



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE
ENGENHARIA DE LISBOA

Extratos aquosos de folhas e talos de “*Beta vulgaris* L.”

Isolamento de compostos bioativos utilizando a tecnologia de membranas

Márcia Patricia de Melo Rodrigues

(Licenciado em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
Química e Biológica

Orientadores:

Professora Doutora Rita Pacheco

Professor Doutor Luís Miguel Minhalma

Júri:

Presidente: Doutora Isabel João

Vogal: Doutora Ana Sofia Figueiredo

Vogal: Doutora Rita Pacheco

Lisboa

Novembro 2019

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, Pr.^a Dr.^a Rita Pacheco, pela excelente orientação, disponibilidade, paciência e sugestões ao longo de todo o trabalho. Permitiu identificar e clarificar o caminho a adotar. Saliento igualmente a revisão minuciosa desta dissertação. Por último destaco o apoio no decorrer do trabalho experimental, fundamental na conclusão do mesmo.

Ao Pr. Dr. Luís Miguel Minhalma, pela orientação, transmissão de conhecimento e disponibilidade que me foi prestada ao longo da realização desta dissertação, bem como da revisão meticulosa da mesma.

Ao Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL), a todos os seus docentes e funcionários, quero agradecer pelo conhecimento transmitido ao longo deste período académico. Em particular, ao João Costa do PharmaLab ISEL pela ajuda na realização da análise das frações dos permeados por HPLC-DAD.

À Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), em especial, um sincero agradecimento à Pr.^a Dr.^a Maria Luísa Serralheiro por me ter acolhido no seu grupo de trabalho e ter sempre demonstrado disponibilidade em me ajudar no que fosse necessário, nomeadamente pelo apoio científico na parte de espetrometria de massa. À Pr.^a Dr.^a Helena Gaspar pela ajuda na realização da determinação da concentração dos solutos orgânicos no HPLC-IR.

Ao Augustão, por ser o meu porto de abrigo, pela infinita paciência e por todo o conforto e carinho, obrigada.

À minha colega Ana Margarida, pelo apoio incondicional transmitido ao longo de todo o trabalho, pelas conversas de encorajamento nos momentos de desânimo, mas principalmente pela amizade que sempre manifestou.

Aos colegas de laboratório da FCUL, em especial à Laura, Rebeca, Ana Rita, Rita e Bernardo, pela ajuda, simpatia, disponibilidade e pela força que me deram durante este período.

Aos meus colegas da Farmácia Benfiluz, pela compreensão e ajuste dos horários de trabalho, libertando tempo precioso para a parte prática desta dissertação. Um agradecimento especial à Ti Sofia pela amizade e apoio que sempre demonstrou.

A todos os meus amigos, um grande obrigada pela força que sempre me deram para prosseguir os meus sonhos e pela compreensão da minha ausência durante este período.

Por último, e não menos importante, quero expressar um agradecimento especial aos meus familiares, que mesmo de longe, sempre me apoiaram e acreditaram em mim!

Resumo

A beterraba "*Beta vulgaris* L." pertence à família *Chenopodiaceae*, é um legume com elevada atividade antioxidante, capacidade de prevenção de doenças cardiovasculares, nomeadamente no controlo da dislipidemia. Estas características parecem encontrar-se diretamente relacionadas com a elevada quantidade de compostos bioativos (CBs) presentes neste legume. No entanto, apenas é normalmente consumida a raiz da beterraba, embora as suas folhas e talos sejam ricos em CBs, estes são muitas vezes considerados resíduos agrícolas. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de valorização das folhas e talos da beterraba. Neste sentido foram quantificadas as atividades biológicas dos extratos aquosos de folhas de beterraba e talos, identificados e quantificados alguns CBs presentes, nomeadamente compostos fenólicos (CFs), e adicionalmente foi avaliada a capacidade da tecnologia de membrana no isolamento de CBs presentes no extrato.

Neste trabalho foram preparados vários extratos aquosos de folhas de beterraba e talos: Decocção (Bdec), extração assistida pelo enzima pepsina (BDG), extração assistida pelo enzima pancreatina (BDP) e extração assistida pelos enzimas pepsina e pancreatina (BDC), pretendeu-se evitar o uso de solventes orgânicos e simular a ingestão. Os extratos foram caracterizados fazendo as quantificações de fenóis totais (FT) (método Folin-Ciocalteu), proteínas (método Bradford), hidratos de carbono (método Antrona), e analisadas as atividades biológicas, atividade antioxidante (ensaio 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)) e a atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (AChE). O extrato BDP apresentou os melhores resultados com uma concentração de fenóis totais de 0.559 µg GAE/µL, em proteínas de 23.838 mg BSA/mL, em hidratos de carbono 5.427 mg Glucose/mL de extrato, e com as concentrações em FT de 3.8 µg GAE/mL e 20.8 µg GAE/mL revelaram 50 % da atividade antioxidante e atividade inibitória da AChE, respetivamente.

A metodologia aplicada para o estudo do isolamento dos CBs do extrato aquoso com extração assistida pelo enzima pancreatina (BDP) foi a tecnologia de membranas por Ultrafiltração (UF), em modo de recirculação total. Nesta etapa, cinco membranas assimétricas de acetato de celulose foram preparadas através do método de inversão de fase, com um intervalo de limite de exclusão molecular (MWCO) entre 3.8 kDa a 62 kDa. Os ensaios de permeação com o extrato de BDP foram realizados a três pressões transmembranares (PTM) (1, 2 e 3 bar).

As amostras da alimentação e permeados do extrato de BDP das cinco membranas foram caracterizados em termos de FT, proteínas e hidratos de carbono e foram avaliadas as atividades biológicas, atividade antioxidante pelo método DPPH e atividade inibitória da AChE. Verificou-se que os permeados das cinco membranas estudadas à PTM de 3 bar apresentaram maiores quantidades de FT recuperados. O permeado obtido da membrana com MWCO de 4.6 kDa à pressão transmembranar de 3 bar foi o que apresentou atividades biológicas mais elevadas, obtendo-se 50% da atividade antioxidante e atividade inibitória do enzima AChE para uma concentração de 1.8 µg GAE/mL e 25.9 µg GAE/mL de extrato, respetivamente. Na generalidade,

verificou-se que todos os permeados do extrato BDP apresentam melhores atividades antioxidantes que o extrato original.

Os coeficientes de rejeição aparentes (f) para os FT, proteínas e hidratos de carbono foram determinados para todas as membranas e às PTM de 1, 2 e 3 bar, verificou-se que estes parâmetros diminuem com pressão transmembranar. Os coeficientes de rejeição intrínseco (f') diminuem com o aumento do MWCO das membranas preparadas, enquanto o coeficiente de transferência de massa (k) aumenta com a porosidade das membranas. Verificaram-se fenómenos de polarização de concentração/colmatação para as membranas com MWCO de 32 kDa e 62 kDa.

Os extratos preparados e os permeados do extrato BDP foram analisados por cromatografia líquida de elevada performance com detetor de fotodíodos (HPLC-DAD) para se efetuar a quantificação de alguns CFs presentes: derivado do ácido ferúlico, rutina, derivado da vitexina e derivado da isovitexina. Denotou-se que após o processo de UF, a concentração do derivado do ácido ferúlico foi maior nos permeados resultantes das membranas com MWCO de 3.8 kDa e 4.6 kDa e, o derivado da isovitexina apresentou maiores concentrações em todos os permeados, com exceção da membrana com MWCO de 3.8 kDa.

Recorreu-se à cromatografia líquida de fase reversa acoplada a espectrometria de massa (LC-QTOF-MS) para identificação dos compostos presentes no extrato BDP (alimentação) e dos permeados resultantes das cinco membranas estudadas à PTM de 3 bar. Os compostos identificados foram na maioria compostos fenólicos (CFs), tais como: o ácido *p*-cumárico, o ácido ferúlico, rutina e derivados da vitexina (vitexina -2"-O-ramnoside, apigenina 6,8-glucosideo, a *schaftoside* ou *corymboside* e a vitexina-6"-O-malonyl-2"-O-xyloside), também foram identificados ácidos orgânicos, como o ácido málico e ácido cítrico, aminoácidos (fenilalanina e triptofano) e o pigmento betanina.

Ficou ainda demonstrada a segurança na ingestão do extrato BDP e dos seus permeados resultantes das membranas com MWCO com 4.6 kDa e 62 kDa à PTM de 3 bar, uma vez que foi verificado que estes não apresentam citotoxicidade em células Hep-G2 do hepatocarcinoma do fígado humano.

Neste trabalho, verificou-se que o extrato aquoso e os permeados de folhas e talos da beterraba, um resíduo agrícola de alto valor, apresentam potencial para a sua valorização dada a sua composição em compostos bioativos exibindo propriedades antioxidantes relevantes para a saúde. Com a aplicação da tecnologia de membranas foi possível isolar os CBs presentes no extrato BDP, permitindo obter um permeado que demonstrou elevada atividade antioxidante e que, dada a sua segurança, demonstra potencial de aplicação para suplementar dietas ou incorporação em produtos alimentares, tais como massas, sumos ou molhos.

Palavras chave: *Beta vulgaris* L., Extrato aquoso com extração assistida pelo enzima pancreatina (BDP), Tecnologia de Membranas, Ultrafiltração.

Abstract

The beet "*Beta vulgaris L.*", of the *Chenopodiaceae* family, is a vegetable with high antioxidant activity, proven to prevent cardiovascular diseases and control dyslipidaemia. These features were seen to be directly related to the bioactive compounds (CBs) present in this vegetable. However, only the root of beet is typically consumed, and although its leaves and stalks are rich in bioactive compounds, they are often considered agricultural residues. The aim of this study is to evaluate the levels of phenolic compounds (CFs) and antioxidant properties of the aqueous extracts of beet leaves and stalks, and the ability of the membrane technology in isolating this extract.

In this work, to avoid the use of organic solvent and to simulate the intake, several aqueous extracts from beet leaves and stalks were obtained: Decoction (Bdec), aqueous extract with enzymatic extraction with pepsin (BDG), aqueous extract with enzymatic extraction with pancreatin (BDP) and aqueous extract with enzymatic extraction with pepsin and pancreatin (BDC). The extracts were characterized by quantifying its total phenols (Folin-Ciocalteu method), proteins (Bradford method), carbohydrates (Anthrone method), and the biological activities were assayed, namely antioxidant activity (2,2-difenil-1-picrilhidrazil assay(DPPH)) and the inhibitory activity of enzyme acetylcholinesterase (AChE). In the end the BDP extract has presented the best results showing a 0.559 $\mu\text{g GAE}/\mu\text{L}$ of total phenols, in proteins of 23.838 mg BSA/mL, in carbohydrates of 5.427 mg Glucose/mL, and total phenols concentration to obtain 50 % of antioxidant activity and inhibitory activity of enzyme AChE of 3.8 $\mu\text{g GAE}/\text{mL}$ and 20.8 $\mu\text{g GAE}/\text{mL}$ of total phenols, respectively.

Additionally, a separation methodology was developed for the purification of bioactive compounds from BDP extract using membrane technology by ultrafiltration in recirculation mode. In this stage, five asymmetric cellulose acetate membranes were prepared through the phase inversion method covering a wide range of Molecular Weight Cut-Offs (MWCO) between 3.8 kDa and 62 kDa. The permeation experiments with the BDP extract were carried out at three transmembrane pressures (PTM) (1, 2 and 3 bar).

The feed and permeate streams of the BDP extract from the five membranes were characterized and biological activities assayed. It was also found that the permeate of the five membranes obtained at the transmembrane pressure (PTM) of 3 bar presented a higher quantification of total phenols. But the permeate obtained from the membrane with MWCO of 4,8 kDa and the PTM of 3 bar presents higher ability to recover bioactive compounds that the total phenols concentration to obtain 50 % of antioxidant activity and inhibitory activity of enzyme AChE of 1.8 $\mu\text{g GAE}/\text{mL}$ and 25.9 $\mu\text{g GAE}/\text{mL}$ of total phenols, respectively. The permeates of the BDP extract present higher antioxidant activities than the original extract.

The apparent rejection coefficients (f) for FT, proteins and carbohydrates decrease with the increase of the PTM, but the intrinsic rejection coefficients (f') decrease with the increase in MWCO of the membranes, while the coefficient of mass transfer (k) increase with the porosity of

membranes. There phenomena of fouling and concentration of polarization of membranes were detected in the membrane with MWCO of 32 kDa and 62 kDa.

With high performance liquid chromatography with photodyte detector (HPLC-DAD) the following CFs were quantified: derived from ferulic acid, rutin, vitexin derivative and isovitexin derivative. It was observed that the concentration of ferulic acid derivative is higher in the permeates resulting from membranes with MWCO of 3.8 kDa and 4.6 kDa and the derivative of isovitexin has higher concentrations in all permeates, except for the membrane with MWCO of 3.8 kDa.

In addition, the liquid reverse phase chromatography coupled to mass spectrometry (LC-QTOF-MS) was used to identify the compounds present in the BDP extract (feed) and the permeates resulting from the five membranes at PTM of 3 bar. The compounds identified were mostly phenolic compounds (CFs), such as: *p*-cumaric acid, ferulic acid, rutin and vitexin derivatives (vitexin -2"-O-ramnoside, apigenin 6,8-glucoside, *shaftoside* or *corymboside* and vitexin-6"-O-malonyl-2"-O-xyloside), it was also identified organic acids (malic acid and citric acid), amino acids (phenylalanine and tryptophan) and pigment betaine.

The safety of ingestion of BDP extract and permeates resulting of the membranes with MWCO of 4.8 kDa and 62 kDa at PTM of 3 bar was also been demonstrated, as they do not present cytotoxicity in Hep-G2 cells.

In this work, a high value agriculture residue, such as beet leaves and stalks, was seen to have advantages to be incorporated in diet, displaying valuable health properties. When the aqueous extract is processed using membrane technology, many active bioactive compounds can be obtained. which ultimately can be used to supplement diets or incorporate food products, such as pasta, juices or sauces.

Keywords: "*Beta vulgaris L.*", Aqueous extract with enzymatic extraction with pancreatin (BDP), membrane technology, ultrafiltration.

Lista de abreviaturas

Abs	Absorvência
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChI	Iodeto de acetiltiocolina
BCC	Extrato aquoso enzimático do controlo de pepsina e pancreatina das folhas de talos da beterraba
BCG	Extrato aquoso enzimático do controlo de pepsina das folhas de talos da beterraba
BCP	Extrato aquoso enzimático do controlo de pancreatina das folhas de talos da beterraba
BDC	Extrato aquoso enzimático com pepsina e pancreatina das folhas de talos da beterraba
Bdec	Decocção das folhas de talos da beterraba
BDG	Extrato aquoso enzimático com pepsina das folhas de talos da beterraba
BDP	Extrato aquoso enzimático com pancreatina das folhas de talos da beterraba
CBs	Compostos bioativos
CFs	Compostos fenólicos
DEX	Dextrano
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTNB	5-5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico), do inglês <i>5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)</i>
EAS	Extração Acelerada por Solvente
ECEP	Extração assistida por Campo Elétrico Pulsado
ESC	Extração Supercrítica
EAE	Extração Assistida por Enzimas
EXS	Extrato Seco
f	Coefficiente de rejeição aparente
f'	Coefficiente de rejeição intrínseco
FCR	Reagente de Folin-Ciocalteu
FT	Fenóis Totais
GAE	Equivalentes de ácido gálico, do inglês <i>gallic acid equivalents</i>
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de elevada performance com detetor de fotodíodos, do inglês <i>high performance liquid chromatography with diode array detector</i>
IC50	Concentração de amostra que representa 50% da atividade
Jp	Fluxo volumétrico
k	Coefficiente de transferência de massa
LC-QTOF-MS²	Cromatografia líquida acoplada com espetrometria de massa QTOF
Lp	Permeabilidade Hidráulica
MAE	Extração Assistida por Micro-Ondas
MF	Microfiltração
MWCO	Limite de Exclusão Molecular
NF	Nanofiltração
OI	Osmose Inversa
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAL	Enzima fenilalanina amoníaco liase

PCA	Análise dos principais componentes
PEG	Polietilenoglicol
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SC	Controlo da solução de pepsina e pancreatina
SG	Controlo da solução com pepsina
SOD	Enzimas Superóxido Dismutases
SP	Controlo de solução de pancreatina
PTM	Pressão transmembranar
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano, do inglês <i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>
UAE	Extração Assistida por Ultrasons
UF	Ultrafiltração
UV-Vis	Espectroscopia de ultravioleta-visível

Índice

Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iv
Abstract.....	vi
Lista de abreviaturas.....	viii
Índice de Figuras.....	xiv
Índice de Tabelas.....	xx
Capítulo 1: Enquadramento Teórico.....	1
1.1. Enquadramento.....	3
1.2. Compostos bioativos (CBs) presentes nas plantas.....	5
1.2.1. Compostos fenólicos (CFs).....	5
1.2.1.1. Ácidos Fenólicos.....	7
1.2.1.2. Flavonoides.....	8
1.2.1.3. Outros compostos fenólicos (CFs).....	11
1.2.1.4. Taninos.....	12
1.2.2. Betalaínas.....	12
1.3. Propriedades biológicas dos compostos bioativos (CBs).....	13
1.3.1. Potencial antioxidante.....	13
1.3.2. Potencial de inibição do enzima acetilcolinesterase (AChE).....	15
1.3.3. Potencial citotóxico em culturas de células humanas.....	16
1.4. Métodos de extração dos compostos bioativos (CBs) de plantas.....	16
1.4.1. Processamento da matéria-prima de origem vegetal.....	17
1.4.1.1. Plantas frescas vs secas.....	17
1.4.1.2. Plantas trituradas vs pulverizadas.....	17
1.4.1.3. Secagem das amostras de plantas: ao ar, no micro-ondas, no forno e liofilizadas.....	17
1.4.2. Métodos de extração convencionais em plantas.....	18
1.4.2.1. Maceração, infusão, percolação e decocção.....	18
1.4.2.2. Extração de Soxhlet ou extração contínua quente.....	19
1.4.3. Métodos de extração inovadores em plantas.....	19
1.4.3.1. Extração assistida por ultrassons (UAE).....	20
1.4.3.2. Extração assistida por micro-ondas (MAE).....	20
1.4.3.3. Extração acelerada de solvente (ACE).....	20
1.4.3.4. Extração com fluidos supercríticos (SFE).....	21
1.4.3.5. Extração assistida por enzima (EAE).....	21
1.4.4. Processos de separação e purificação de compostos bioativos (CBs) a partir de extratos de plantas.....	21
1.5. Processos de separação com membranas.....	23
1.5.1. Classificação das membranas.....	24
1.5.1.1. Método de Inversão de Fases.....	26
1.5.1.2. Modo de Operação.....	26
1.5.2. Caracterização das Membranas.....	27
1.5.2.1. Permeabilidade hidráulica (Lp).....	28

