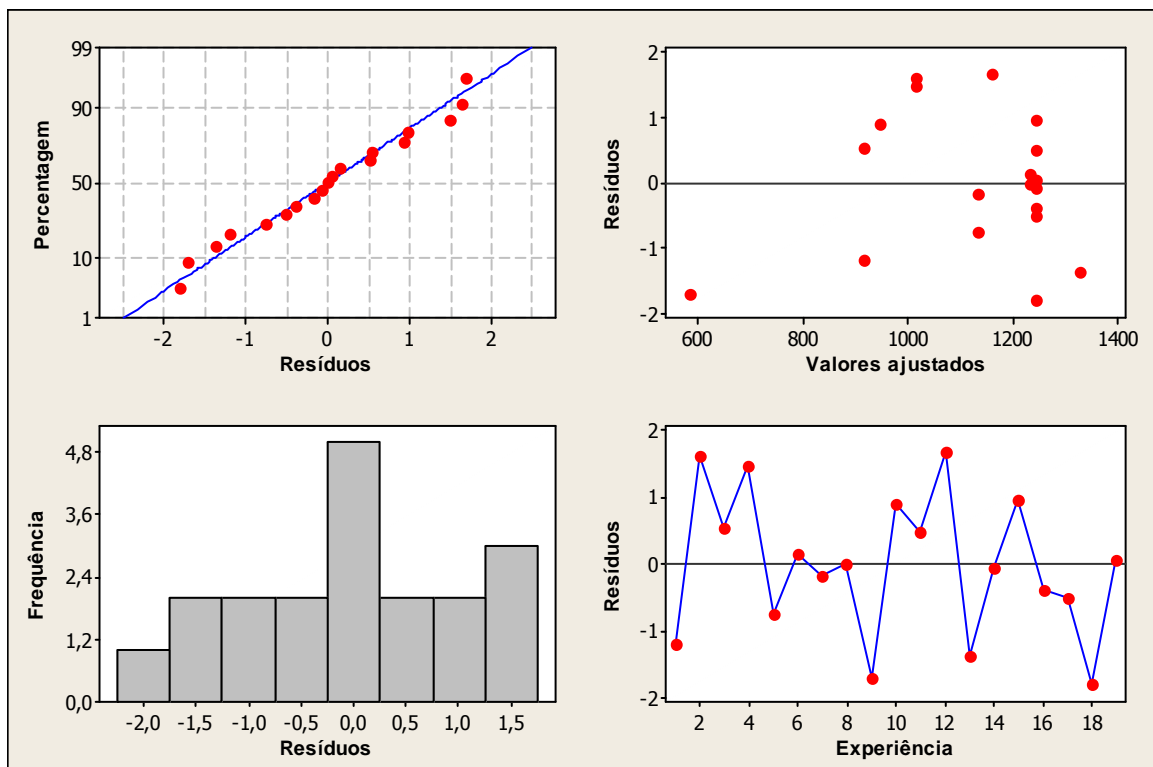


Figura C.2 - Gráficos de resíduos para o método DPPH de folhas verdes de Eucalyptus globulus.

iii) Poder de redução férrica

Tabela C.3 - ANOVA das respostas para o poder de redução férrica de folhas verdes de *Eucalyptus globulus*.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Soma de quadrados ajustada	Média quadrática ajustada	F	P
Regressão	3	308403	308403	102801	89,66	0,000
Linear	2	105511	105511	52756	46,01	0,000
A	1	58206	58206	58206	50,76	0,000
C	1	47305	47305	47305	41,26	0,000
AxA	1	202892	202892	202892	176,95	0,000
Resíduos	15	17199	17199	1147		
Falta de ajuste (LOF)	5	6613	6613	1323	1,25	0,356
Erro puro	10	10586	10586	1059		
Total	18	325602				
R_a^2	0,9366					