1.5.2.2.	Coeficiente de rejeição aparente (f).....	28
1.5.2.3.	Limite de exclusão molecular (MWCO).....	29
1.5.2.4.	Coeficiente de rejeição intrínseco (f') e coeficiente de transferência de massa (k)	29
1.5.3.	Problemática da tecnologia de membranas.....	31
1.5.4.	Aplicação da tecnologia de membranas na separação e purificação de compostos bioativos (CBs).....	31
1.6.	Beterraba	32
1.6.1.	Origem e distribuição	33
1.6.2.	Morfologia da planta	33
1.6.3.	Compostos bioativos (CBs) na beterraba	34
1.6.4.	Benefícios para a saúde.....	35
1.7.	Objetivos e Etapas	35
Capítulo 2: Materiais e Métodos		37
2.1.	Materiais	39
2.1.1.	Reagentes	39
2.1.2.	Equipamentos.....	40
2.2.	Métodos	41
2.2.1.	Preparação de extratos aquosos das folhas e talos de Beterraba (<i>Beta vulgaris L.</i>).....	41
2.2.2.	Análise e identificação dos compostos bioativos (CBs) dos extratos das folhas e talos de beterraba (<i>Beta vulgaris L.</i>).....	43
2.2.2.1.	Condições analíticas do HPLC-DAD.....	43
2.2.2.2.	Condições analíticas do LC-QTOF-MS	44
2.2.3.	Quantificação dos compostos bioativos (CBs) dos extratos das folhas e talos de beterraba (<i>Beta vulgaris L.</i>).....	45
2.2.3.1.	Quantificação dos fenóis totais (FT)	45
2.2.3.2.	Quantificação dos Hidratos de Carbono.....	46
2.2.3.3.	Quantificação de Proteínas	46
2.2.4.	Determinação da atividade antioxidante dos extratos das folhas e talos de beterraba (<i>Beta vulgaris L.</i>) - Capacidade de redução do radical DPPH	47
2.2.5.	Determinação da atividade enzimática dos extratos das folhas e talos de beterraba (<i>Beta vulgaris L.</i>).....	48
2.2.5.1.	Inibição da acetilcolinesterase (AChE).....	48
2.2.6.	Cultura de Linha Celular Cancerígena Humana.....	49
2.2.6.1.	Avaliação do Potencial Citotóxico	49
2.2.7.	Tecnologia de Membranas.....	50
2.2.7.1.	Preparação das Membranas	50
2.2.7.2.	Caraterização das membranas.....	51
2.2.7.3.	Permeação do extrato aquoso de folhas e talos de beterraba.....	52
2.3.	Análise estatística.....	53
Capítulo 3: Resultados e Discussão		55
3.1.	Caraterização dos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba	58
3.1.1.	Doseamento dos compostos bioativos (CBs) presentes nos extratos aquosos	58

3.1.2.	Determinação da atividade antioxidante – Capacidade de redução do radical DPPH	60
3.1.3.	Determinação da atividade inibitória do enzima Acetilcolinesterase (AChE).....	62
3.1.4.	Análise e identificação dos compostos	63
3.1.4.1.	Cromatografia líquida de elevada performance HPLC – DAD	63
3.1.5.	Identificação do extrato aquoso de folhas e talos da beterraba com maior bioatividade, aplicando a análise de componentes principais (PCA)	73
3.2.	Separação e purificação do extrato BDP através da tecnologia de membranas.....	75
3.2.1.	Caraterização das membranas	75
3.2.1.1.	Determinação da permeabilidade hidráulica (Lp)	76
3.2.1.2.	Determinação do limite de exclusão molecular (MWCO).....	77
3.2.2.	Ensaio de permeação do extrato BDP	78
3.3.	Caraterização das frações dos permeados do extrato BDP.....	79
3.3.1.	Análise e Identificação dos compostos na alimentação e nos permeados obtidos por tecnologia de membranas	79
3.3.1.1.	Cromatografia líquida de elevada performance HPLC – DAD	79
3.3.2.	Doseamento dos compostos bioativos (CBs) na alimentação e nos permeados obtidos por tecnologia de membranas	85
3.3.3.	Determinação da atividade antioxidante – Capacidade de redução do radical DPPH	87
3.3.4.	Determinação da atividade inibitória do enzima acetilcolinesterase (AChE)	88
3.3.5.	Identificação da fração dos permeados com maior bioatividade, aplicando a análise de componentes principais (PCA)	90
3.3.6.	Análise dos compostos identificados por HPLC-DAD permeados á PTM 3 bar e da alimentação	96
3.3.7.	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC–QTOF–MS)	98
3.3.8.	Cultura de linha celular cancerígena humana – avaliação do potencial citotóxico das frações dos permeados (AC22_3 e AC35_3) e da alimentação	107
3.4.	Determinação dos parâmetros para caraterização das membranas	108
3.4.1.	Coeficientes de rejeição aparentes (f) aos FT, aos hidratos de carbono e às proteínas	108
3.4.2.	Coeficiente de refeição intrínseco (f') e coeficiente de transferência de massa (k)	109
Capítulo 4:	Considerações Finais.....	115
Capítulo 5:	Perspetivas Futuras	121
Capítulo 6:	Referências Bibliográficas	125
Capítulo 7:	Anexos.....	I
Anexo 1.	Quantificação dos CBs presentes nas folhas e talos da beterraba (<i>Beta vulgaris</i> L.) ..III	
Anexo 1.1.	Reta de calibração dos FT	III
Anexo 1.2.	Reta de calibração dos hidratos de carbono	III
Anexo 1.3.	Reta de calibração das proteínas.....	III
Anexo 2.	Cromatografia líquida de elevada performance (HPLC-DAD) dos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba	IV
Anexo 2.1.	Cromatogramas dos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba e da solução de pepsina (SG), solução de pancreatina (SP) e solução de pepsina e pancreatina (SC)	IV
Anexo 2.2.	UV-Vis dos compostos maioritários presentes nos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba.	V

Anexo 2.3. Cromatogramas dos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba e dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico	VIII
Anexo 3. Valores registados experimentalmente e determinação do fluxo de permeação a 25°C (Jp)	X
Anexo 4. Determinação do limite de exclusão molecular (MWCO).....	XI
Anexo 4.1. Retas de calibração dos solutos orgânicos	XI
Anexo 4.2. Valores experimentais para a determinação do limite de exclusão molecular (MWCO).....	XIII
Anexo 4.3. Valores experimentais relativos aos coeficientes de rejeição aparente aos solutos orgânicos obtidos relativos às áreas dos picos das alimentações e permeados e as suas respetivas concentrações.	XIII
Anexo 4.4. Determinação do limite de exclusão molecular (MWCO)	XIV
Anexo 5. Dados experimentais dos ensaios da permeação do extrato BDP.....	XVI
Anexo 6. Cromatografia líquida de elevada performance (HPLC-DAD) das frações resultantes das permeações AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação	XVII
Anexo 6.1. Cromatogramas das frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.....	XVII
Anexo 6.2. UV-Vis dos compostos identificados nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação	XVIII
Anexo 6.3. Cromatogramas da amostra da alimentação (extrato BDP) e dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico	XXIII
Anexo 7. Quantificação dos FT, proteínas e hidratos de carbono presentes nas frações das permeações das membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 e das amostras da alimentação	XXIV
Anexo 8. Atividades antioxidantes através do método de DPPH para as frações do permeados das membranas e das amostras da alimentação	XXV
Anexo 9. Quantificação da atividade inibitória enzimática da acetilcolinesterase (AChE) nas frações dos permeados para a PTM de 3 bar e das amostras da alimentação.....	XXVII
Anexo 10. Determinação da hepatocitotoxicidade celular em células Hep-G2.....	XXVIII
Anexo 11. Cromatogramas de LC-MS ⁿ nos modos de ionização negativo e positivos das frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 à PTM de 3 bar e da alimentação, AC20_A (extrato BDP).....	XXIX
Anexo 12. Determinação dos coeficientes intrínsecos e coeficiente de transferência de massa das membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 para os FT, proteínas e hidratos de carbono.	XXX

Índice de Figuras

Figura 1.1. Vias biossintéticas da formação de CFs em plantas, adaptado de (35).	6
Figura 1.2. Classes dos CFs presentes em plantas, adaptado de (41).	7
Figura 1.3. Estrutura química dos principais ácidos hidroxibenzóicos, adaptado (36,42).	7
Figura 1.4. Estrutura química dos principais ácidos hidroxicinâmicos, adaptado de (36,42).	7
Figura 1.5. Estrutura química do ácido clorogénico (49).	8
Figura 1.6. Estrutura base dos flavonoides, retirado de (37).	8
Figura 1.7. Estrutura química dos principais flavonóis, adaptado de (42).	9
Figura 1.8. Estrutura química dos principais flavonas, adaptado de (42).	9
Figura 1.9. Estrutura química dos principais isoflavonas, adaptado de (42).	9
Figura 1.10. Estrutura química dos principais flavanonas, adaptado de (42).	10
Figura 1.11. Estrutura química dos principais antocianidinas, adaptado de (42).	10
Figura 1.12. Estrutura química das principais catequinas, adaptado de (42).	11
Figura 1.13. Estrutura química de uma unidade de fenilpropano (a) e do secoisofariciesinol (b), adaptado de (42).	11
Figura 1.14. Estrutura química do resveratrol (estilbeno), adaptado de (42).	11
Figura 1.15. Estrutura química dos taninos condensado, adaptado de (33).	12
Figura 1.16. Estrutura química do ácido betalâmico, adaptado de (62).	12
Figura 1.17. Estrutura geral das betaxantinas e das betacianinas (62).	13
Figura 1.18. Sinapse colinérgica na ausência e a na presença de um inibidor da AChE (IACHÉ), retirado de (81).	15
Figura 1.19. Representação esquemática do a) permeação com escoamento frontal “ <i>dead-end</i> ” e b) permeação com escoamento tangencial (“ <i>cross flow</i> ”), adaptado de (117).	23
Figura 1.20. Mecanismo de separação de membrana, adaptado de (21).	24
Figura 1.21. Classificação das membranas, adaptado de (115,119).	24
Figura 1.22. Esquema do a) modo de recirculação total e b) em modo de concentração, retido de (118).	27
Figura 1.23. Esquema do modo de diafiltração, retirado de (118).	27
Figura 1.24. Representação gráfica para a determinação da permeabilidade hidráulica (L_p), retirado de (126).	28
Figura 1.25. Exemplo da determinação do MWCO para uma membrana, retirado de (126).	29
Figura 1.26. Perfil de concentração na camada limite adjacente à superfície da membrana, retirado de (128).	30
Figura 1.27. Morfologia do vegetal <i>Beta Vulgaris L.</i> , retirado de (151).	33
Figura 2.1. Instalação de ultrafiltração (UF) do ISEL: instalação real de UF (esquerda) e esquema da instalação de UF (direita) adaptado de (125).	40
Figura 2.2. Esquema dos diferentes extratos aquosos das folhas e talos da beterraba e controlos.	42
Figura 2.3. Reação do ácido gálico, composto padrão, com o molibdénio, constituinte do reagente de Folin-Ciocalteu, que é reduzido de Mo^{6+} para Mo^{5+} , adaptado de (173).	45
Figura 2.4. Reação da antrona em meio ácido com hidratos de carbono, retirado de (176).	46
Figura 2.5. Princípio do teste da capacidade de redução do radical livre DPPH na presença de uma amostra com propriedades antioxidantes, retirado de (182).	47

Figura 2.6. Esquema representativo da reação enzimática da AChE, para a determinação da atividade do enzima, através do método de Ellman, adaptado de (185).....	48
Figura 2.7. Estruturas químicas de MTT e do seu produto reduzido formazan, retirado de (189)	50
Figura 2.8. As frações dos permeados na PTM de 3 bar e as amostras da alimentação, da esquerda para a direita AC20_A, AC20_3, AC22_3, AC25_3, AC28_3, AC35_3 e A_Final.	53
Figura 3.1. Quantificação dos CBs presentes nos extratos aquosos. a) FT expressos em µg GAE/µL de extrato; b) proteínas (Pt) e hidratos de carbono (HC) expressos em mg BSA/mL e mg Glucose/mL de extrato, respetivamente.....	58
Figura 3.2. Quantificação da atividade antioxidante através do método de DPPH (barra cinza) e FT presentes nos extratos aquosos na determinação da atividade antioxidantes (marcador azul).	60
Figura 3.3. Relação entre FT presentes nos extratos aquoso e a sua atividade antioxidante (DPPH).	61
Figura 3.4. Determinação da atividade inibitória enzimática da AChE (barra cinza) e a quantidade de FT presentes nos extratos para cada ensaio (marcador azul).	62
Figura 3.5. Relação entre FT presentes nos extratos aquosos e a sua atividade inibitória da AChE.	62
Figura 3.6. Cromatograma dos extratos aquosos de folhas e talos de beterraba: Bdec (com ampliação no intervalo de tempos de retenção de 2.5 a 5 min), BCG, BDG, BCP, BDP, BCC e BDC.....	64
Figura 3.7. Cromatograma dos extratos Bdec, BCG, BDG, BCP, BDP, BCC e BDC no comprimento de onda de 480 nm e 540 nm.....	66
Figura 3.8. Espetros UV-Vis ao tempo de retenção de 3.3 min, composto 2 (betacianina) nos extratos BCG, BDG, BCP, BDP e BDC.	67
Figura 3.9. Cromatograma dos extratos Bdec, BCG, BDG, BCP, BDP, BCC e BDC no comprimento de onda de 340 nm.	69
Figura 3.10. Espetros UV-Vis composto 7 (derivado da vitexina) nos extratos aquosos de folhas e talos de beterraba e o padrão vitexina 1 mg/mL.	70
Figura 3.11. Espetros UV-Vis composto 8 (quercetina) nos extratos aquosos de folhas e talos de beterraba.	71
Figura 3.12. Espetros UV-Vis composto 9 (rutina) nos extratos aquosos de folhas e talos de beterraba e o padrão rutina 1 mg/mL.....	71
Figura 3.13. Quantificação da rutina (composto 10) nos extratos aquosos da beterraba.	72
Figura 3.14. Espetros UV-Vis composto 11 (derivado da isovitexina) nos extratos aquosos de folhas e talos de beterraba e o padrão vitexina 1 mg/mL.	72
Figura 3.15. Quantificação do derivado da vitexina (composto 7) e do derivado da isovitexina (composto 11) nos extratos aquosos da beterraba.	73
Figura 3.16. Distribuição das variáveis em estudo relativamente às variáveis extraídas através do PCA (PCEX_1 e PCEX_2): AChE – Atividade inibitória do enzima AChE (%); FT – Fenóis totais (µg GAE/µL); HC – Hidratos de carbono (mg Glucose/mL); Pt – Proteínas (mg BSA/mL); DPPH – Atividade antioxidante pelo método DPPH (%).	74
Figura 3.17. Extratos aquosos posicionados em relação das variáveis PCEX_1 e PCEX_2.	75
Figura 3.18. Determinação da permeabilidade hidráulica para as membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.....	76
Figura 3.19. Cromatograma da intensidade de absorvência máxima da alimentação (extrato BDP) à concentração de 5 mg/mL, com ampliação da região dos flavonoides (15 ao 20 min) da intensidade de absorvência a 340 nm.	80
Figura 3.20. UV-Vis referente ao pico do composto 6^a presente nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, C28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e na	

amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL e o padrão ácido ferúlico à concentração de 1 mg/mL.....	83
Figura 3.21. Quantificações do derivado da vitexina (composto 7), rutina (composto 10), do derivado da isovitexina (composto 11) e derivado do ácido ferúlico (composto 6 ^a) (µg/mg EXS) nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, C28 e AC35 às PTMs 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação.....	85
Figura 3.22. Concentração de FT (µg GAE/µL) para as frações dos permeados e alimentação.	85
Figura 3.23. Concentração de proteína (mg BSA/mL) (barra verde) e de hidratos de carbono (mg glucose/mL) (barra amarela) para os extratos dos permeados e da alimentação.	86
Figura 3.24. Quantificação da atividade antioxidante pelo método DPPH (barra cinza) e FT (marcador verde) presentes nas frações dos permeados e das respectivas membranas.	88
Figura 3.25. Determinação da atividade inibitória enzimática da AChE (barra cinza) e a quantidade de FT (marcador verde) presentes nas frações dos permeados para a PTM de 3 bar e da alimentação inicial e final.	89
Figura 3.26. Distribuição das variáveis em estudo para as frações dos permeados e das amostras da alimentação relativamente às variáveis extraídas através do PCA (PCM_1 e PCM_2): FT – fenóis totais (µg GAE/µL); HC – hidratos de carbono (mg Glucose/mL); Pt – Proteínas (mg BSA/mL); DPPH – atividade antioxidante pelo método DPPH (%).	91
Figura 3.27. Frações dos permeados e das alimentações do posicionados em relação das variáveis PCM_1 e PCM_2.	91
Figura 3.28. Distribuição das variáveis em estudo para as frações dos permeados relativamente às variáveis extraídas através do PCA (PCMP_1 e PCMP_2): FT – fenóis totais (µg GAE/µL); HC – hidratos de carbono (mg Glucose/mL); Prot – proteínas (mg BSA/mL); DPPH – Atividade antioxidante pelo método DPPH (%).	93
Figura 3.29. Frações dos permeados do extrato BDP posicionados em relação das variáveis PCMP_1 e PCMP_2.	93
Figura 3.30. Distribuição das variáveis em estudo para as frações dos permeados à PTM de 3 bar relativamente às variáveis extraídas através do PCA (PCMPIII_1 e PCMPIII_2): FT – fenóis totais (µg GAE/µL); HC – hidratos de carbono (mg Glucose/mL); Pt – proteínas (mg BSA/mL); DPPH – Atividade antioxidante pelo método DPPH (%); AChE – Atividade inibitória do enzima AChE (%).	95
Figura 3.31. Frações dos permeados à PTM de 3 bar do extrato BDP posicionados em relação das variáveis PCMPIII_1 e PCMPIII_2.	95
Figura 3.32. Cromatogramas sobrepostos da intensidade de absorvência máxima das frações de permeações AC20_3, AC22_3, AC25_3, C28_3 e AC35_3 e a fração de alimentação AC20_A, à concentração de 5 mg/mL, com ampliação da região dos flavonoides (15 ao 21 min) da intensidade de absorvência a 340 nm.	97
Figura 3.33. Cromatogramas do LC-MS em modo de ionização negativo das frações, ampliação dos tempos de retenção entre 1 e 10 minutos: AC20_A – linha preta; AC35_3 – linha azul; C28_3 – linha vermelha; AC25_3 – linha verde; AC22_3 – linha amarela; AC20_3 – linha rosa.	99
Figura 3.34. Cromatogramas do LC-MS ² em modo de ionização positivo das frações ampliação dos tempos de retenção entre 1 e 10 minutos: AC20_A – linha preta; AC35_3 – linha azul; C28_3 – linha vermelha; AC25_3 – linha verde; AC22_3 – linha amarela; AC20_3 – linha rosa.	100
Figura 3.35. Determinação dos coeficientes de refeição aparente (f) para os FT (barra verde), proteínas (barra cinza) e hidratos de carbono (barra laranja).	109
Figura 3.36. Representações gráficas de vp vs $\ln 1 - ff$ para os fenóis totais (FT) nas membranas: AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.	111
Figura 3.37. Representação gráfica da determinação dos (a) k dos FT, (b) f' dos FT; (c) k das Pt; (d) f' das Pt; (e) k dos HC e (f) f' dos HC para as membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.	111

Figura 6.1. Curva de calibração para a quantificação dos FT. utilizando o ácido gálico (GAE) como padrão.....	III
Figura 6.2. Curva de calibração para a quantificação dos hidratos de carbono. utilizando a glucose como padrão.....	III
Figura 6.3. Reta de calibração para o doseamento das proteínas. utilizando como padrão a BSA.	III
Figura 6.4. Cromatograma sobrepostos dos extratos BCG, BDG e SG.....	IV
Figura 6.5. Cromatograma sobrepostos dos extratos BCP, BDP e SP.....	IV
Figura 6.6. Cromatograma sobrepostos dos extratos BCC, BDC e SC.	IV
Figura 6.7. UV-Vis referente ao pico do composto 1 presentes nos extratos aquosos.	V
Figura 6.8. UV-Vis referente ao pico do composto 2 presentes no extrato BCG.....	V
Figura 6.9. UV-Vis referente ao pico do composto 3 presentes nos extratos aquosos.	V
Figura 6.10. UV-Vis referente ao pico do composto 4 presentes nos extratos aquosos, com ampliação do comprimento de onda entre os 230 nm e 280 nm.	VI
Figura 6.11. UV-Vis referente ao pico do composto 5 presentes nos extratos aquosos, com ampliação do comprimento de onda entre os 250 nm e 300 nm.	VI
Figura 6.12. UV-Vis referente ao pico do composto 6 presentes nos extratos aquosos.	VI
Figura 6.13. UV-Vis referente ao pico do composto 9 presentes nos extratos aquosos.	VII
Figura 6.14. Cromatograma do extrato Bdec sobreposto com os cromatogramas dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico.	VIII
Figura 6.15. Cromatograma do extrato BCG sobreposto com os cromatogramas dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico.	VIII
Figura 6.16. Cromatograma do extrato BDG sobreposto com os cromatogramas dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico.	VIII
Figura 6.17. Cromatograma do extrato BCP sobreposto com os cromatogramas dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico.	VIII
Figura 6.18. Cromatograma do extrato BDP sobreposto com os cromatogramas dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico.	IX
Figura 6.19. Cromatograma do extrato BCC sobreposto com os cromatogramas dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico.	IX
Figura 6.20. Cromatograma do extrato BDC sobreposto com os cromatogramas dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico.	IX
Figura 6.21. Representação da área do pico do detetor HPLC-IR vs concentração do PEG 1500 g/mol.....	XI
Figura 6.22. Representação da área do pico do detetor HPLC-IR vs concentração do PEG 3000 g/mol.....	XI
Figura 6.23. Representação da área do pico do detetor HPLC-IR vs concentração do PEG 6000 g/mol.....	XI
Figura 6.24. Representação da área do pico do detetor HPLC-IR vs concentração do PEG 10000 g/mol.....	XI
Figura 6.25. Representação da área do pico do detetor HPLC-IR vs concentração do PEG 20000 g/mol.....	XII
Figura 6.26. Representação da área do pico do detetor HPLC-IR vs concentração do DEX 40000 g/mol.....	XII
Figura 6.27. Representação da área do pico do detetor HPLC-IR vs concentração do DEX 70000 g/mol.....	XII
Figura 6.28. Representação da área do pico do detetor HPLC-IR vs concentração do DEX 100000 g/mol.....	XII

Figura 6.29. Representação gráfica do MWCO para a membrana AC20	XIV
Figura 6.30. Representação gráfica do MWCO para a membrana AC22	XIV
Figura 6.31. Representação gráfica do MWCO para a membrana AC25.....	XIV
Figura 6.32. Representação gráfica do MWCO para a membrana AC28.....	XV
Figura 6.33. Representação gráfica do MWCO para a membrana AC35.....	XV
Figura 6.34. Cromatograma sobrepostos das frações AC20_1, AC20_2 e AC20_3 na concentração de 5 mg/mL.....	XVII
Figura 6.35. Cromatograma sobrepostos das frações AC22_1, AC22_2 e AC22_3 na concentração de 5 mg/mL.....	XVII
Figura 6.36. Cromatograma sobrepostos das frações AC25_1, AC25_2 e AC25_3 na concentração de 5 mg/mL.....	XVII
Figura 6.37. Cromatograma sobrepostos das frações AC28_1, AC28_2 e AC28_3 na concentração de 5 mg/mL.....	XVIII
Figura 6.38. Cromatograma sobrepostos das frações AC35_1, AC35_2 e AC35_3 na concentração de 5 mg/mL.....	XVIII
Figura 6.39. UV-Vis referente ao pico do composto 1 presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL.....	XVIII
Figura 6.40. UV-Vis referente ao pico do composto 2 presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL.....	XIX
Figura 6.41. UV-Vis referente ao pico do composto 4 presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação, com ampliação do comprimento de onda 240 nm a 280 nm à concentração de 5 mg/mL.....	XIX
Figura 6.42. UV-Vis referente ao pico do composto 5 presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra alimentação à concentração de 5 mg/mL.....	XIX
Figura 6.43. UV-Vis referente ao pico do composto 6 presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL e o padrão vitexina a 1mg/mL.....	XX
Figura 6.44. UV-Vis referente ao pico do composto 7 presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL e o padrão vitexina à concentração de 1 mg/mL.....	XX
Figura 6.45. UV-Vis referente ao pico do composto 10 presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL e o padrão rutina à concentração de 1 mg/mL.....	XX
Figura 6.46. UV-Vis referente ao pico do composto 11 presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL e o padrão vitexina à concentração de 1 mg/mL.....	XXI
Figura 6.47. UV-Vis referente ao pico do composto 1 ^a) presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL.....	XXI
Figura 6.48. UV-Vis referente ao pico do composto 2 ^a) presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL.....	XXI
Figura 6.49. UV-Vis referente ao pico do composto 3 ^a) presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL.....	XXII

- Figura 6. 50. UV-Vis referente ao pico do composto 4^a) presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL..... XXII
- Figura 6.51. UV-Vis referente ao pico do composto 5^a) presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL..... XXII
- Figura 6.52. Cromatograma da amostra da alimentação (extrato BDP) sobreposto com os cromatogramas dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico..... XXIII
- Figura 6.53. Relação entre FT presentes no permeados e na alimentação e a sua atividade antioxidante.....XXV
- Figura 6.54. Microplaca em células Hep-G2, para determinação da citotoxicidade das frações AC22_3 a 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL e 0.1 mg/mL, AC35_3 a 1 mg/mL e 0.5 mg/mL, e a AC20_A a 1 mg/mL e 0.5 mg/mL.....XXVIII
- Figura 6.55. Citotoxicidade celular em células Hep-G2 nas frações AC22_3 a 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL e 0.1 mg/mL, AC35_3 a 1 mg/mL e 0.5 mg/mL, e a AC20_A a 1 mg/mL e 0.5 mg/mL.....XXVIII
- Figura 6.56. Cromatogramas do LC-MSⁿ em modo de ionização negativo das frações: **AC20_A** – linha preta; **AC35_3** – linha azul; **AC28_3** – linha vermelha; **AC25_3** – linha verde; **AC22_3** – linha amarela; **AC20_3** – linha rosa.....XXIX
- Figura 6.57. Cromatogramas do LC-MSⁿ em modo de ionização positivo das frações: **AC20_A** – linha preta; **AC35_3** – linha azul; **AC28_3** – linha vermelha; **AC25_3** – linha verde; **AC22_3** – linha amarela; **AC20_3** – linha rosa.....XXIX
- Figura 6.58. Representações gráficas de vp com $\ln 1 - f)f$ para as proteínas (Pt) nas membranas: AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.....XXXI
- Figura 6.59. Representações gráficas de vp com $\ln 1 - f)f$ para os hidratos de carbono (HC) nas membranas: AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.....XXXII

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Características mais relevantes dos processos na tecnologia por membranas cuja força motriz é o gradiente de pressão, adaptado de (115,117).	26
Tabela 1.2. Fatores que afetam o desempenho da membrana, adaptado de (121,133).	31
Tabela 1.3. Classificação científica da <i>Beta vulgaris</i> L (149).	33
Tabela 2.1. Quantificação do extrato seco dos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba.	43
Tabela 2.2. Gradiente utilizado no método de análise das amostras por HPLC-DAD.	44
Tabela 2.3. Gradiente utilizado durante as análises por LC-QTOF-MS.	44
Tabela 2.4. Reagentes e quantidade utilizados na preparação das membranas, adaptado de (126).	51
Tabela 2.5. Soluções de PEG e DEX utilizados na determinação dos coeficientes de rejeição a solutos orgânicos para as membranas: AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.	52
Tabela 3.1. Quantidade de FT, proteínas e hidratos de carbono presentes nos extratos aquosos preparados e respetivos controlos preparados como descrito em 2.2.1.	58
Tabela 3.2. Quantificação da atividade antioxidante (DPPH) dos diferentes extratos aquosos. 60	
Tabela 3.3. Determinação da atividade inibitória enzimática da AChE dos diferentes extratos aquosos.	62
Tabela 3.4. Intensidade relativa dos sinais dos picos identificados obtidos por HPLC-DAD para os extratos aquosos das folhas e talos das beterrabas.	65
Tabela 3.5. PCA – Contribuições das variáveis FT, proteínas (Pt), hidratos de carbono (HC), atividade inibitória do AChE e atividade antioxidante (DPPH) dos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba. para o componente PCEX_1 e PCEX_2.	74
Tabela 3.6. Permeabilidade hidráulica (Lp) das diferentes membranas de UF.	77
Tabela 3.7. Coeficiente de rejeição aparente aos solutos orgânicos para as diferentes membranas à PTM de 1 bar, à temperatura de 25°C e caudal de circulação de alimentação de 180 L/h.	77
Tabela 3.8. Limites de exclusão molecular (MWCO) das membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.	78
Tabela 3.9. Dados experimentais para as membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 relativos à variação do fluxo de permeação com a PTM a 25 °C (Jp 25°C) e Pr/PWP.	79
Tabela 3.10. Intensidade relativa dos sinais dos picos obtidos por HPLC-DAD para as frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, C28 e AC35 nas PTM de 1, 2 e 3 bar e a respetiva alimentação. Intervalo de intensidade de absorvência: (++++): 3.0 – 2.0; (+++): 2.0- 1.0; (++) : 1.0 – 0.5; (+) : 0.5 – 0.20; (-) : 0.20 – 0.15; (ND) : ≤ 0.15.	82
Tabela 3.11. Quantificações do derivado da vitexina (composto 7), da rutina (composto 10) e derivados da isovitexina (composto 11) e ácido ferúlico (composto 6 ^a) (µg/mg EXS) nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação.	84
Tabela 3.12. Concentração das frações dos permeados e da alimentação em termos de massa seca, a concentração de FT (µg GAE/mg EXS), proteína (mg BSA/mg EXS) e hidratos de carbono (mg Glucose/mg EXS).	87
Tabela 3.13. PCA – Contribuições das variáveis FT, hidratos de carbono, proteínas e atividade antioxidante (DPPH) para as frações dos permeados e amostras da alimentação, para PCM_1 e PCM_2.	90
Tabela 3.14. PCA – Contribuições das variáveis FT, hidratos de carbono (HC), proteínas (Pt) e atividade antioxidante (DPPH) para as frações dos permeados, para PCMP_1 e PCMP_2.	92

Tabela 3.15. PCA – Contribuições das variáveis FT, hidratos de carbono, proteínas, atividade antioxidante (DPPH) e atividade inibitória da AChE para as frações dos permeados à PTM de 3 bar, para PCMP III_1 e PCMP III_2.....	94
Tabela 3.16. Identificação dos CBs presentes nas frações de permeados e alimentação inicial das folhas e talos da beterraba, através dos perfis de fragmentação MS ⁿ	101
Tabela 3.17. Identificação dos CBs nas diferentes frações de permeado e alimentação inicial de folhas e talos de beterraba.....	104
Tabela 3.18. Citotoxicidade celular para as frações resultantes das permeações pela membrana AC22 e AC35 à PTM de 3 bar (AC22_3 e AC35_3) e da alimentação (AC20_A).....	107
Tabela 3.19. Determinação dos coeficientes de rejeição aparente (f) do FT, Pt e HC.	108
Tabela 3.20. Dados da permeabilidade hidráulica (Lp), MWCO e coeficiente de transferência de massa (k) e coeficiente de rejeição intrínsecos (f') para os fenóis totais (FT), proteínas (Pt) e hidratos de carbono (HC) das membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.	112
Tabela 6.1. Valores registados experimentalmente para a massa de água recolhida, o tempo do ensaio, a temperatura da água, e determinação dos caudais mássicos (Q), do fluxo de permeação (Jp) e do fluxo a 25 °C para as membranas AC20, AC22; AC25, AC28 e AC35.....	X
Tabela 6.2. Valores experimentais de massa soluto, tempo de ensaio e temperatura, caudal mássico (Q), fluxo de permeação (Jp), fluxo a 25 °C para as membranas AC20, AC22; AC25, AC28 e AC35.....	XIII
Tabela 6.3. Áreas dos picos obtidos através do HPLC-IR e concentração obtida com a utilização das respetivas retas de calibrações dos padrões.....	XIII
Tabela 6.4. Dados experimentais dos ensaios de fracionamento do extrato BDP utilizando as membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35, às PTMs 1, 2 e 3 bar, para a massa de permeado recolhido, tempo de recolha, temperatura, e a correspondente determinação de caudal mássico (Q) e fluxo de permeação (Jp).....	XVI
Tabela 6.5. Quantidade de FT, proteínas e hidratos carbono de presentes nas frações das permeações das membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 e das amostras da alimentação.	XXIV
Tabela 6.6. Quantificação da atividade antioxidante (método DPPH) para as frações dos permeados das membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 e das amostras da alimentação.	XXV
Tabela 6.7. Quantificação da concentração em FT para 50% da atividade antioxidante (método DPPH) para as frações dos permeados das membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 e da alimentação.	XXVI
Tabela 6.8. Quantificação da atividade inibitória enzimática da AChE e concentração em FT para 50% da atividade inibitória enzimática da AChE nas frações dos permeados das membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 para a PTM de 3 bar e da alimentação inicial e final.	XXVII
Tabela 6.9. Dados experimentais referentes aos FT para a construção das retas de calibração para determinação dos coeficientes de rejeição intrínseco (f') e coeficiente de transferência de massa (k).....	XXX
Tabela 6.10. Dados experimentais referentes às proteínas (Pt) para a construção das retas de calibração para determinação dos coeficientes de rejeição intrínseco (f') e coeficiente de transferência de massa (k).	XXX
Tabela 6.11. Dados experimentais referentes aos hidratos de carbono (HC) para a construção das retas de calibração para determinação dos coeficientes de rejeição intrínseco (f') e coeficiente de transferência de massa (k).....	XXXI

Capítulo 1: Enquadramento Teórico

1.1. Enquadramento

A prevenção e o tratamento de doenças crónicas, nomeadamente doenças cardiovasculares (DCV) e cancro, são o maior desafio para o sistema de saúde moderno. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) aproximadamente 31 % dos óbitos a nível mundial, em 2016, foram causadas por DCV (1). Portanto, o impacto económico e social deste tipo de doenças é enorme e com tendência a aumentar ao longo dos anos devido ao envelhecimento das populações. Por esta razão é necessário o desenvolvimento de medidas preventivas. Um dos fatores de risco mais preponderante para este tipo de patologias é uma dieta alimentar pobre em vegetais e frutas, com consumo excessivo de proteína animal, que em suma resulta numa dieta pouco saudável (1–3).

Como consequência de uma dieta alimentar desequilibrada, associada a um estilo de vida sedentário tem-se verificado um aumento da obesidade dentro na população mundial (4), e um aumento da patologia hiperlipidemia, a forma mais comum de dislipidemia, esta consiste no aumento nos níveis lipídicos no sangue, nomeadamente colesterol e triglicéridos. Este conjunto de fatores de risco contribuem para o desenvolvimento das DCV (3).