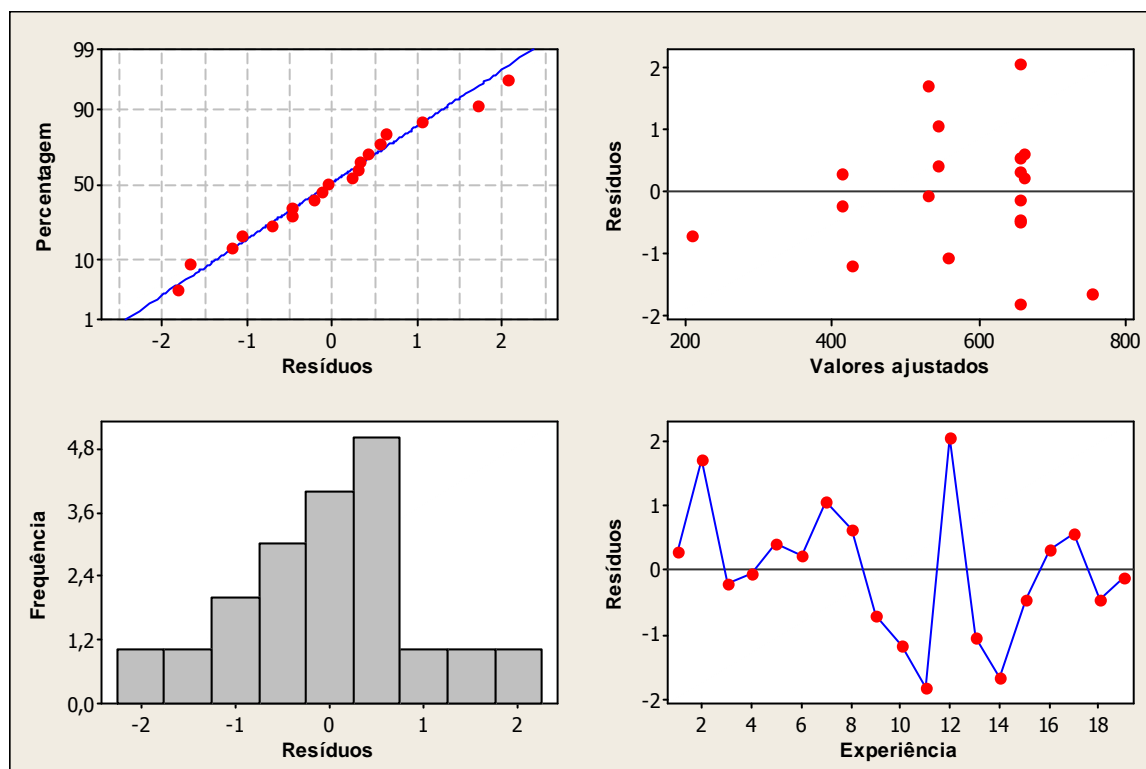


Figura C.3 - Gráficos de resíduos para o método FRAP de folhas verdes de *Eucalyptus globulus*.

2. Agulhas verdes de *Pinus pinaster*.

i) Teor fenólico total

Tabela C.4 - ANOVA das respostas para o teor fenólico total de agulhas verdes de *Pinus pinaster*.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Soma de quadrados ajustada	Média quadrática ajustada	F	P
Regressão	3	92000	92000	30667	6,94	0,000
Linear	2	23306	23306	11653	10,24	0,000
A	1	6960	6960	6960	6,11	0,025
C	1	16346	16346	16346	14,36	0,002
AxA	1	68695	68695	68695	60,34	0,000
Resíduos	16	18125	18125	1138		
Falta de ajuste (LOF)	5	5385	5385	1077	0,92	0,501
Erro puro	11	12829	12829	1166		
Total	19	110215				
R_a^2	0,8037					

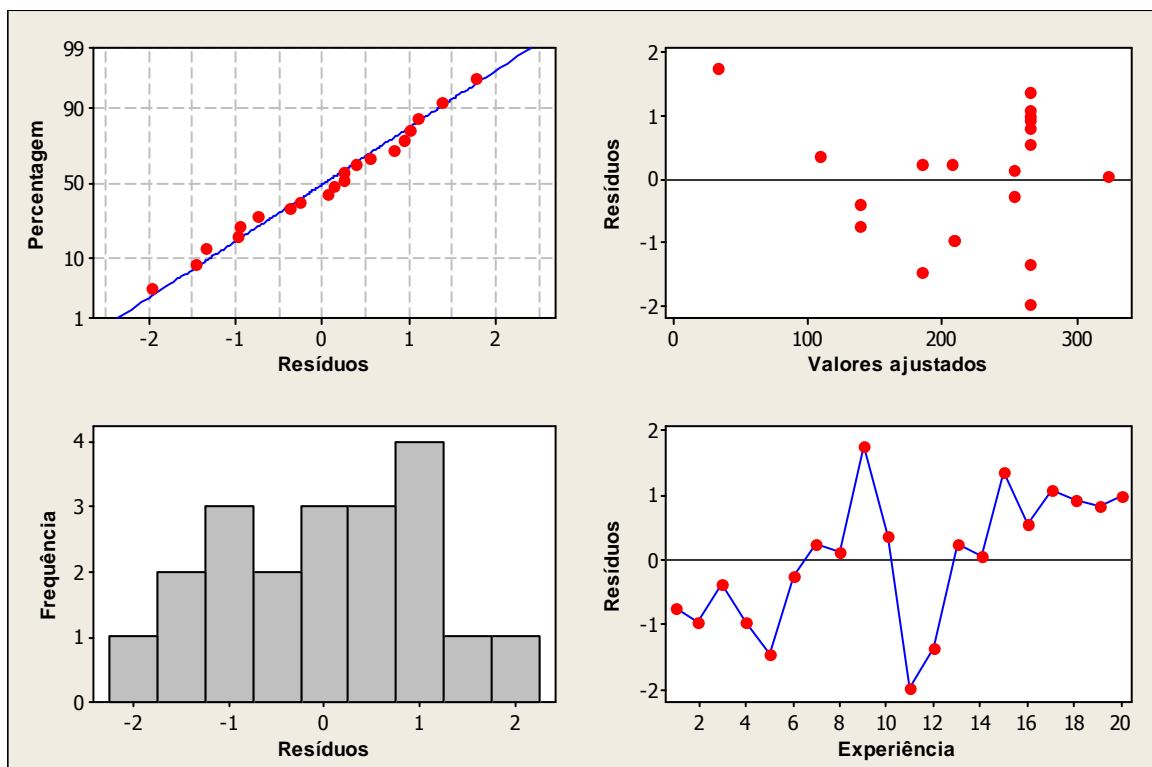


Figura C.4 - Gráficos de resíduos para o método TPC de agulhas verdes de *Pinus pinaster*.