De acordo com Hertog *et al.*(5,6), Knekt *et al.* (7) e da revisão bibliográfica de Kristi *et al.* (8) constatou-se uma relação epidemiológica entre o consumo de vegetais e frutas com a diminuição da incidência de doenças crónicas associadas com o envelhecimento celular, como cancro (8) ou DCV (5–7). Para além de nutrientes, vitaminas e minerais, as frutas e vegetais possuem uma elevada quantidade e diversidade de compostos bioativos (CBs). Destes CBs destacam-se os compostos fenólicos ou carotenoides (9,10), os quais são frequentemente apontados como agentes promotores de saúde, pois apresentam atividade antioxidante e anti-inflamatória (10,11).

Nos últimos anos, a raiz da beterraba (*Beta vulgaris L.*) pertencente à família *Chenopodiaceae* (12), também conhecido como beterraba vermelha, tem sido considerada com um alimento funcional. A suplementação de uma dieta alimentar com extratos de beterraba demonstrou apresentar efeitos positivos em diferentes aspetos da saúde e na doença, podendo, apresentar-se como um produto económico, prático e importante para incorporar numa dieta alimentar saudável (13).

A beterraba é um vegetal com uma produção agrícola com uma produção mundial de 2.7×10^{11} ton/ano em 2014 (14). No entanto, apenas a raiz da beterraba é considerada produto de interesse para o consumo alimentar, sendo os talos e folhas considerados sub-produtos e tratados como um resíduo agrícola. A raiz da beterraba é rica em hidratos de carbono, fibras, proteínas e minerais, fornecendo CBs importantes como compostos fenólicos (CFs), carotenoides e betalaínas. Os talos e as folhas da beterraba também apresentam elevados níveis em CBs (15). Desta forma, e no âmbito desta dissertação foi proposta a análise de extratos dos talos e folhas de beterraba e o seu potencial de consumo com base na identificação dos seus CBs. Para além de contribuir para uma dieta saudável, servindo de estratégia para melhorar as defesas antioxidantes endógenas, ajudando a proteger os componentes celulares contra danos

oxidativos e aumentando o valor nutricional da dieta alimentar (16), a utilização deste resíduo agrícola permitirá também reduzir o desperdício alimentar, potenciando a sustentabilidade da produção da beterraba (4). O objetivo principal deste trabalho foi utilizar uma fonte económica de matéria-prima, com aplicação da tecnologia de membranas para a recuperação destes CBs de elevado valor e avaliar o potencial da sua reciclagem dentro da cadeia alimentar, por exemplo como aditivos funcionais em diferentes produtos (17).

Apesar dos métodos de extração habituais dos compostos bioativos (CBs) presentes nos vegetais e frutas, recorrendo a solventes orgânicos apresentarem bons resultados, mas com alguns inconvenientes, tais como: exigência de uma elevada quantidade de solventes orgânicos, extrações com duração prolongada, a escolha dos solventes limitada devida à preservação da qualidade dos alimentos e possível degradação dos CBs (18). Mas, a crescente poluição ambiental devido ao uso exponencial de solventes orgânicos voláteis e prejudiciais, pelas indústrias químicas, impulsionou a utilização de solventes alternativos verdes. A ideia de solvente verde consiste em reduzir o impacto ambiental resultante da sua utilização em processos industriais. Neste sentido, a água pode ser considerada como um solvente verde, uma vez que é não-tóxico para a saúde e para o ambiente, além disso, é um solvente seguro e pouco dispendioso (19).

Para efetuar a separação e purificação dos CBs presentes nos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba, foi utilizada uma tecnologia “verde”, como a tecnologia de separação por membranas num processo de ultrafiltração (UF). Entre as vantagens do uso de UF encontra-se a possibilidade de eliminação da etapa de clarificação convencional, não requer o uso de calor, não ocorre mudança de fase ou pH e evita o uso de solventes orgânicos. Permitindo preservar as propriedades organoléticas e nutricionais dos extratos, importantes para a qualidade final do produto permeado, que se pretende enriquecido em CBs e que demonstrem maior potencial como compostos promotores de saúde. Além disso, os processos de separação por membranas são sistemas compactos e de fácil dimensionamento, com a possibilidade de uso em sistemas contínuos e podem ser combinados com outros processos de separação (20,21).

A originalidade deste trabalho foi o isolamento de CBs presentes em extratos aquosos de talos e folhas de beterraba, utilizando a tecnologia de membranas com um processo de UF. Foi possível desenvolver inicialmente um extrato contendo CBs que apresentou uma pegada ecológica baixa, dado que foi utilizado como matéria-prima um sub-produto agrícola. A obtenção e o isolamento dos CBs presentes no extrato foi efetuada com recurso a um solvente “verde” (água). A metodologia de isolamento dos compostos de interesse apresenta-se como pouco dispendiosa, dispensando solventes orgânicos e sem necessidade de temperaturas elevadas, o que permitiu preservar a estabilidade e atividade biológica dos CBs recuperados e minimizar o consumo energético.

1.2. Compostos bioativos (CBs) presentes nas plantas

Segundo Guaadaoui *et al.* (22), os compostos bioativos (CBs) apresentam a capacidade de interagir com um ou mais componentes de um tecido vivo, desempenhando uma variedade de efeitos possíveis. Os CBs provenientes de plantas, são moléculas produzidas por diversas espécies vegetais que apresentam atividade farmacológica ou tóxica para o homem ou os animais (23).

As plantas sintetizam uma vasta gama de compostos orgânicos que são tradicionalmente classificados como metabolitos primários e secundários. Os metabolitos primários são compostos que desempenham papéis essenciais associados à fotossíntese, respiração e crescimento celular. Estes incluem: fitoesteróis, lípidos, nucleótidos, aminoácidos e ácidos orgânicos. Os metabolitos secundários são estruturalmente diversos e parecem desempenhar um papel importante na proteção de plantas contra herbívoros e infecções microbianas, ou como compostos que são atrativos para agentes bióticos promovendo a polinização ou na dispersão de sementes, protetores de radiação ultravioleta (UV) ou em moléculas sinalizadoras na formação de nódulos radiculares fixadores de azoto em leguminosas (24).

Os metabolitos secundários podem ser subdivididos em três principais classes: terpenóides, compostos fenólicos (CFs) e compostos que contêm azoto ou enxofre (25–28). Os terpenóides são compostos que integram uma diversificada classe de substâncias como os esteróides, carotenóides e ácido giberélico (29). Esta classe é composta por mais de 23 000 estruturas conhecidas, apresentando-se como o maior grupo de compostos ativos nas plantas e frutas (26). Os CFs são também amplamente sintetizados no reino vegetal e apresentam como principal função a defesa contra pragas e doenças (30). Os CBs que contêm enxofre proporcionam às plantas uma variedade de defesas químicas. Na subclasse de metabolitos secundários de plantas que contêm azoto na sua composição química encontram-se os alcalóides, glicosídeos cianogênicos, aminoácidos não protéicos e as betalaínas, estes compostos também apresentam um elevado interesse devido às propriedades medicinais e benefícios para a saúde que lhes são atribuídos (28).

Os metabolitos secundários também podem ser utilizados a nível industrial como corantes, fibras, colas, agentes aromatizantes ou fármacos, e são vistos como potenciais fontes de novas drogas naturais, antibióticos, inseticidas e herbicidas (24).

1.2.1. Compostos fenólicos (CFs)

Os CFs são uma das principais classes de metabolitos secundários das plantas com aproximadamente 10 000 estruturas identificadas (25). Apesar da sua ubiquidade, estes podem funcionar como biomarcadores para a determinação botânica e geográfica da origem das plantas. Estes compostos podem variar mediante a espécie, a natureza, quantidade e distribuição, e dependem essencialmente de dois tipos de fatores: os fatores biológicos e os fatores abióticos. Os fatores biológicos incluem a espécie botânica, o genótipo, as diferentes

partes morfológicas da planta, bem como o seu estágio de desenvolvimento, enquanto os fatores abióticos incluem o estado nutricional do solo, incidência solar, temperatura, pH do solo, disponibilidade da água, entre outros (31,32).

Os CFs são sintetizados pelas plantas através das vias pentose-fosfato, chiquimato e fenilpropanóide (Figura 1.1). Estes podem ser definidos quimicamente como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidróxilo, incluindo os seus derivados funcionais (18,33,34).

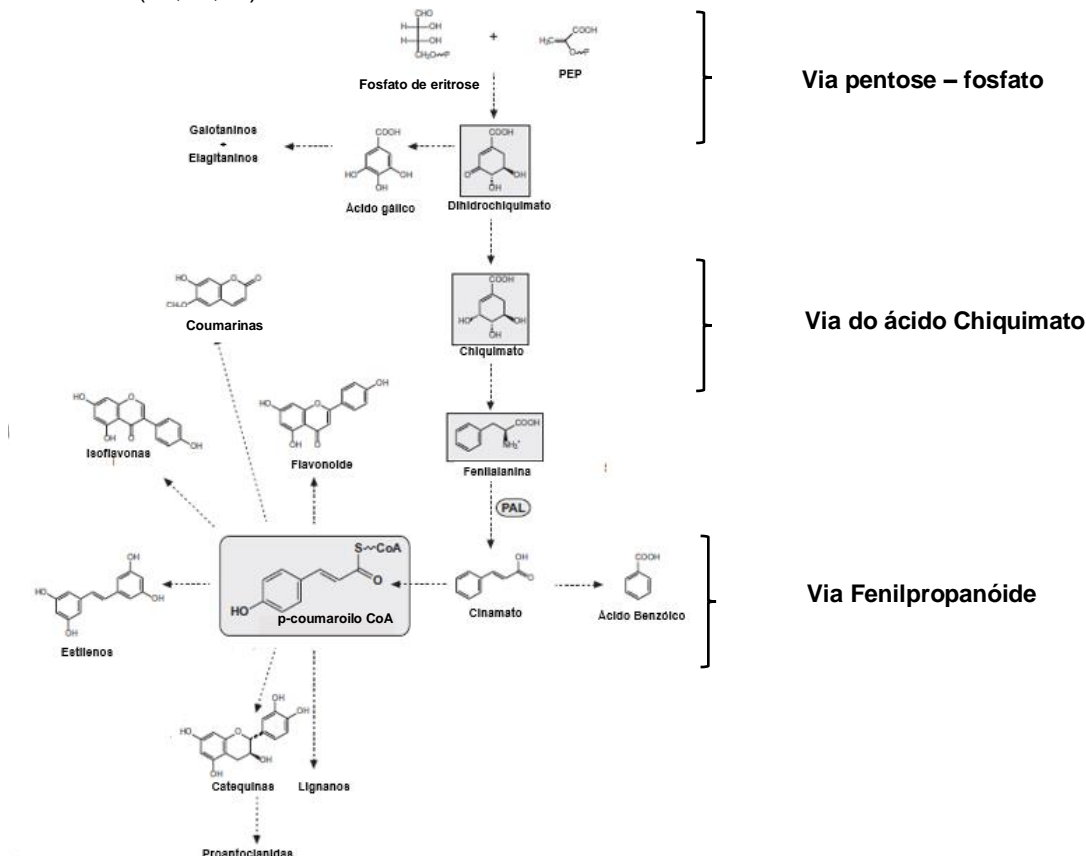


Figura 1.1. Vias biossintéticas da formação de CFs em plantas, adaptado de (35).

A natureza química dos CFs pode variar de uma estrutura simples (agliconas) à polimerizada (36). A maioria dos CFs nas plantas encontra-se como glicosídeos com diferentes unidades de oses que podem estar ou não acilados em diferentes posições da sua estrutura (37), mas também pode encontrar-se ligada a proteínas ou outras substâncias vegetais (36). Além disso, uma única planta pode conter vários CFs cujas concentrações, estabilidade e atividade biológica variam. Devido a esta vasta diversidade estrutural, muitos CFs ainda não foram identificados e caracterizados, consequentemente, o mecanismo de ação não está bem estabelecido (38).

Os CFs estão amplamente disponíveis nas fontes alimentares derivadas de plantas consumidas pelos humanos diariamente, como frutas, legumes, cereais, chá, vinho, etc. (37,39). São responsáveis pelas principais propriedades organolépticas, como cor e sabor em alimentos e bebidas derivadas de plantas (40). A sua presença em tecidos animais é geralmente devido à ingestão de produtos de origem vegetal (33).

Os CFs são dos grupos mais numerosos e abundantemente distribuídos de produtos naturais no reino vegetal. Mais de 10 000 estruturas fenólicas são conhecidas atualmente, e de entre estas, mais de 6 000 flavonóides já foram identificados (25). Este grupo de produtos naturais é altamente diversificado e contém vários subgrupos de CFs (37).

A diversidade e vasta distribuição dos CFs em plantas levaram a diferentes formas de classificar esses compostos naturais, podendo ser classificados por origem, função biológica e/ou estrutura química. Para simplificar a descrição, a classificação dos CFs neste enquadramento teórico será feita de acordo com as estruturas químicas dos agliconas (37). Os CFs podem ser divididos em diversas classes, como descrito na Figura 1.2.

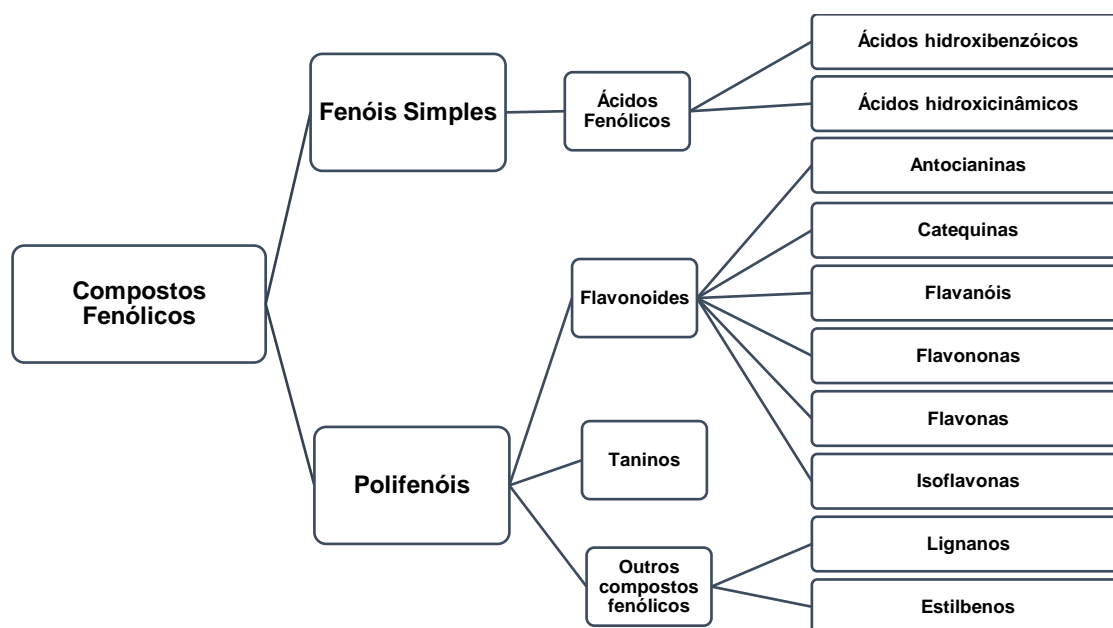


Figura 1.2. Classes dos CFs presentes em plantas, adaptado de (41).

1.2.1.1. Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos podem ser classificados segundo dois subgrupos, os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos, representando aproximadamente um terço dos CFs ingeridos na dieta alimentar (43).

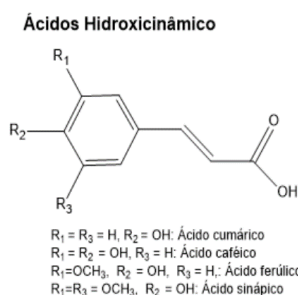
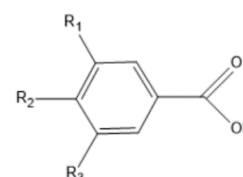


Figura 1.4. Estrutura química dos principais ácidos hidroxicinâmicos, adaptado de (36,42).

Ácidos Hidroxibenzóico



$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$: Ácido protocatéuico
 $R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$: Ácido *p*-hidroxibenzóico
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Ácido gálico
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3 = H$: Ácido vanílico
 $R_1 = R_3 = OCH_3, R_2 = OH$: Ácido siríngico

Os ácidos hidroxibenzóicos têm a estrutura química de C6-C1, são exemplos desta classe: o ácido gálico, *p*-hidroxibenzóico, o ácido protocatéuico, o ácido vanílico e o ácido siríngico (18) como apresentados na Figura 1.3.

Figura 1.3. Estrutura química dos principais ácidos hidroxibenzóicos, adaptado (36,42).

Enquanto os ácidos hidroxicinâmicos (Figura 1.4) são compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três carbono

(C6-C3), os compostos mais abundantes deste grupo são os seguintes: o ácido cafeico, o ácido ferúlico, o ácido *p*-cumárico, e o ácido sinápico (18).

Os ácidos fenólicos têm demonstrado potencial no papel protetor contra doenças oxidativas, como DCV e cancro. Também tem sido investigado a inter-relação do vinho com a capacidade antioxidante e vasodilatadora com os derivados do ácido hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico (18,44).

O ácido cafeico é conhecido por bloquear seletivamente a biossíntese de leucotrienos, componentes envolvidos em imuno-regulação, reações alérgicas e doenças como a asma (18,45). O ácido cafeico e alguns dos seus ésteres podem possuir atividade antitumoral contra o carcinoma do cólon (18,45) e atuam como inibidores seletivos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (18,46). Também foi demonstrado que o ácido cafeico e ferúlico apresentam a capacidade de desintoxicar metabolitos carcinogênicos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (18,47).

O ácido clorogénico, é um éster do ácido cafeico e do ácido (*L*)-quinico, apresenta a capacidade de inibir a peroxidação lipídica no fígado de rato induzido pelo tetracloreto de carbono, um potente carcinógeno hepático (Figura 1.5) (18,48).

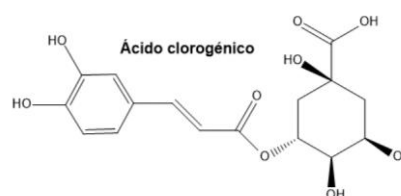


Figura 1.5. Estrutura química do ácido clorogénico (49).