ii) Atividade anti-radicalar

Tabela C.5 - ANOVA das respostas para a atividade anti-radicalar de agulhas verdes de *Pinus pinaster*.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Soma de quadrados ajustada	Média quadrática ajustada	F	P
Regressão	3	86060	86060	28687	17,37	0,000
Linear	2	34606	34606	17303	10,48	0,001
A	1	18797	18797	18797	11,38	0,004
C	1	15809	15809	15809	9,57	0,007
AxA	1	51455	51455	51455	31,16	0,000
Resíduos	16	26417	26417	1651		
Falta de ajuste (LOF)	5	830	8830	1766	1,10	0,412
Erro puro	11	17588	17588	1599		
Total	19	112478				
R_a^2	0,7211					

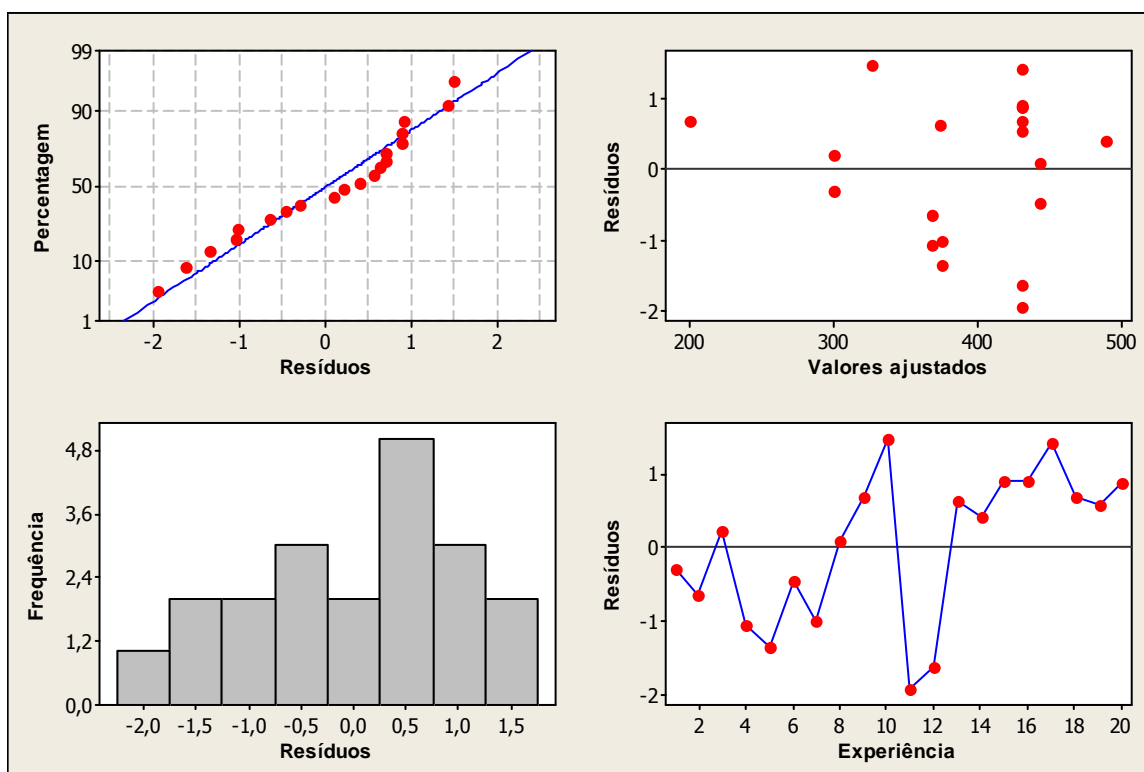


Figura C.5 - Gráficos de resíduos para o método DPPH de agulhas verdes de *Pinus pinaster*.

iii) Poder de redução férrica

Tabela C.6 - ANOVA das respostas para o poder de redução férrica de agulhas verdes de *Pinus pinaster*.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Soma de quadrados ajustada	Média quadrática ajustada	F	P
Regressão	3	231719	231719	77240	23,00	0,000
Linear	2	63546	63546	31773	9,46	0,002
A	1	25873	25873	25873	7,71	0,013
C	1	37673	37673	37673	11,22	0,004
AxA	1	168173	168173	168173	50,08	0,000
Resíduos	16	53725	53725	3358		
Falta de ajuste (LOF)	5	15752	15752	3150	0,91	0,507
Erro puro	11	37974	37974	3452		
Total	19	285444				
R_a^2	0,7765					