Alguns estudos demonstraram que a ingestão do ácido *o*-cumárico com o flavonóide rutina pode ser benéfica para a diminuição da gordura induzida por dislipidemia, hepatosteatose e no stress oxidativo em ratos (18,50).

1.2.1.2. *Flavonoides*

Na sua generalidade, os flavonoides apresentam propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, na prevenção de cancro e de DCV e promovendo a ativação do sistema imunitário, tornando-os uma classe importantes dos CFs na prevenção e tratamento de múltiplas doenças (18,51).

Os flavonoides são moléculas de baixo peso molecular (100 a 700 g/mol (52)) constituídos em quinze átomos de carbono, organizados numa configuração de C6-C3-C6. São compostos tricíclicos possuindo dois anéis aromáticos (anéis A e B), ligados por uma cadeia alifática de 3 carbonos, a qual normalmente encontra-se condensada na forma de um pirano, o anel C (Figura 1.6) (18,53). As substituições nos anéis A, B e C dão origem a diferentes compostos de flavonoides e essas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação.

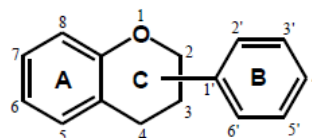


Figura 1.6. Estrutura base dos flavonoides, retirado de (37).

A presença de oses é muito comum na maioria dos flavonoides, ocorrendo naturalmente como glicosídeos. A presença de oses e dos grupos hidroxilo aumentam a solubilidade em soluções aquosas dos flavonoides, outros substituintes, tais como grupos metilo e grupos isopentilo,

tornam os flavonoides lipofílicos (24). As variações nos padrões de substituição para o anel C resultam nas principais classes de flavonoides, ou seja, flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas (3-flavanóis), isoflavonas e antocianidinas (18,54).

a) Flavonóis

Os flavonóis possuem um grupo hidroxilo na posição 3 do anel C (Figura 1.7), sendo a quercetina, miricetina e o kaempferol os principais flavonóis da dieta humana (53), encontram-se em todos os frutos e legumes (são exemplos a maçã, amoras, brócolos e alface) (30). Considerado o flavonol dietético mais abundante, a quercetina, é um potente antioxidante porque apresenta características estruturais para a atividade de eliminação de radicais livres (55).

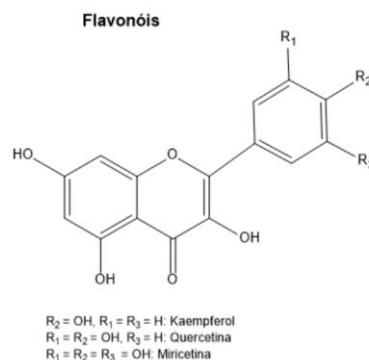


Figura 1.7. Estrutura química dos principais flavonóis, adaptado de (42).

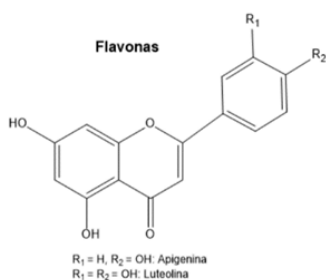


Figura 1.8. Estrutura química dos principais flavonas, adaptado de (42).

b) Flavonas

As flavonas têm uma relação estrutural semelhante aos flavonóis (Figura 1.8) caracterizando-se pela presença no anel C com uma ligação dupla entre as posições 2 e 3, e o grupo carbonilo na posição 4 (56). Existem inúmeras substituições possíveis com estes CFs, as flavonas, incluindo hidroxilação, metilação, alquilação de O e C e glicosilação sendo que a maioria formam estruturas do tipo 7-O-glicosídeos (24). Em frutas e legumes, os flavonas são muito menos comuns do que os flavonóis. As flavonas que se associam como glicosídeos são a luteolina, apigenina e a tangeritina (30).

c) Isoflavonas

As isoflavonas apresentam um grupo carbonilo na posição 4 e o anel aromático B encontra-se ligado à restante molécula pelo carbono da posição 3, existindo ainda uma dupla ligação no anel central entre os carbonos 2 e 3 (Figura 1.9). Estes CFs apresentam uma estrutura semelhante à dos estrogénios podendo desta forma ligar-se aos recetores e funcionar como fitoestrogénios, podem encontrar-se quase exclusivamente em leguminosas, como o caso da soja (18,24)

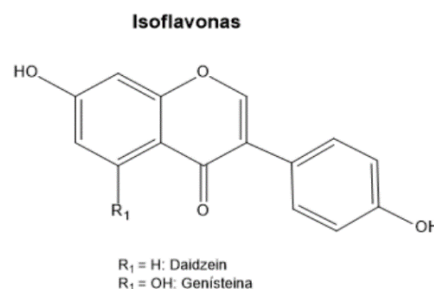


Figura 1.9. Estrutura química dos principais isoflavonas, adaptado de (42).

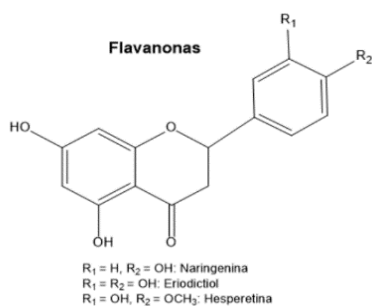


Figura 1.10. Estrutura química dos principais flavanonas, adaptado de (42).

d) Flavanonas

As flavanonas distinguem-se pela presença de um grupo carbonilo na posição 4 do anel pirano e pela ausência da dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 (Figura 1.10), são encontradas essencialmente nos frutos cítricos (24,53). Os flavanonas mais comuns são as seguintes: hesperetina, naringenina, eriodictiol, homoeriodictiol, etc (30).

e) Antocianidinas

As antocianidinas são a maior classe de pigmentos solúveis em soluções aquosas no reino vegetal e são responsáveis pela maioria das cores vermelhas, azuis e roxas encontradas em frutas, legumes, flores e outros tecidos vegetais. Tratam-se de CFs que pertencem à classe dos flavonóides, que se encontram geralmente sob a forma de glicosídeos, sendo estes denominados como antocianinas. As antocianidinas mais comuns são pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina (Figura 1.11). Estes flavonoides podem encontrarem-se ligados a ácidos hidroxicinâmicos e ácidos orgânicos, como os ácidos málico e acético (24). As antocianinas são consideradas como um componente importante na nutrição humana (18,57), sendo este facto apoiado por inúmeros estudos que relataram uma correlação positiva de conteúdo de pigmento de frutas ou vegetais e capacidades antioxidantes (18,58,59). Os extratos de frutas vermelhas que são ricos em antocianinas são usados na medicina popular e têm demonstrado alguns efeitos terapêuticos positivos como agentes anti-inflamatórios e no tratamento de várias doenças, incluindo a doença de microcirculação resultante da fragilidade capilar e a na prevenção da aterosclerose induzida pelo colesterol (18,60). Como corante, as antocianinas são consideradas um substituto potencial para corantes alimentares sintéticos (18).

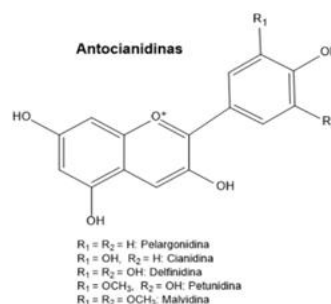


Figura 1.11. Estrutura química dos principais antocianidinas, adaptado de (42).

f) Catequinas (3-Flavanóis)

As catequinas, também denominadas por 3-flavanóis, diferenciam-se pela presença de um anel C sem grupo carbonilo na posição 4 e sem dupla ligação entre 2 e 3, possuindo ainda um grupo hidroxilo no carbono 3 (Figura 1.12). Encontram-se essencialmente em bebidas, caso do chá verde e do vinho tinto, mas também em frutos como o damasco e o pêssego (53).

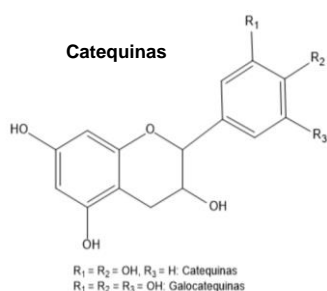


Figura 1.12. Estrutura química das principais catequinas, adaptado de (42).

As catequinas são das subclasses mais complexas de flavonoides, desde os monómeros simples (+)-catequina e seu isômero (-)-catequina, até as proantocianidinas oligoméricas e poliméricas, também conhecidas como taninos condensados. Ao contrário das flavonas, flavonóis, isoflavonas e antocianidinas, que são moléculas planas, enquanto as catequinas, taninos condensados e flavanonas, têm um elemento C3 saturado no anel C

heterocíclico e são, portanto, não planares. Os dois centros quirais em C2 e C3 das catequinas produzem quatro isômeros para cada nível de hidroxilação do anel B, dois dos quais, (+)-catequina e (-)-epicatequina, são comuns na natureza, enquanto (-)-catequina e (+)-epicatequina são relativamente raros (24).

1.2.1.3. Outros compostos fenólicos (CFs)

a) **Lignano**

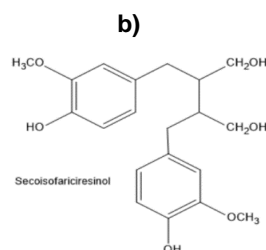
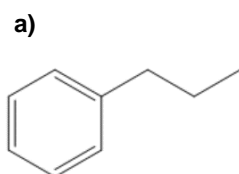


Figura 1.13. Estrutura química de uma unidade de fenilpropano (a) e do secoisofaricresinol (b), adaptado de (42).

A estrutura química dos compostos que pertencem à classe lignano possuem duas unidades fenilpropano (Figura 1.13, a) ligadas por uma ligação C-C entre os átomos centrais das respectivas cadeias laterais e são compostos de menores dimensões. Os lignanos são um grupo de CFs relativamente simples (Figura 1.13 b)). Os lignanos encontram-se numa ampla variedade de alimentos vegetais, principalmente sementes de óleo, grãos de cereais, legumes, frutas e leguminosas (18).

b) **Estilbenos**

Os estilbenos normalmente encontram-se em baixas quantidades na dieta humana, e o CFs mais comum desta classe é o resveratrol (30). Os membros da família dos estilbenos que possuem a estrutura C6-C2-C6 (Figura 1.14), como os flavonoides (24,42).

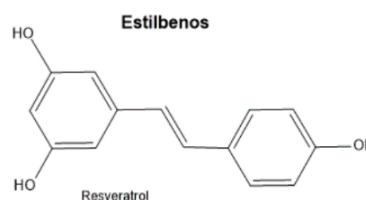


Figura 1.14. Estrutura química do resveratrol (estilbeno), adaptado de (42)

1.2.1.4. Taninos

Os taninos são compostos de peso molecular relativamente elevados (até 20 000 g/mol (61)), e constituem o terceiro grupo mais importante dos CFs, podendo ser subdivididos em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácido gálico ou ácido elágico glicosilados (galotaninos e elagiotaninos, respetivamente), enquanto os taninos condensados são polímeros de monómeros de 3-flavanóis (ex. catequinas) (Figura 1.15) (18,30,42). Ainda existe uma terceira subdivisão, os florotaninos são monómeros de floroglucinol e foram isolados de diversos géneros de algas vermelhas (18). Os taninos são CFs, que se ligam a proteínas e a compostos básicos, como alcalóides ou iões metálicos pesados, verifica-se que quando em solução são insolúveis e precipitam facilmente (18,30,42).

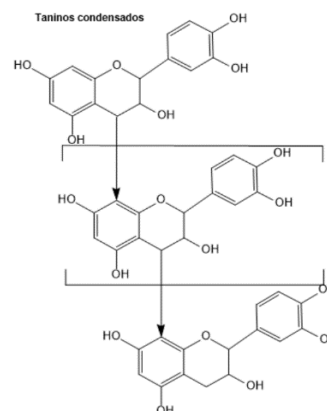


Figura 1.15. Estrutura química dos taninos condensado, adaptado de (33).

1.2.2. **Betalainas**

As betalainas são uma classe de pigmentos solúveis em água que contém azoto na sua composição química, que substituem os flavonoides antocianidinas em todas as famílias de plantas da Ordem *Caryophyllales* (15 famílias e 8600 espécies), exceto nas famílias *Caryophyllaceae* e *Molluginaceae*. São exemplos de plantas pigmentadas por betalainas o amaranto (*Amaranthus* spp.) e a beterraba (*Beta vulgaris* L.) (63,64).

Estes compostos acumulam-se principalmente nas flores, frutos e tecidos vegetativos, onde desempenham importantes papéis fisiológicos, como proteção contra contaminação bacteriana e radiação UV, como vetores de atração no processo de polinização e dispersão de sementes. As principais fontes comestíveis conhecidas de betalainas são a beterraba vermelha, acelga, grãos ou folhas de amaranto, pitaya (fruto do dragão), entre outras (63).

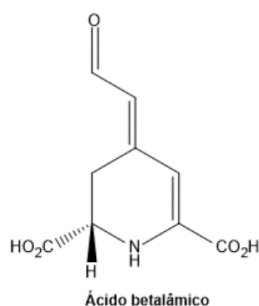


Figura 1.16. Estrutura química do ácido betalâmico, adaptado de (62).

Estes compostos são derivados do aminoácido tirosina e sintetizados na correspondente via de biossíntese. As betalainas naturais conhecidas possuem um sistema conjugado 1,7-diazaeptamético como cromóforo, que inicia a sua biossíntese a partir do ácido betalâmico, um aldeído α,β -insaturado instável (Figura 1.16). Os derivados de betalainas podem ser classificados, dependendo dos grupos funcionais ligados à estrutura principal, como betaxantinas (cor amarelo-laranja, $\lambda_{\text{máx}}$ a 480 nm) e betacianinas (cor vermelho-violeta, $\lambda_{\text{máx}}$ a 540 nm) (Figura

1.17) (62,64). São exemplos da classe betaxantinas, a vulgaxantina I e II e da classe betacianinas, a betanina e a isobetanina (62).

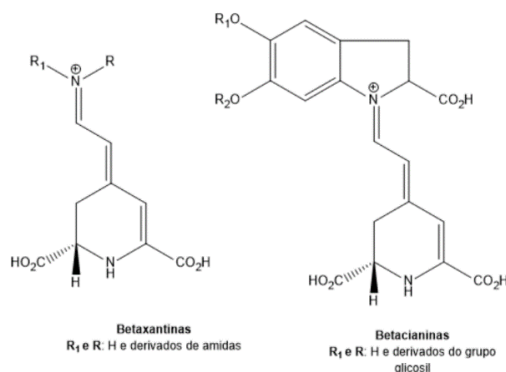


Figura 1.17. Estrutura geral das betaxantinas e das betacianinas (62).

Como outros fitoquímicos (antocianinas, carotenóides e clorofilas), as betalainas são utilizadas como substâncias corantes no processamento de alimentos ácidos, devido à sua estabilidade de pH 3 a 7. As betalainas, são utilizadas na preparações de frutas, produtos lácteos, gelados, pastelaria, sopas, molhos e bebidas, e também no ajuste ou correção da coloração ou descoloração de alimentos durante o processamento ou armazenamento (63). Tem-se verificado um aumento do interesse nestes CBs devido às suas propriedades relacionadas com a saúde, pois são referidos como possuindo propriedades antirradicais e exibirem elevada atividade antioxidante, anti-inflamatória, de inibição da peroxidação lipídica e antimicrobiana (63,65).

1.3. Propriedades biológicas dos compostos bioativos (CBs)

1.3.1. Potencial antioxidante

Os radicais livres do oxigênio e outras espécies reativas do oxigênio (ROS) desempenham várias funções fisiológicas e são parte integrante no sistema imunitário nos organismos aeróbios contra microrganismos invasores. São produzidas durante o metabolismo celular aeróbico e apresentam um papel importante na manutenção do estado celular redox (66). No entanto, também são agentes com potencial de provocar stress oxidativo provocando danos celulares, isto ocorre quando o balanço entre os ROS e as defesas antioxidantes celulares se encontra desequilibrado (66–68). Este fato parece contribuir para o desenvolvimento e progressão de algumas patologias, em particular DCV (69), doenças oncológicas (70) e doenças neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer ou artrite reumatóide (71).

As ROS são moléculas que contêm oxigênio e reagem espontaneamente com outras moléculas de uma forma rápida, ou seja, um processo redox que envolve a transferência de elétrões ou átomos de hidrogênio para essas moléculas oxidando-as. Dentro das espécies normalmente denominadas como ROS podem-se encontrar as seguintes: radicais de superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidróxilo (HO^{\cdot}) radical óxido nitrilo (NO^{\cdot}) e os radicais peróxilo e alcóxilo (ROO^{\cdot} e RO^{\cdot}). A toxicidade das ROS está associada com a sua elevada reatividade com componentes celulares como as proteínas, o DNA e lípidos, dando origem à

fragmentação de proteínas, peroxidação lipídica, processos de mutagênese e carcinogênese (66,72,73).

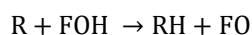
As fontes endógenas de ROS *in vivo* variam desde processos fotoquímicos, autoxidação e reações enzimáticas, nomeadamente podem resultar como um subproduto do metabolismo na mitocôndria, citocromo P-450 ou NADPH oxidase, entre outros. Enquanto a formação exógena de ROS é normalmente associada ao tabagismo, exposição a solventes orgânicos e à radiação ionizante como a radiação UV, raios X e raios γ . Estes tipos de radiação têm um elevado potencial de formar radicais por um mecanismo quântico de absorção de energia em moléculas o que leva à quebra de ligações, originando os respetivos radicais e à propagação dos radicais livres (72–74).

O sistema de defesa antioxidante celular, normalmente encontrado na maioria dos organismos, é composto por enzimas antioxidantes (por exemplo, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx)), outras moléculas (por exemplo, ácido lipóico, glutathione, L-arginina e coenzima Q10) e proteínas metálicas, sendo estas moléculas os antioxidantes endógenos. Mas por outro lado, existem várias moléculas antioxidantes exógenas de origem animal ou vegetal, que são adquiridas pela dieta alimentar ou por suplementação nutricional, por exemplo CBs, como CFs, betalainas, vitaminas ou carotenoides (67,72,74).