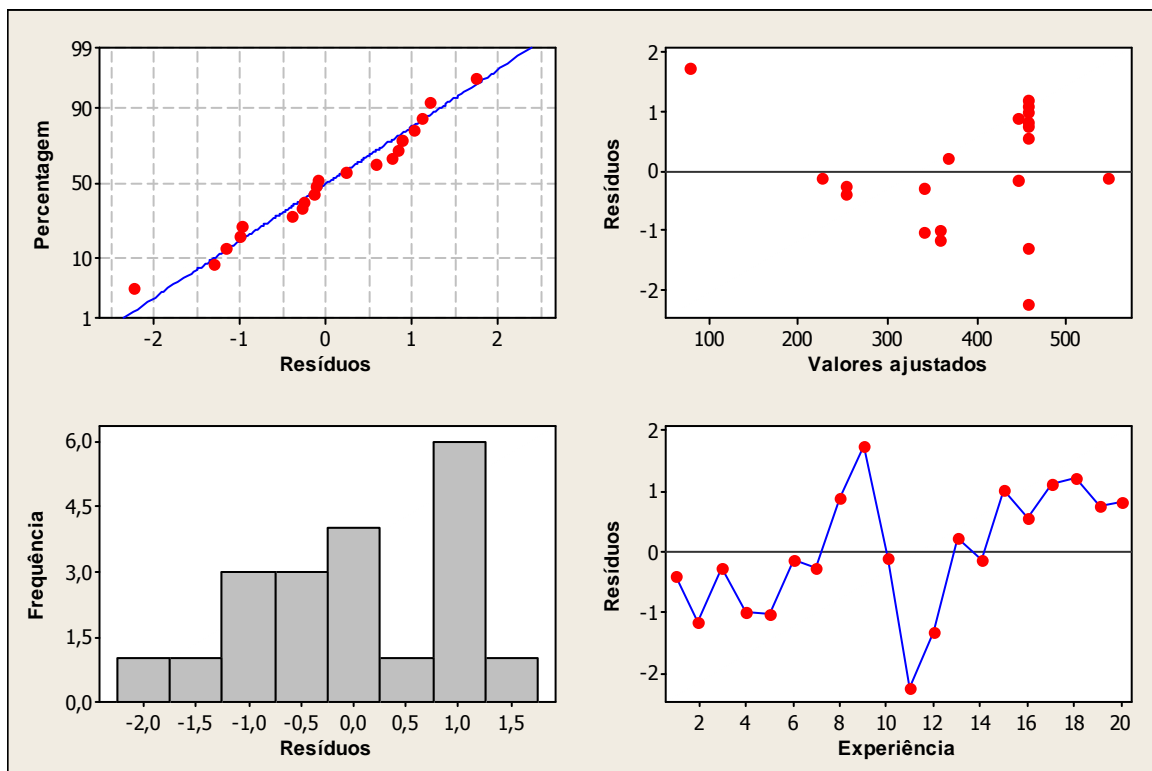


Figura C.6 - Gráficos de resíduos para o método FRAP de agulhas verdes de *Pinus pinaster*.

3. Folhas secas de *Eucalyptus globulus*

i) Teor fenólico total

Tabela C.7 - ANOVA das respostas para o teor fenólico total de folhas secas de *Eucalyptus globulus*.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Soma de quadrados ajustada	Média quadrática ajustada	F	P
Regressão	2	277134	277134	138567	30,39	0,000
Linear	1	19889	68326	68326	14,98	0,001
A	1	19889	68326	68326	14,98	0,000
AxA	1	107245	107245	107245	23,52	0,000
Resíduos	16	72962	72962	4560		
Falta de ajuste (LOF)	1	343	343	343	0,07	0,794
Erro puro	15	72619	72169	4841		
Total	18	350096				
R_a^2	0,7655					

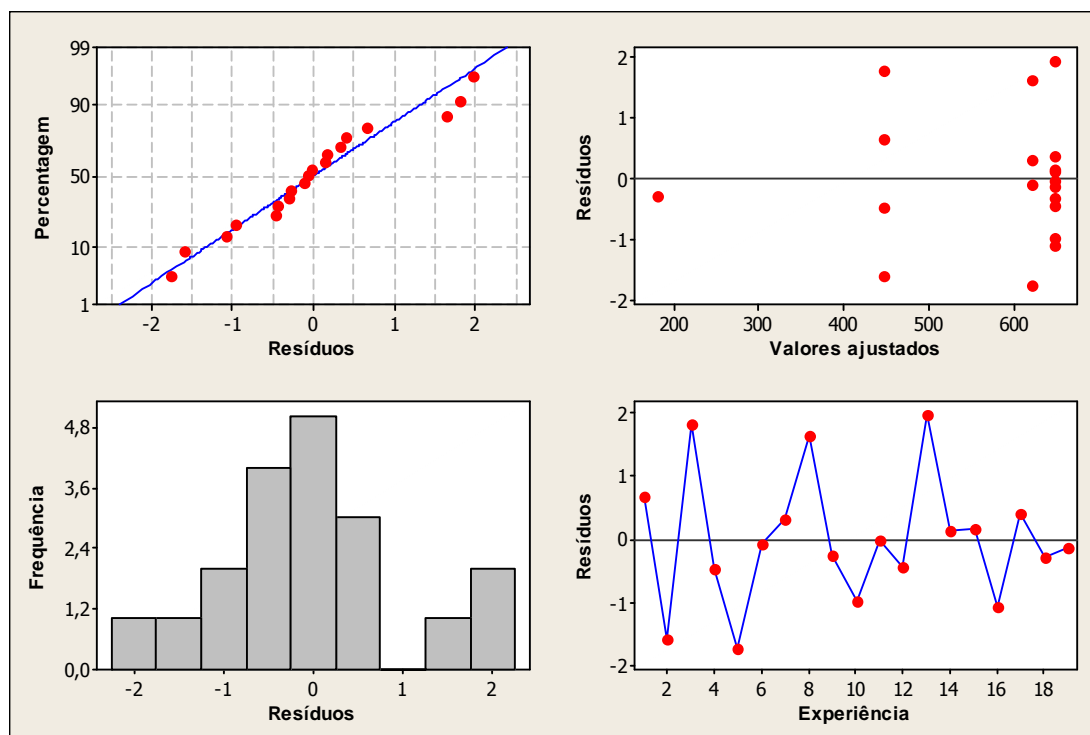


Figura C.7 - Gráficos de resíduos para o método TPC de folhas secas de *Eucalyptus globulus*.

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE ANTIOXIDANTES DE SUBPRODUTOS FLORESTAIS PELO MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

ii) Atividade anti-radicalar

Processo de otimização com todos os fatores:

Tabela C.8 - ANOVA-A das respostas para a atividade anti-radicalar de folhas secas de Eucalyptus globulus.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Soma de quadrados ajustada	Média quadrática ajustada	F	P
Regressão	9	86852	86852	9650	2,42	0,093
A	1	36394	36394	36394	9,11	0,013
B	1	255	255	255	0,06	0,805
C	1	60	60	60	0,01	0,905
AxA		45792	41690	41690	10,44	0,009
BxB	1	1446	1790	1790	0,45	0,518
CxC	1	2022	2022	2022	0,51	0,493
AxB	1	615	615	615	0,15	0,703
AxC	1	0,1	0,1	0,1	0,00	0,996
BxC	1	268	268	268	0,07	0,801
Resíduos	10	39930	39930	3992		
Faltade ajuste (LOF)	5	39925	39925	7985	9412	0,000
Erro puro	5	4	4	0,8		
Total	19	126781				
R^a	0,4016					

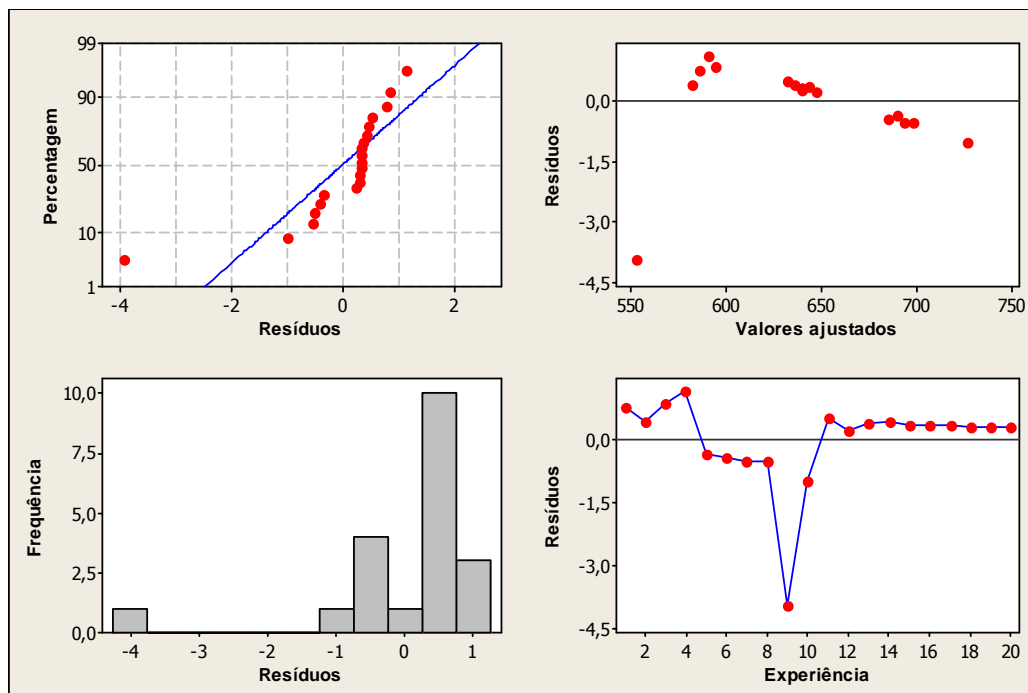


Figura C.8 - Gráficos de resíduos da primeira etapa de otimização para o método DPPH de folhas secas de Eucalyptus globulus.

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE ANTIOXIDANTES DE SUBPRODUTOS FLORESTAIS
PELO MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

Processo de otimização com fatores significantes:

Tabela C.9 - ANOVA-B das respostas para a atividade anti-radicalar de folhas secas de Eucalyptus globulus.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Soma de quadrados ajustada	Média quadrática ajustada	F	P
Regressão	2	82186	82186	4093	15,66	0,000
A	1	36394	36394	35394	13,87	0,002
AxA	1	45792	45792	45792	17,46	0,001
Resíduos	17	44595	44595	2623		
Ausência de ajuste (LOF)	2	42849	42849	21425	184,09	0,000
Erro puro	15	1746	1746	116,4		
Total	19	126781				
R_a^2	0,6069					