Recentemente, os CFs têm demonstrado atividades antioxidantes elevadas *in vitro*, alguns demonstrando melhores resultados que a vitamina C e os carotenoides. Verificou-se adicionalmente uma relação inversa entre o consumo de frutas e vegetais e o risco de doenças associadas ao stress oxidativo, o que é frequentemente associado aos CBs presentes nesses alimentos (72). Tem sido proposto que as propriedades antioxidantes dos CFs podem apresentar influência nos seguintes mecanismos: (1) eliminar espécies radicais como ROS; (2) suprimindo a formação de ROS por inibição de alguns enzimas ou quelantes de metais envolvidos na produção de radicais livres; (3) regulando ou protegendo os processos de formação de oxidantes (72,75).

Os CFs possuem uma estrutura química ideal para a eliminação de radicais livres, uma vez que possuem grupos hidroxilo com a capacidade de doar um átomo de hidrogénio ou um eletrão a um radical livre, e um anel aromático com capacidade de deslocalizar e estabilizar por ressonância um eletrão não emparelhado (74,75).

Os CFs podem atuar eliminando radicais livres, interferindo com a oxidação de lípidos e outras moléculas por doação rápida de um átomo de hidrogénio para estabilização dos radicais ($R\cdot$) (74,75).



Os intermediários de radicais fenóxi (FO) são relativamente estáveis devido à ressonância, por consequência, uma nova cadeia de reação não é facilmente iniciada. Além disso, os intermediários de radicais fenóxi também atuam como terminadores na fase de propagação reagindo com outros radicais livres (74,75).



Por sua vez, as betalaínas são CBs que também demonstraram elevada atividade antioxidante, e em alguns casos superior a alguns CFs (76), no entanto o mecanismo de estabilização dos radicais livres ainda não se encontra completamente descrito (77). No entanto, existem vários estudos que demonstraram que as betalaínas são moléculas eficazes na captação de radicais livres, também conseguem prevenir a oxidação desencadeada pelas ROS e a oxidação mediada pelos radicais livres (78).

Atualmente, a maior parte dos antioxidantes usados em preservação de alimentos são produzidos sinteticamente, como é o caso do butil-hidroxianisol (BHA) e o butil-hidroxitolueno (BHT), todavia, devido à sua toxicidade e pelo facto de serem menos potentes do que os agentes antioxidantes naturais (79), estes têm sido cada vez menos utilizados. Neste sentido, os CBs de origem natural são uma das classes de antioxidantes com maior interesse pela comunidade científica (75).

1.3.2. Potencial de inibição do enzima acetilcolinesterase (AChE)

O acetilcolinesterase (AChE) é o enzima responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh), com a atividade de esterase, encontra-se localizada nas fendas sinápticas do sistema nervoso central e periférico. O enzima AChE termina a propagação dos impulsos nervosos por catalisar a hidrólise da acetilcolina (ACh) (Figura 1.18 à esquerda), um neurotransmissor do sistema colinérgico, que, entre outros papéis está envolvido na formação de memória (80,81).

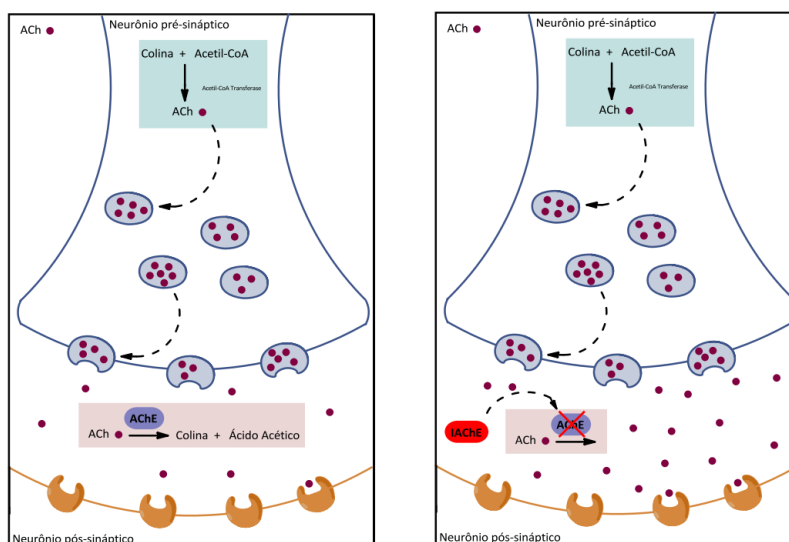


Figura 1.18. Sinapse colinérgica na ausência e na presença de um inibidor da AChE (IAChE), retirado de (81).

Os inibidores da acetilcolinesterase (AChEI) são usados clinicamente para terapia de várias patologias, incluindo *miastenia gravis*, glaucoma, demência e doença de Alzheimer. O tratamento com inibidores da AChE baseia-se no bloqueio do enzima, impedindo a hidrólise da ACh, assim, este neurotransmissor tende a permanecer ativo por um período de tempo maior

nas sinapses colinérgicas, fato que incrementa a transmissão colinérgica (Figura 1.18 à direita). Para ser eficaz, os inibidores devem ligar-se reversivelmente ao local ativo do enzima, pois a ligação irreversível pode levar a consequências graves, incluindo a morte (80,81). Os carbamatos e organofosforados são classes de pesticidas capazes de inibir irreversivelmente o AChE (81).

Diante da importância da AChE como alvo para moléculas bioativas, a avaliação do potencial destas moléculas inibirem a AChE apresenta grande relevância para o desenvolvimento de novos fármacos (80). Os CBs de origem vegetal têm demonstrado resultados promissores sobre o enzima AChE (82–84). Este fato, parece estar relacionado com a sua capacidade de ligação ao centro ativo do enzima, sem promover alterações na sua estrutura terciária. Como exemplo, o flavonol quercetina foi reportado a capacidade de estabilizar por pontes de hidrogénio nos resíduos de aminoácidos no centro ativo da AChE (80).

1.3.3. Potencial citotóxico em culturas de células humanas

A exposição a substâncias tóxicas para o organismo, como certos contaminantes, pode ser diretamente associada à morte celular, quer por apoptose quer por necrose, sendo que estas substâncias dizem-se ter propriedades citotóxicas (85,86).

Métodos de cultura celular permitem avaliar a citotoxicidade *in vitro* de um composto ou extrato usando uma determinada linha de células especializadas. A utilização deste tipo de métodos é comum e permite avaliar as concentrações máximas do(s) composto(s) ou extratos que podem ser utilizados em segurança sem serem biologicamente prejudiciais. Ou seja, através desta metodologia é possível avaliar a partir de que concentrações os compostos apresentam citotoxicidade para as células. É necessário realçar que o termo citotoxicidade está relacionado com o efeito de agentes químicos sobre a morfologia celular, a falha de aderência das células à superfície da microplaca e pelas mudanças na taxa de crescimento celular, morte celular e desintegração celular, o que resulta numa diminuição da viabilidade celular (86).

1.4. Métodos de extração dos compostos bioativos (CBs) de plantas

Tal como referido, os CBs apresentam efeitos positivos na saúde humana, tanto na forma isolada como em extratos, por esta razão podem ser utilizados como suplementos alimentares (alimento funcional) ou nutracêuticos. Para isso, é necessário um método eficiente e económico para extração e separação de CBs. A extração e o isolamento destes compostos continua a ser um desafio, especialmente devido à sua complexidade estrutural e instabilidade por degradação ou reação durante o processamento (2,37).

Neste sentido, a eficiência da extração de CBs do material vegetal pode ser influenciada por diversos parâmetros, nomeadamente devido à diversidade estrutural dos CBs, o seu comportamento físico-químico, como solubilidade ou a natureza de interações que estes compostos podem exibir em diferentes condições pode ser muito divergente (18), mas também é importante ter em consideração a localização do CBs na matriz vegetal (2,36,87).

Os CBs nas plantas podem encontrar-se distribuídos a nível celular essencialmente nas paredes celulares e vacúolos (88). Além disso, a maioria dos CBs em fontes vegetais está associada a outros compostos presentes no vegetal por ligação covalente, tornando-se um verdadeiro desafio extraí-los na sua forma estável (2,89).

Os métodos convencionais de extração de compostos baseiam-se numa extração sólido-líquido com vários solventes (90). No entanto, estão em desenvolvimento algumas técnicas modernas, como a extração assistida por ultrassons (UAE) (18,91), a extração assistida por micro-ondas (MAE) (18,91), a extração acelerada por solventes (ASE) (18,92), a extração assistida por campo elétrico pulsado (ECEP) (18,93) e a extração supercrítica (ESC) (18,94) e extração assistida por enzimas (EAE) (18,95).

1.4.1. Processamento da matéria-prima de origem vegetal

A primeira etapa para a extração de CBs de uma matriz vegetal consiste na preparação das plantas de forma a preservar a sua composição. Os CBs podem encontrar-se nas folhas, cascas, raízes, frutas e flores e podem ser extraídos a partir de plantas frescas ou secas. Poderá ser efectuada uma pré-preparação dos materiais vegetais como trituração e secagem, sendo que estes aspetos influenciam na preservação de CBs nos extratos finais (96).

1.4.1.1. Plantas frescas vs secas

Na maioria dos casos, as plantas secas são selecionadas considerando o tempo necessário para o início do trabalho experimental. Em plantas frescas, existem estudos que limitam o intervalo entre a colheita e o trabalho experimental no período máximo de 3 horas para garantir a frescura das plantas, uma vez que estas são frágeis e tendem a deteriorar-se mais rapidamente do que as amostras secas (96,97).

1.4.1.2. Plantas trituradas vs pulverizadas

A redução do tamanho de partícula aumenta o contato superficial entre a planta e os solventes usados na extração. A trituração resulta em amostras grosseiras, enquanto as amostras pulverizadas apresentam uma partícula homogénea e com menores dimensões, proporcionando um melhor contato superficial com solventes de extração. Esta etapa é particularmente importante, já que, para que uma extração eficiente ocorra, o solvente deve estar em contato com os compostos de interesse. O tamanho de partícula menor de 0.5 mm é ideal para uma extração eficiente (96,98).

1.4.1.3. Secagem das amostras de plantas: ao ar, no micro-ondas, no forno e liofilizadas

Em caso de secagem de plantas, a secagem ao ar pode levar de 3-7 dias, meses ou até um ano, dependendo dos tipos de amostras secas (por exemplo, folhas ou sementes). Este método de secagem não utiliza temperaturas elevadas, assim, os compostos termolábeis são preservados. Mas a secagem ao ar apresenta um tempo de secagem prolongado, e as amostras ficam sujeitas a contaminação devido à instabilidade da temperatura e à acção da humidade (96).

A secagem por microondas usa radiação eletromagnética que possui campos elétricos e magnéticos. O campo elétrico provoca o aquecimento simultâneo através da rotação dipolar, alinhamento no campo elétrico das moléculas que possuem um momento de dipolo permanente ou induzido (por exemplo, solventes ou amostras) e indução iónica, pode produzir oscilação das moléculas (96,99). A oscilação provoca colisões entre moléculas e resulta no aquecimento rápido da amostra. Este método diminuiu o tempo de secagem, mas às vezes provoca a degradação de alguns CBs presentes (96).

A secagem no forno é um outro método que usa energia térmica para remover a humidade das amostras. Este tipo de procedimento térmico para preparação da amostra é considerada a mais simples e rápida, mas não garante a preservação de compostos sensíveis a temperaturas elevadas (96).

A secagem por liofilização utiliza o princípio da sublimação, este é um processo em que a água congelada no material passa diretamente da fase sólida para a fase gasosa sem passar pela fase líquida. Para tal, a amostra é congelada entre -80 °C e -20 °C antes de ser liofilizada. A secagem por liofilização garante a preservação da maioria dos CBs, e consequentemente permite que maior quantidade destes compostos se mantenham inalterados. No entanto, este método é complexo e dispendioso, sendo a sua utilização normalmente restrita a materiais delicados e sensíveis ao calor (96).

1.4.2. Métodos de extração convencionais em plantas

A extração é a separação de frações ativas contendo os compostos presentes na planta usando solventes. A finalidade da extração é separar os metabolitos da planta deixando como resíduo, a matriz celular insolúvel (96). Os métodos de extração convencionais serão descritos de seguida.

1.4.2.1. Maceração, infusão, percolação e decoção

A maceração é a técnica utilizada na produção de vinho e tem sido adotada e amplamente utilizada no estudo de plantas medicinais. A maceração envolve a imersão dos materiais vegetais (pré-preparados ou não) num recipiente com um solvente à temperatura ambiente por um período mínimo de 3 dias com agitação frequente. Este procedimento destina-se a suavizar e quebrar a parede celular da planta de forma a permitir a libertação dos CBs. Após 3 dias, a mistura é pressionada por filtração. Neste método convencional a escolha dos solventes determinará o tipo de composto extraído das amostras (96).

A infusão e a decoção utilizam o mesmo princípio que a maceração, em ambos o material vegetal é imerso em água fria ou a ferver. Na técnica de infusão o material vegetal fica em contato com o solvente quente durante um período de tempo inferior à técnica de maceração. Enquanto que na técnica de decoção o material vegetal fica a ferver num volume específico e por um tempo definido. A decoção habitualmente é utilizada na extração de compostos estáveis ao calor ou materiais de plantas duras (por exemplo, raízes e cascas) (96).

A técnica de percolação permite obter uma extração com elevada eficiência e consiste na utilização de um solvente à temperatura ambiente que mantém contato estático ou dinâmico com o material vegetal em recipiente adequado, o percolador; este permite a otimização da extração com o controlo do caudal e variação dos solventes utilizados. Depois da extração concluída efetua-se a evaporação do solvente para obter extratos concentrados (91,96,100).

Estas técnicas são métodos fáceis e simples, no entanto são produzidos um grande volume de resíduos sendo necessário uma gestão adequada dos resíduos. Na infusão e decocção utilizam água como solvente, no entanto a eficiência da extração dos CBs utilizando estas técnicas pode ser otimizada variando o volume de solvente, duração da extração e temperatura aplicada à extração em particular na técnica de decocção (94).

1.4.2.2. Extração de Soxhlet ou extração contínua quente

Neste método, a amostra finamente moída é colocada num recipiente poroso com um papel de filtro. Os solventes da extração são aquecidos no balão inferior, vaporizando para a amostra, condensam no condensador e o extrato vai gotejando para um balão inferior, sendo aqui recolhido (96).

Este método é vantajoso porque necessita de quantidade inferior de solvente em comparação com as técnicas de extração por imersão (100). No entanto, a extração de Soxhlet possui a desvantagem da exposição a solventes orgânicos líquidos perigosos e inflamáveis, com potenciais emissões tóxicas durante a extração. Por esta razão, este procedimento é considerado perigoso para o meio ambiente e pode contribuir para a problemática da poluição. Os solventes usados neste sistema da extração precisam de ser de elevada pureza, o que o torna mais dispendioso. A amostra ideal para uma extração de Soxhlet é limitada a um sólido seco e finamente dividido, também as condições da extração têm ser consideradas como a temperatura, relação solvente-amostra e velocidade de agitação (96,101).

1.4.3. Métodos de extração inovadores em plantas

Recentemente, têm-se verificado uma crescente procura por novas técnicas de extração que sejam mais “amigas” do ambiente, rápidas e eficientes do que os métodos tradicionais de extração.

Os métodos de extração inovadores de CBs em plantas apresentam-se vantajosos relativamente aos métodos de extração convencionais, em função do tempo de extração, consumo de solventes, rendimentos de extração e reprodutibilidade. No entanto, é necessário efetuar uma avaliação detalhada dos custos de produção para desenvolver estes métodos a nível industrial (90).

Dentro dos métodos de extração de CBs inovadores de materiais vegetais encontram-se alguns dos métodos mais estudados: extração assistida por ultrassons (UAE), extração assistida por micro-ondas (EMO), extração acelerada por solvente (ASE), extração supercrítica (ESC) e extração assistida por enzimas (EAE). Estes métodos apresentam eficiências elevadas de

extração de CBs, no entanto apresentam custos elevados devido aos equipamentos necessários para a sua aplicação (2,96).

1.4.3.1. Extração assistida por ultrassons (UAE)

A UAE envolve a utilização de ultrassom variando a frequência entre 20 kHz a 2000 kHz. Este método é reconhecido por facilitar a extração de CBs de plantas usando solventes líquidos. O efeito mecânico da cavitação acústica do ultrassom aumenta o contato superficial entre solventes com as amostras. As propriedades físico-químicas das amostras vegetais submetidos a ultrassons são alteradas e a parede celular da planta é destruída, libertando o seu conteúdo intracelular. Desta forma, melhora a transferência de massa permitindo assim uma melhor eficiência de extração dos CBs (96,102). A eficiência da UAE não é apenas afetada pelo tempo, mas também pela temperatura, tipo de solvente utilizado, frequência dos ultrassons e da distribuição dos CBs na matriz celular (91). Esta técnica é um dos procedimentos de extração mais simples e rápido, pode ser aplicada em pequena e grande escala na extração de CBs de plantas, e comparativamente aos outros processos de extração não convencionais necessita de equipamento de menor custo (18).

1.4.3.2. Extração assistida por micro-ondas (MAE)

As micro-ondas são campos eletromagnéticos na faixa de frequência de 300 MHz a 300 GHz (91). Ao contrário do aquecimento convencional, o aquecimento por micro-ondas resulta da rotação do dipolo (das moléculas) e da condução iónica (migração de iões). Para que o mecanismo de aquecimento seja eficaz, os compostos de interesse e o solvente utilizado na extração têm de possuir um momento dipolar. Durante a extração, o solvente é aquecido assim como a água presente no interior das células vegetais; este aquecimento gera uma pressão na parede celular que leva à sua rutura e consequente libertação do conteúdo intracelular (90,91,103). Este tipo de extração em plantas demonstrou a capacidade de melhorar o rendimento e diminuir o tempo da extração (90,104).