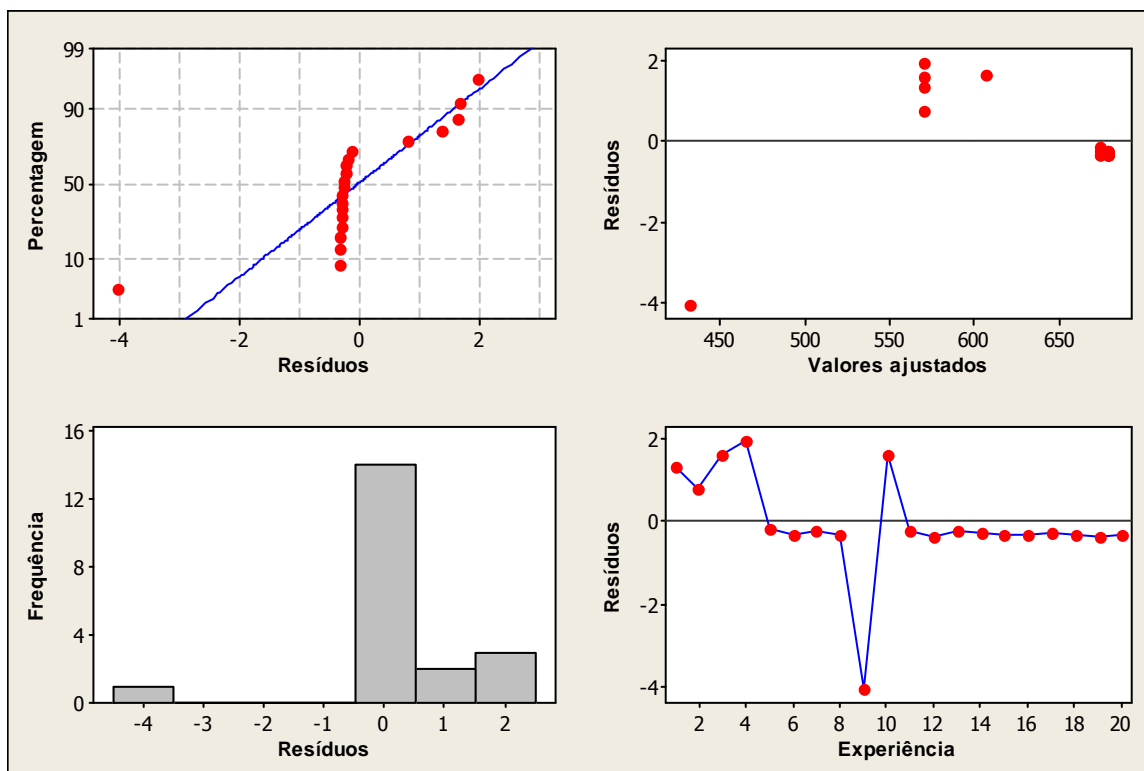


Figura C.9 - Gráficos de resíduos da segunda etapa de otimização para o método DPPH de folhas secas de Eucalyptus globulus.

iii) Poder de redução férrica

Tabela C.10 - ANOVA das respostas para o poder de redução férrica de folhas secas de *Eucalyptus globulus*

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Soma de quadrados ajustada	Média quadrática ajustada	F	P
Regressão	2	210639	210639	105319	41,63	0,000
A	1	157642	157642	157642	62,31	0,000
AxA	1	52997	52997	52997	20,95	0,000
Resíduos	17	43012	43012	2530		
Falta de ajuste (LOF)	2	21642	21642	109821	7,60	0,005
Erro puro	15	21370	21370	1425		
Total	19	253651				
R_a^2	0,8105					

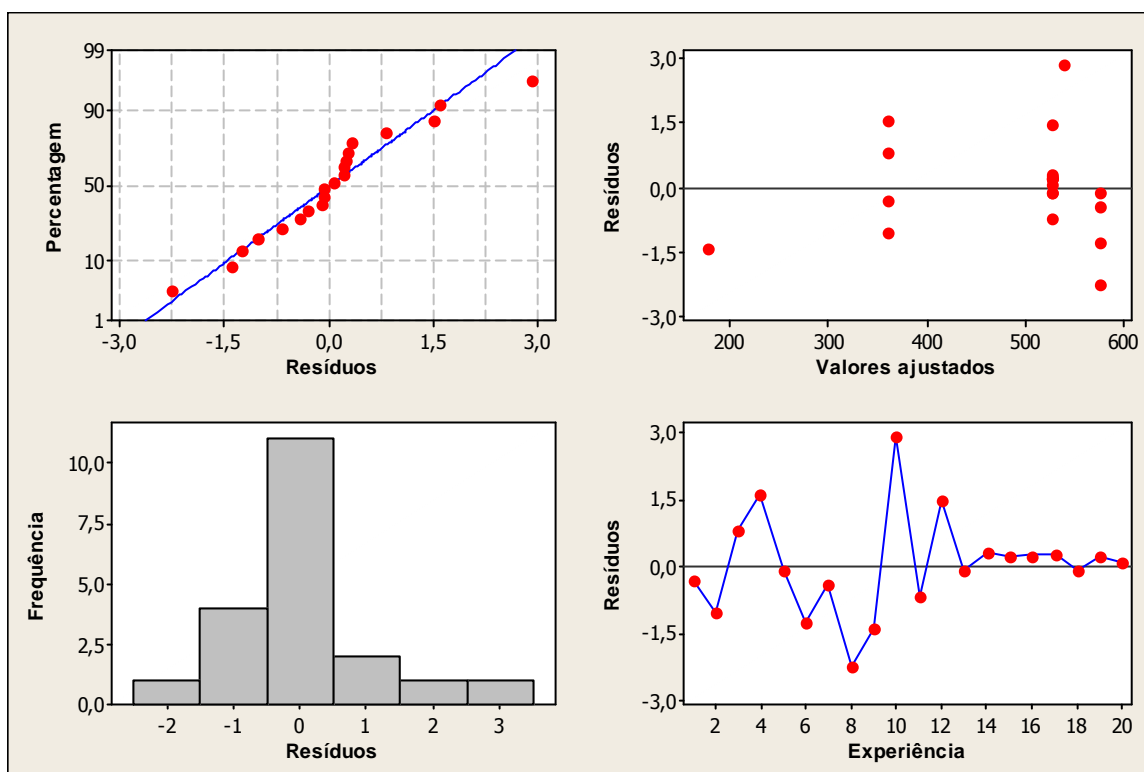


Figura C.10 - Gráficos de resíduos para o método FRAP de folhas secas de *Eucalyptus globulus*.

4. Agulhas secas de *Pinus pinaster*

i) Teor fenólico total

Tabela C.11 - ANOVA das respostas para o teor fenólico total de agulhas secas de *Pinus pinaster*.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Soma de quadrados ajustada	Média quadrática ajustada	F	P
Regressão	3	79028	79028	26343	174,96	0,000
A	1	388	130	130	0,86	0,370
C	1	746	1105	1105	7,34	0,018
AxA	1	77894	77894	77894	517	0,000
Resíduos	13	1957	1957	151		
Faltade ajuste (LOF)	5	619	619	124	0,74	0,615
Erro puro	8	1338	1338	167		
Total	16	80986				
R_a^2	0,9703%					

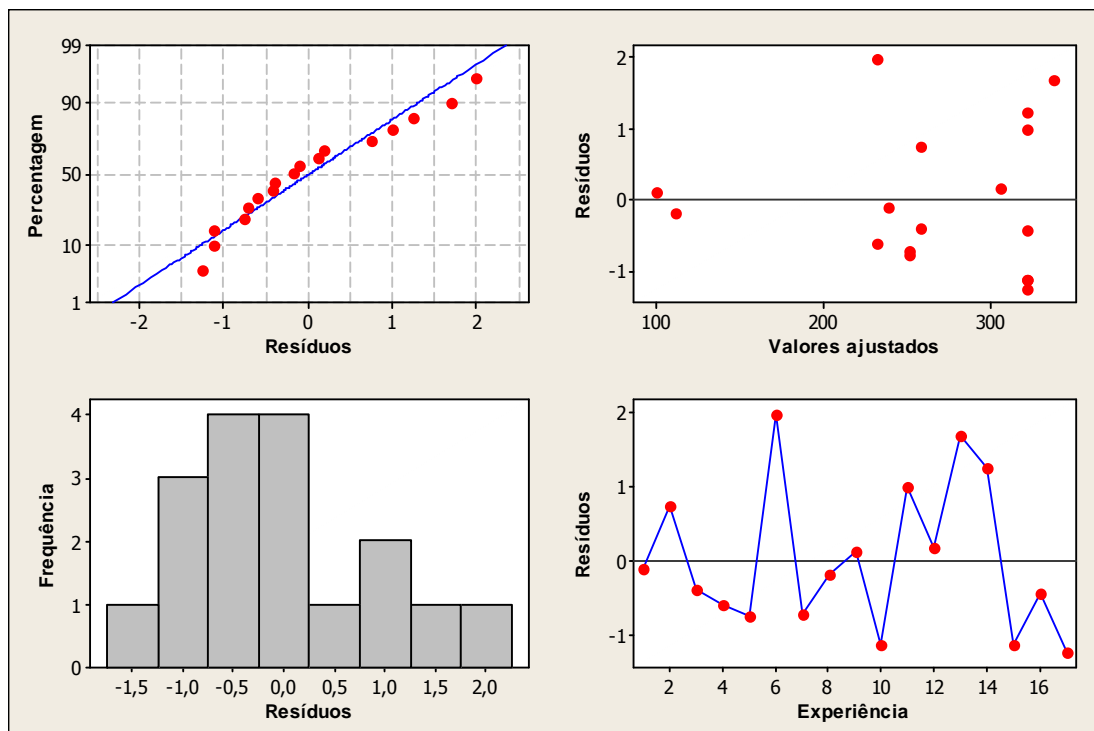


Figura C.11 - Gráficos de resíduos para o método TPC de agulhas secas de *Pinus pinaster*

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE ANTIOXIDANTES DE SUBPRODUTOS FLORESTAIS PELO MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

ii) Atividade anti-radicalar

Tabela C.12 - ANOVA-A das respostas para a atividade anti-radicalar de agulhas secas de Pinus pinaster.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Soma de quadrados ajustada	Média quadrática ajustada	F	P
Regressão	9	98	98	11	5,97	0,010
A	1	49	49	49	26,63	0,001
B	1	0,084	0,084	0,084	0,05	0,835
C	1	10	10	10	5,25	0,051
AxA	1	3	0,6	0,6	0,32	0,586
BxB	1	1	2	2	1,13	0,318
CxC	1	3	3	3	1,48	0,258
AxB	1	5	5	5	2,46	0,156
AxC	1	28	28	28	15,50	0,004
BxC	1	0,5	0,5	0,5	0,29	0,605
Resíduos	8	15	15	2		
Falta de ajuste (LOF)	3	13	13	4	10,67	0,013
Erro puro	5	2	2	0,4		
Total	17	113				
R_a²	0,7247					