1.4.3.3. Extração acelerada de solvente (ACE)

A extração acelerada por solvente (ACE), também conhecida por extração líquida pressurizada (PLE), é um tipo de extração que se baseia no uso de solvente a elevada pressão e temperatura. A ACE pode ser utilizada em modo estático ou dinâmico, ou numa combinação de ambos. A diferença prende-se com o facto de no modo dinâmico o solvente ser continuamente adicionado à amostra vegetal, ao contrário do modo estático onde a quantidade de solvente é mantida constante. A escolha do solvente de extração é também um parâmetro crucial, devendo escolher-se um solvente capaz de solubilizar os compostos de interesse e que, ao mesmo tempo, minimize a coextração de outros componentes da matriz (92). Esta técnica depende criticamente do tipo de solvente selecionado, pressão e temperatura aplicada (92,96).

As vantagens da ACE em relação aos procedimentos de extração convencionais incluem a rapidez, facilidade e seletividade do processo de extração, bem como o reduzido consumo de

solvente e a elevada eficiência do processo. A principal desvantagem é o custo elevado do equipamento (92,96).

1.4.3.4. Extração com fluidos supercríticos (SFE)

A SFE consiste na utilização de um solvente que partilha as propriedades físicas de gás e líquido no seu ponto crítico e apresenta a capacidade de solubilizar numa vasta gama de compostos. Os fatores como temperatura e pressão são os determinantes que deslocam uma substância para sua região crítica. Um exemplo de um fluido supercrítico é CO₂, apresenta estas características acima de 31.1 °C e 7380 kPa (90,96,104) .

O uso da SFE permite reduzir o consumo de solventes tóxicos, aumentar a seletividade e reduzir o tempo de extração, sem comprometer a eficiência do processo. Além destes aspetos, a utilização da SFE permite evitar a degradação de CBs, uma vez que a matriz não é exposta à luz ou ao ar (94). A sua grande desvantagem é sem dúvida o elevado investimento inicial no equipamento. (90,96,104).

1.4.3.5. Extração assistida por enzima (EAE)

A EAE é outra técnica de extração inovadora desenvolvida para diminuir a utilização de solventes, reduzindo o impacto ambiental e consumo energético. Este método inovador de extração baseia-se no aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática e da parede celular das células vegetais através da ação hidrolítica das enzimas (α -amilases, celulasas, pectinases e proteases), que auxiliam na extração dos compostos de interesse, tais como pigmentos naturais, polissacarídeos e CBs. Este tipo de extração permite o uso de uma solução aquosa e condições de processamento suave para obter um extrato com aplicações industriais. Os enzimas mais utilizados são principalmente derivados de microrganismos, mas também podem ser obtidos a partir de plantas e animais (104,105).

Existem duas abordagens para a EAE: prensagem a frio assistida por enzima e extração aquosa assistida por enzima. A capacidade seletiva dos enzimas para catalisar reações e sua adaptabilidade a condições aquosas suaves torna esta técnica muito promissora para a extração de CBs das plantas. Verifica-se um aumento de estudos com a utilização da EAE, estes demonstram que seu uso pode levar a rendimentos mais elevados, minimização do tempo de processo e menor consumo de solventes (90,104). A EAE é reconhecida como uma tecnologia ecológica para a extração de CBs e compostos lipofílicos porque utiliza água como solvente em vez de solventes orgânicos. (104).

1.4.4. Processos de separação e purificação de compostos bioativos (CBs) a partir de extratos de plantas

Os extratos de plantas podem apresentar diferentes tipos de compostos para além dos CBs. Assim, torna-se relevante a aplicação de metodologias que permitam a obtenção de frações do extrato enriquecidas nos seus CBs e a eliminação de outros interferentes. A purificação e separação dos CBs em extratos de plantas podem ser realizadas principalmente por

procedimentos em fase sólida, líquido-líquido ou utilizando a tecnologia de filtração por membranas (18).

A purificação por processos em fase sólida, também denominada de processo líquido/sólido é um dos procedimentos comumente utilizados para remoção de interferentes em extratos, concentração e isolamentos de CBs presentes em matrizes complexas (18,106). Esta técnica pode ser descrita como uma aplicação convencional de cromatografia líquida de adsorção, e envolve a retenção seletiva de compostos num enchimento presente em colunas de pequenas dimensões. Assim é possível separar os compostos de interesse da matriz vegetal, pela retenção seletiva dos compostos interferentes ou dos CBs de interesse na fase estacionária. Antes de proceder à separação é necessário ter em consideração alguns parâmetros, entre os quais, a escolha da fase estacionária, volume de amostra e de solvente necessário para ativação da fase estacionária e para a eluição dos analitos. É um método rápido e relativamente barato para o isolamento de CBs (18,107).

O processo em fase sólida é habitualmente utilizado devido às suas vantagens em relação aos processos de líquido-líquido. Os métodos de purificação de fase sólida são mais fáceis para automatizar com outros sistemas, como o acoplamento *on-line* de colunas analíticas. A principal desvantagem deste método é a restrição da dimensão da amostra, de modo, que um grande volume de amostra dificilmente poderá ser processado por este método (18).

O processo de separação líquido-líquido é um procedimento utilizado normalmente na purificação de CBs de extratos de plantas. A separação líquido-líquido dos CBs baseia-se no princípio da separação entre dois líquidos imiscíveis, e que as fases móveis podem geralmente usar um solvente auxiliar miscível para melhorar a transferência de o composto de interesse entre os dois líquidos imiscíveis (18).

A purificação de fase líquida-líquida apresenta desvantagens sobre o processo em fase sólido, tal como o consumo de um elevado volume de solventes e poder necessitar de etapas da evaporação para remover o solvente adicional. A principal vantagem deste método é a capacidade de separação de amostras de volume elevado (18).

O processo de separação baseado na tecnologia de membranas é bastante utilizado à escala industrial em diversos setores, nomeadamente na indústria química, alimentar e farmacêutica, biotecnologia, medicina e no tratamento de águas industriais (108,109). Em particular, na área da biotecnologia é aplicada na recuperação de bioprodutos de valor acrescentado (proteínas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos, CBs, etc.) (110,111).

Os processos de separação acima mencionados utilizam solventes orgânicos que poderão ser potencialmente tóxicos para a saúde humana, no entanto, a tecnologia de membranas não utiliza solventes adicionais, ocorrendo a separação dos CBs do extrato usando membranas artificiais (2). O método de separação da membrana é vantajoso, pois é um sistema que apresenta um tempo de vida longo, é possível a aplicação em grande escala e estas tecnologias têm custos de capital e de funcionamento inferiores aos dos processos de separação clássicos (18).

1.5. Processos de separação com membranas

O processo de filtração com membranas é particularmente interessante para separar e concentrar compostos bioativos (CBs) a partir de soluções aquosas, como por exemplo: extratos de frutas ou vegetais, águas residuais do processos da indústria alimentar ou agrícola (112). Esta tecnologia de separação apresenta uma elevada eficiência de separação, um *scale-up* fácil, um modo operação simples e uma produtividade elevada (21,113). E, comparativamente a tecnologias convencionais de separação, não utiliza processos físico-químicos, biológicos ou térmicos capazes de modificar os componentes presentes no extrato (114).

Este processo de permeação é definido como a separação de dois ou mais componentes presentes numa corrente de alimentação através de uma membrana. A permeação com escoamento frontal “*dead-end*” (Figura 1.19, a)) aplica-se geralmente à separação de solutos que se encontram em suspensão em correntes líquidas ou gasosas e para pequenas escalas. A permeação com escoamento tangencial (“*cross flow*”) (Figura 1.19, b)) alarga esta aplicação para incluir a separação de solutos dissolvidos em correntes líquidos e na separação de misturas gasosas, com a mais valia de poder ser utilizada em grandes escalas (115,116).

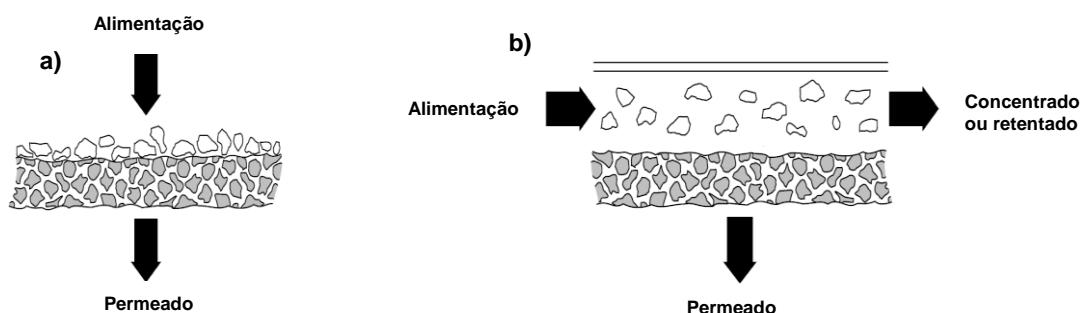


Figura 1.19. Representação esquemática do a) permeação com escoamento frontal “*dead-end*” e b) permeação com escoamento tangencial (“*cross flow*”), adaptado de (117).

A membrana é definida como uma barreira permeável ou semipermeável e seletiva, que restringe o transporte de solutos de uma forma específica, permitindo a separação dos solutos em suspensão e dissolvidas na alimentação (118). As forças motrizes que permitem esta separação podem ser o gradiente de pressão (ΔP), de concentração (ΔC), de temperatura (ΔT) e de potencial elétrico (ΔE) (111).

Na Figura 1.20 encontra-se representado o processo de separação por membranas. A corrente de alimentação com uma determinada concentração de solutos, é alimentada em escoamento tangencial ao longo da superfície da membrana e divide-se em duas correntes, o concentrado ou retentado e o permeado. A corrente do concentrado é essencialmente constituída por solutos rejeitados pela membrana, cuja concentração no concentrado é superior à concentração do soluto na alimentação, enquanto a do permeado é constituída por solvente e solutos que permearam através da membrana (111).

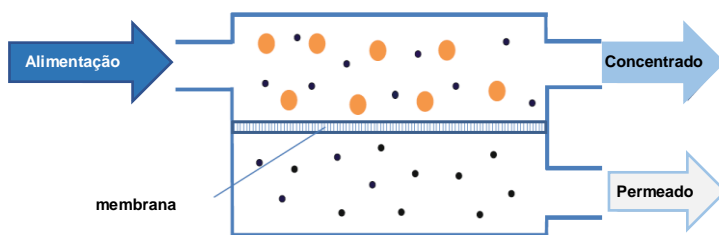


Figura 1.20. Mecanismo de separação de membrana, adaptado de (21).

A seleção de um sistema da membrana específico depende de diversos aspetos que incluem entre outros, o custo e a resistência da membrana (21).

As propriedades da alimentação, da membrana, bem como as condições de operação, como a força motriz (habitualmente o gradiente de pressão) aplicada, velocidade e temperatura de fluxo tangencial, são todos os parâmetros que afetam desempenho da membrana (21).

1.5.1. Classificação das membranas

De um modo geral, as membranas utilizadas podem ser classificadas de acordo com a sua natureza e estrutura ou morfologia, mecanismo de separação e aplicação, como ilustrado na

Figura 1.21.

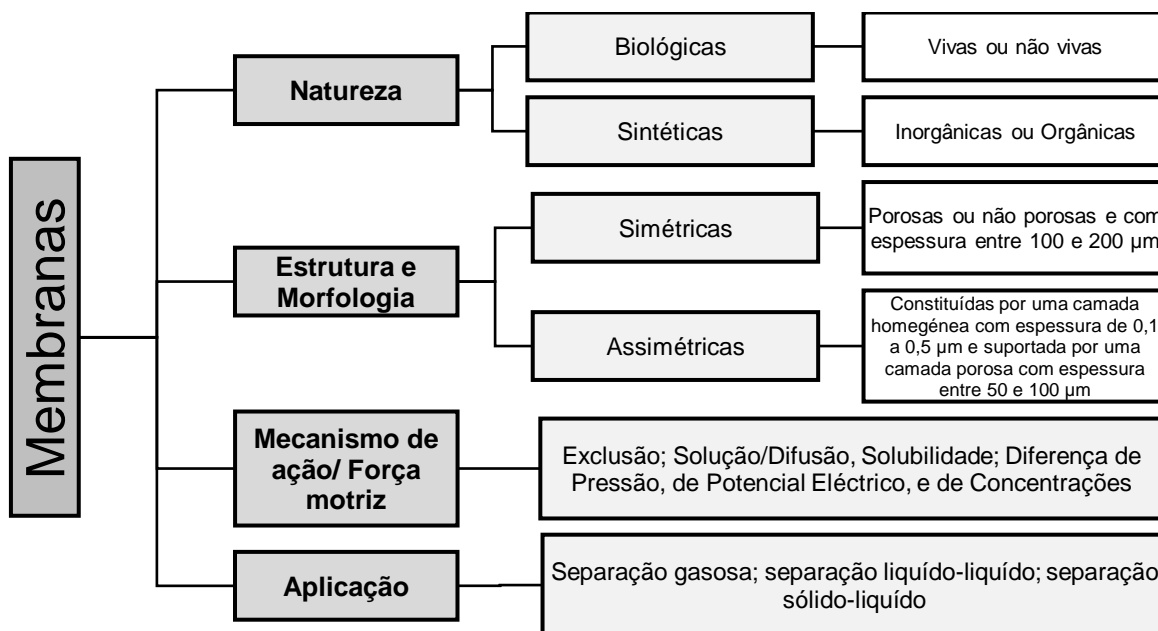


Figura 1.21. Classificação das membranas, adaptado de (115,119).

Relativamente ao tipo de material que as constituem, podem ser orgânicas ou inorgânicas. As membranas orgânicas são normalmente composto por polímeros, tais como: acetato de celulose, poliamida, polissulfona e polipropileno. As inorgânicas, são comercializadas desde 1980, devido às suas vantagens de elevada força mecânica e estabilidade térmica e química, mas por outro lado apresentam uma elevada fragilidade podendo ser facilmente danificadas. As membranas utilizadas neste trabalho experimental foram membranas orgânicas de acetato de celulose.

A morfologia da membrana refere-se à quantidade, tamanho e distribuição dos poros na estrutura da membrana (108,120,121). As membranas simétricas podem ser porosas (heterogéneas) ou não porosas (homogéneas). As membranas homogéneas são constituídas por filmes densos que permitem a separação de moléculas de dimensões semelhantes e que apresentam solubilidades muito diferentes na matriz da membrana, logo a força motriz é por solução/difusão e, portanto, a afinidade com a partícula de interesse é fundamental (21,120,121).

Enquanto, as membranas assimétricas apresentam uma estrutura diferente no topo e na base, sendo que a porosidade, o tamanho dos poros e a composição química podem ser diferentes ao longo da estrutura. Estas podem ser classificadas como membranas assimétricas integrais ou compostas. A camada superior, designada por “pele” ou camada seletiva, é, por regra geral, muito fina, com espessuras entre os 0.1-1 μm . A camada de suporte onde está assente a “pele” é caracterizada por uma elevada porosidade e a sua espessura pode variar entre os 100 e os 200 μm . Atualmente, estas membranas são utilizadas em métodos de separação, como a ultrafiltração (UF), a nanofiltração (NF) ou a osmose inversa (OI), devido às boas capacidades de permeação, aos elevados coeficientes de rejeição e à boa resistência mecânica (122).

A nível industrial, as membranas sintéticas são embaladas em dispositivos chamados módulos de membrana, e estão geralmente disponíveis em quatro configurações básicas: em módulos planos, módulos tubulares, módulos de fibra ocas e módulos enrolados em espiral (21,120,121).

Tal como referido anteriormente, o transporte de solutos através da membrana é conseguido por aplicação de uma força motriz – gradiente de pressão, concentração, potencial elétrico ou temperatura – através da membrana (119). Ao aplicar uma diferença de pressão num processo de filtração por membrana verifica-se que existe uma diferença de pressão entre a alimentação e o permeado, sendo denominada por pressão transmembranar (PTM) (114). A separação baseia-se principalmente no tamanho molecular, forma molecular, carga e hidrofobicidade dos solutos (21,123).

A classificação dos processos de filtração por membranas que utilizam como força motriz o gradiente de pressão são a microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e a osmose reversa (OI). Esta classificação permite identificar o intervalo do tamanho dos poros das membranas, como descrito na Tabela 1.1 (21,124).

Para o presente trabalho, utilizaram-se cinco membranas assimétricas de acetato de celulose com diferentes porosidades, uma vez que permitem a remoção de sólidos suspensos e fracionamento de compostos bioativos com diferentes massas moleculares. De acordo com *Bernardo et al* (125) foi possível a preparação das membranas de UF que conseguiam separar compostos dissolvidos com massas moleculares compreendidas entre 3800 Da e 45000 Da (125). As membranas de UF foram preparadas através de método da Inversão de Fases.

Tabela 1.1. Características mais relevantes dos processos na tecnologia por membranas cuja força motriz é o gradiente de pressão, adaptado de (115,117).

Processo	Força Motriz (ΔP)	Tipo de Membrana	Método de Separação	Aplicações
Microfiltração (MF)	0,1 – 1 atm	Microporosa (0.1–10 μm)	Filtração	Esterilização; Clarificação;
Ultrafiltração (UF)	0,5 – 5 atm	Assimétrica Microporosa (0.05–0.5 μm)	Filtração	Separação de macromoléculas em solução; Recuperação de óleos/pigmentos;
Nanofiltração (NF)	10 – 40 atm	Assimétricas Filme denso (0.001–0.01 μm)	Filtração Solução/ Difusão	Separação parcial de sais e solutos orgânicos com menos de 1 kDa; Purificações de resinas;
Osmose inversa (OI)	20 – 100 atm	Assimétricas Filme denso	Solução/ Difusão	Separação de sais e micro-solutos; Dessalinização de águas;

1.5.1.1. Método de Inversão de Fases

Neste método, o tipo de estrutura obtido para as membranas está dependente do processo de fabrico utilizado, podendo recorrer-se a processos tais como: sinterização, estiramento, irradiação-corrosão e inversão de fases (119,124,126).

O método atualmente mais utilizado para a preparação de membranas assimétricas, quer a nível industrial, quer laboratorial, é o método de inversão de fases e do qual constam as seguintes etapas (119,126):

- 1) Preparação da solução polimérica;
- 2) Espalhamento da solução polimérica num suporte apropriado (placa de vidro) com vista à obtenção de um filme de espessura pré-definida;
- 3) Evaporação parcial do solvente durante um tempo definido;
- 4) Coagulação do filme polimérico num banho de gelificação (água entre 0-3°C) e obtenção da membrana (117,126).