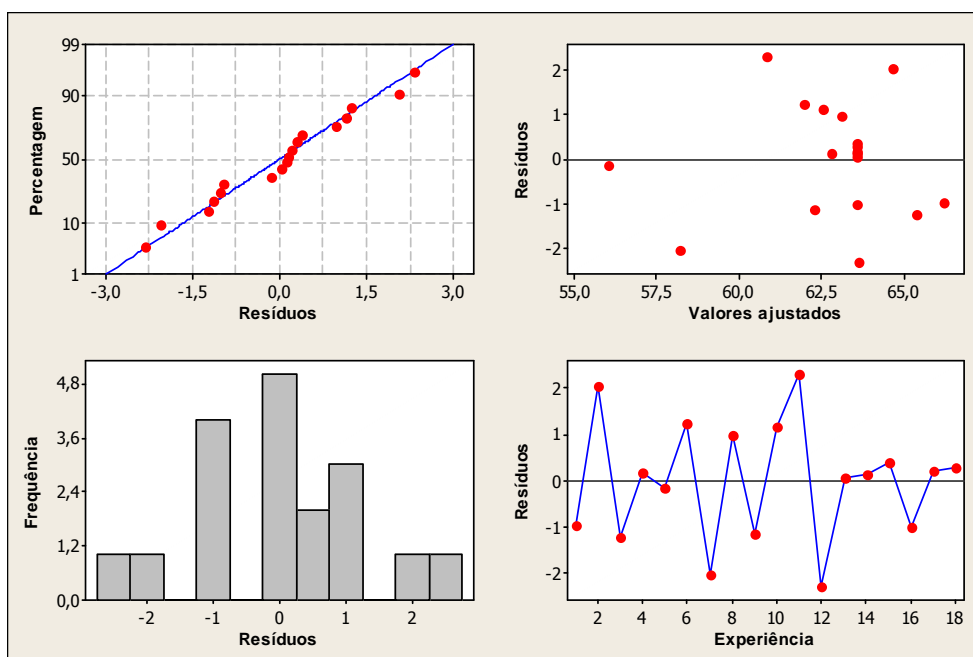


Figura C.12 - Gráficos de resíduos para o método DPPH de agulhas secas de Pinus pinaster.

**OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE ANTIOXIDANTES DE SUBPRODUTOS FLORESTAIS
PELO MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

iii) Poder de redução férrica

Tabela C.13 - ANOVA das respostas para o poder de redução férrica de agulhas secas de Pinus pinaster.

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Soma de quadrados ajustada	Média quadrática ajustada	F	P
Regressão	3	22486	22486	7495	81,10	0,000
A	1	470	470	470	5,08	0,039
B	1	488	488	488	5,28	0,035
AxA	1	21528	21528	21528	232,93	0,000
Resíduos	16	1479	1479	92,4		
Falta de ajuste (LOF)	5	177	177	35,4	0,30	0,904
Erro puro	11	1302	1302	118		
Total	19	23965				
R_a^2	0,9267					

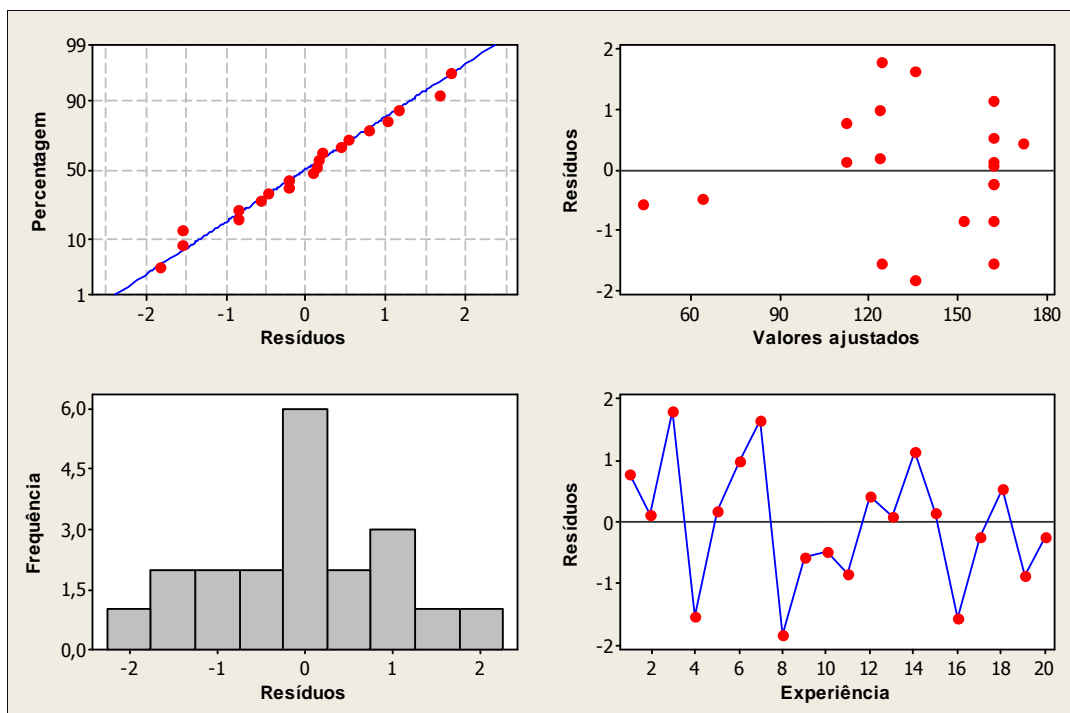


Figura C.13 - Gráficos de resíduos para o método FRAP de agulhas secas de Pinus pinaster.