No método de inversão de fases, a solução polimérica (de partida) consiste num polímero e num sistema de solventes que é formado, por um solvente forte e um solvente fraco, também denominado não-solvente ou aditivo, sendo este último responsável pela formação dos poros. A porosidade varia diretamente com o aumento de concentração do não-solvente (119,126).

1.5.1.2. Modo de Operação

O modo de operação da tecnologia de membranas pode ser efetuada através de diversas formas como: modo de recirculação total, modo de concentração ou por diafiltração (118).

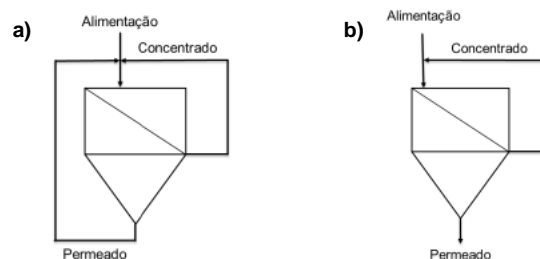


Figura 1.22. Esquema do **a)** modo de recirculação total e **b)** em modo de concentração, retido de (118).

O modo de recirculação total (Figura 1.22, a)) é realizado quando tanto a corrente de permeado como a de concentrado, são recirculadas para o tanque de alimentação. Enquanto no modo de concentração (Figura 1.22, b)) apenas a corrente de concentrado é recirculada para o tanque de alimentação assim, a corrente do permeado é recolhida, sendo esta composta pelos solutos de dimensões que conseguiram atravessar a membrana (118).

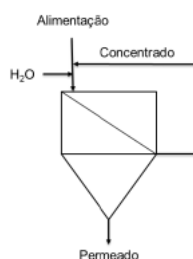


Figura 1.23. Esquema do modo de diafiltração, retirado de (118).

Por outro lado, o modo de diafiltração (Figura 1.23) é parecido ao modo de concentração, com a particularidade da adição à alimentação de água destilada em volume igual ao recolhido na corrente de permeado. Este modo de operação permite a remoção da corrente de permeado de todos os compostos com a capacidade de atravessar a membrana, assim na alimentação ficam apenas os compostos com maiores dimensões (118).

Neste trabalho experimental optou-se pelo modo de recirculação total, para o seu desenvolvimento, pois pretendia-se efetuar o estudo da identificação e quantificação dos CBs presentes no permeado com a variação do limite de exclusão molecular (MWCO) das membranas preparadas.

1.5.2. Caraterização das Membranas

Os processos de separação por membranas podem ser utilizados numa grande variedade de soluções. Assim, a caraterização das membranas revela-se de uma elevada importância uma vez que irá facultar dados relativos à morfologia e propriedades físico-químicas das mesmas, fornecendo informações que permitem a seleção de uma membrana para a resolução de um problema específico. Para caraterizar as membranas preparadas recorrem-se aos seguintes parâmetros: permeabilidade hidráulica (L_p), coeficiente de rejeição aparente (f) e limite de exclusão molecular (MWCO) (119).

1.5.2.1. Permeabilidade hidráulica (L_p)

A permeabilidade hidráulica (L_p) consiste na capacidade de permeação de uma membrana à água pura, representando a quantidade de água permeada por unidade de tempo, por unidade de área superficial de membrana e por unidade de pressão transmembranar (PTM). A determinação experimental da permeabilidade hidráulica é determinada através da representação gráfica do fluxo volumétrico de permeado (J_p) em função da PTM aplicada (ΔP) de acordo com a Equação 1.1 (119,126,127).

$$J_p = L_p \times \Delta P \quad \text{Equação 1.1}$$

Como o fluxo pode ser afetado pela temperatura, é necessário realizar a normalização do fluxo para a temperatura de 25 °C, uma vez que a temperatura não é constante ao longo de todo o processo de filtração. Para tal utiliza-se a Equação 1.2 em que a variação da viscosidade é tida em conta e em que a T_{ensaio} corresponde à temperatura que o ensaio foi realizado (126).

$$J_p(25^\circ\text{C}) = \frac{J_p(T_{\text{ensaio}})}{0.901} \times^{-6.96 + \frac{2044}{273.15 + (T_{\text{ensaio}})}} \quad \text{Equação 1.2}$$

Assim é possível determinar o declive da representação linear (Figura 1.24), sendo este valor correspondente à permeabilidade hidráulica da membrana, L_p (126).

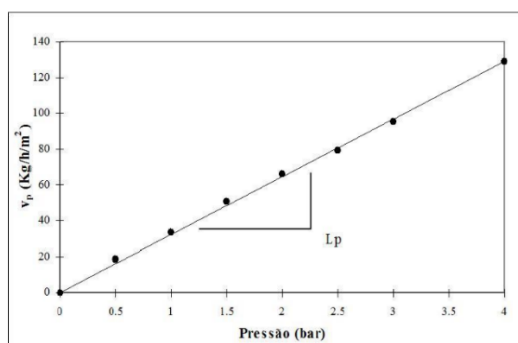


Figura 1.24. Representação gráfica para a determinação da permeabilidade hidráulica (L_p), retirado de (126).

1.5.2.2. Coeficiente de rejeição aparente (f)

Outro parâmetro importante para a caracterização da membrana, é a sua rejeição a sais e/ou solutos orgânicos. A rejeição aparente (f) é função da membrana, do soluto, da pressão e da hidrodinâmica do sistema. A sua determinação é efetuada a partir das concentrações do soluto na solução de alimentação e no permeado, através da Equação 1.3 (119,126–128).

$$f = \frac{C_{Ab} - C_{AP}}{C_{Ab}} \quad \text{Equação 1.3}$$

Em que, C_{Ab} representa a concentração do soluto na alimentação e o C_{AP} a concentração do soluto no permeado.

Com este parâmetro é possível determinar a percentagem de rejeição que uma membrana possui a um determinado soluto (119).

1.5.2.3. Limite de exclusão molecular (MWCO)

O MWCO é um parâmetro que está relacionado com a capacidade da membrana rejeitar solutos com uma determinada massa molecular presentes na alimentação. Sendo representado como $\log(f/(1-f))$ em função da massa molecular (MM) de diversos solutos de referência (normalmente polietilenoglicóis (PEG) e dextranos (DEX) para membranas de ultrafiltração), o MWCO é retirado da intersecção desta reta: $y = \log(f/(1-f)) = 1$, correspondendo, portanto, à massa molecular de um soluto que é rejeitado a 90.9 % (126,127), de acordo com o evidenciado na Figura 1.25.

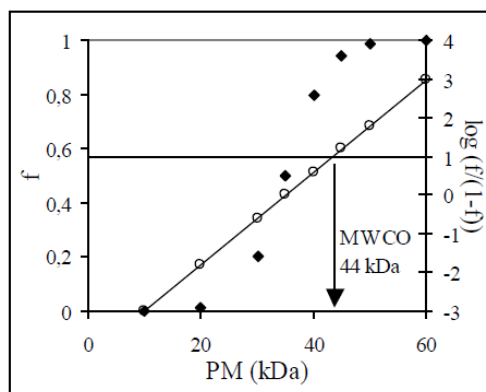


Figura 1.25. Exemplo da determinação do MWCO para uma membrana, retirado de (126).

1.5.2.4. Coefficiente de rejeição intrínseco (f') e coeficiente de transferência de massa (k)

Num ensaio de permeação com um soluto usando uma membrana seletiva poder-se-á verificar a rejeição total ou parcial do soluto pela membrana. O soluto rejeitado acumula-se na proximidade da superfície da membrana e a sua concentração, C_{Am} , é maior do que a concentração de soluto na solução da alimentação, C_{AP} . Um coeficiente de rejeição intrínseca, f' , é então definido como:

$$f' = \frac{C_{Am} - C_{AP}}{C_{Am}} \quad \text{Equação 1.4}$$

Os fatores de coeficientes de rejeição aparente (f) e intrínseco (f') estão relacionados pela seguinte equação:

$$f = \frac{f'}{f' + (1 - f') \exp\left(\frac{v_p}{D_{AW} \delta}\right)} \quad \text{Equação 1.5}$$

onde C_{AP} é a concentração de soluto no permeado, D_{AW} é a difusividade de soluto em água na camada limite de espessura δ , e v_p é o fluxo da permeação da membrana. A diferença entre os

dois coeficientes de rejeição deve-se ao desenvolvimento de um perfil de concentração na camada limite laminar de espessura δ , como mostrado esquematicamente na Figura 1.26. Um balanço de massa diferencial do estado estacionário das contribuições convectivas/difusivas nesta camada limite leva à quantificação da polarização de concentração através da Equação 1.6 (128,129).

$$\frac{C_{AM} - C_{AP}}{C_{Ab} - C_{AP}} = e^{-\frac{v_p}{D_{AW}} \delta} \quad \text{Equação 1.6}$$

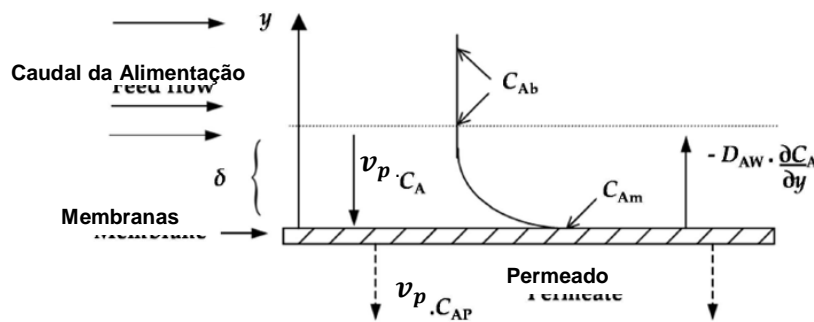


Figura 1.26. Perfil de concentração na camada limite adjacente à superfície da membrana, retirado de (128).

A teoria do filme (128,130) apresenta o coeficiente de transferência de massa, k , como:

$$k = \frac{D_{AW}}{\delta} \quad \text{Equação 1.7}$$

e substituindo a Equação 1.7 na Equação 1.6, dá:

$$\frac{C_{AM} - C_{AP}}{C_{Ab} - C_{AP}} = e^{-\frac{v_p}{k} \delta} \quad \text{Equação 1.8}$$

A Equação 1.8 descreve a polarização de concentração com recurso ao coeficiente de transferência de massa que depende da geometria do sistema e das propriedades físico-químicas da alimentação. Os coeficientes de transferência de massa são na maioria das vezes obtidos por meio de correlações empíricas do tipo:

$$Sh = \frac{k \times d_h}{D_{AW}} = a + Re^b + Sc^c \quad \text{Equação 1.9}$$

onde Sh , Re , e Sc são os números de Sherwood, Reynolds, e Schmidt, d_h é diâmetro hidráulico, e a , b , e c são coeficientes empíricos que dependem do sistema em estudo.

1.5.3. Problemática da tecnologia de membranas

Os principais problemas com a implementação de uma separação de um extrato aquoso por tecnologia de membranas são a ocorrência dos processos de colmatção e/ou de polarização de concentração (21,109,121), entre outros, que estão descritos resumidamente na Tabela 1.2

Os processos de separação que utilizam como força motriz o gradiente de pressão estão mais sensíveis a desenvolver problemas relacionados com a colmatção e/ou polarização de concentração nas membranas (109). Verifica-se, também, que nas membranas de porosidades menores estes processos representam menor influência sobre o desempenho da membrana (21). No entanto, verifica-se que com a diminuição da PTM é possível minimizar estes fenômenos (128,131,132).

Tabela 1.2. Fatores que afetam o desempenho da membrana, adaptado de (121,133).

Fator	Causa	Métodos de Redução
Colmatção da membrana	Solutos ou partículas depositam-se na superfície da membrana ou nos poros	Pré-tratamento da água de alimentação (por exemplo, coagulação, adsorção e pré-oxidação) e modificação hidrofílica de membrana
Polarização de concentração	Uma camada limite de transferência de massa formada na vizinhança da membrana devido à acumulação de solutos	Aumento da turbulência do fluido para diminuir a espessura da camada limite, como aumento do caudal da alimentação ou diminuição da PTM
Compressão e compactação de membrana	Temperaturas e pressões excessivas	Ajuste da temperatura e pressão da alimentação
Deterioração hidrolítica da membrana	Sistema de operação fora dos níveis de tolerância do pH da membrana, ataque biológico e químico e exposição ao cloro	Ajuste do pH da alimentação

1.5.4. Aplicação da tecnologia de membranas na separação e purificação de compostos bioativos (CBs)

A tecnologia de membranas tem sido aplicada com sucesso na separação e concentração de CBs em extratos vegetais aquosos (21), tratamento e recuperação de compostos fenólicos (CFs) de águas residuais das indústrias do azeite (2,113,134–136), da cortiça (125,137), do vinho (113,131,138,139) e dos laticínios bem como do soro de leite (21,140). A UF com membranas semipermeáveis é considerada um método fácil e rápido para a separação e concentração de CBs de diferentes tipos e massas moleculares num extrato aquoso (18).

A separação e purificação de CBs através da tecnologia de membranas é um tema de interesse para os investigadores, pois tem-se verificado um aumento de estudos sobre esta temática (21).

A tecnologia de membranas foi aplicada na concentração de soluções de CFs de sementes de uva com membranas de UF com MWCO de 50 kDa (2,138). De facto, os diferentes métodos de extração resultam num produto final com quantidades diferentes de conteúdo de CFs, mesmo assim foi possível recuperar 40 a 50 % de CFs nos permeados comparativamente às alimentações (141). Noutro estudo, foi possível a recuperação de 11 % de CFs em massa seca das sementes de uva através da combinação de duas fases, de uma extração com solventes hidroetanólicos seguida por uma recuperação dos CFs por uma membrana UF. O procedimento proporcionou elevados rendimentos de recuperação em CFs e com tempo de operação de processo de filtração por membranas mais curto (21,142).

Num extrato aquoso de folhas de *Castanea sativa* com um processo combinado de membranas de UF com diferentes MWCOs, conseguiu-se efetuar a separação e recuperação seletiva de CFs, utilizando-se a combinação de duas membranas de UF de 5 e 10 kDa obteve-se um permeado com 40 % em CFs (21,143).

Outro estudo com extratos hidroalcoólicos (50 % ou 70 % de etanol (v/v)) de folhas de *Annona muricata L.* que foram submetidos a diferentes processos de concentração com membranas (UF seguido de NF). A combinação de processos de UF e NF mostrou coeficientes de rejeição superior a 75 % a CFs. O sistema combinado de UF e NF promoveu uma redução significativa do tempo em modo de concentração dos extratos por NF, bem como os processos de colmatação das membranas, que são parâmetros importantes para efetuar o *scale-up* deste processo, indicando que esta estratégia pode aumentar a vida útil das membranas (52).

A indústria alimentar da alcachofra (*Cynara scolymus L.*) produz grandes quantidades de resíduos sólidos agrícolas (folhas, hastes, brácteas da planta de alcachofra) bem como elevada quantidade de águas residuais resultante dos processos industriais alimentares. Com a utilização de membranas de UF, com um MWCO de 150 kDa, combinadas com membranas de NF, permitiu diminuir o efeito de colmatação das membranas no processo de NF (144).

Um extrato aquoso de folhas de oliveira sofreu um processo de filtração combinado, em primeiro lugar MF (0,2 µm) permitiu a remoção da maioria dos solutos em suspensão, numa etapa seguinte de UF permitiu a remoção das moléculas maiores que 5 kDa, finalmente um processo do NF (300 Da) permitiu a concentração de fenóis totais (FT), principalmente o oleuropeína. Os resultados revelaram que uma grande fração de CFs foi recuperada na fração permeada do processo UF. O permeado da NF mostrou elevados índices de CFs, conseguindo concentrar a oleuropeína em aproximadamente 10 vezes em relação ao extrato original (145).

1.6. Beterraba

Nos últimos anos, o vegetal *Beta vulgaris L.*, também conhecido como beterraba vermelha tem atraído muita atenção como um “alimento funcional”, devido à sua capacidade de melhorar a saúde (13). As suas raízes de cor vermelha são muito populares para o consumo humano, tanto cozinhadas, cruas em salada ou até mesmo em sumos (146).

1.6.1. Origem e distribuição

A beterraba (*Beta vulgaris* L.) pertence à família *Chenopodiaceae* (Tabela 1.3) sendo originária da Ásia e da Europa. Esta família inclui 105 géneros com aproximadamente 1400 espécies (14,147), e membros da família dicotiledóneas. Nesta família, existem produções agrícolas com elevada importância, tais como a *Spinacia oleracea* (espinafre), sendo o legume mais consumido da família *Chenopodiaceae* na Europa até à quinoa, um vegetal cujas suas sementes tem verificado um interesse crescente devido ao seu elevado teor em proteína (148).

As plantas desta família apresentam ciclos anuais ou perenes. São maioritariamente herbáceas, tendo poucos representantes com hábito arbustivo ou arborícola. A beterraba tem várias colorações que variam do amarelo ao vermelho (146).

Tabela 1.3. Classificação científica da *Beta vulgaris* L (149).

Reino	<i>Plantae</i>
Divisão	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Subclasse	<i>Caryophyllidae</i>
Ordem	<i>Caryophyllales</i>
Família	<i>Chenopodiaceae</i>
Género	<i>Beta</i> L.
Espécie	<i>Beta vulgaris</i> L

Desde 1000 A.C. a beterraba tem sido utilizada como alimento por todas as populações do mediterrânico. Os romanos utilizavam as folhas da beterraba como alimento (15) e as raízes pelas finalidades medicinais (pelas suas propriedades laxantes, tratamento para o mau hálito, tosse, dores de cabeça e até como um afrodisíaco). A beterraba durante o século XIX, na Alemanha, apresentou uma relevante importância comercial, devido ao desenvolvimento da

beterraba açucareira (*Beta vulgaris saccharifera*) (148,150).



Figura 1.27. Morfologia do vegetal *Beta Vulgaris* L., retirado de (151).

É um legume que é cultivado extensamente na Alemanha e França, e em quantidades inferiores noutros países europeus, também em África, na Ásia e na América do Sul (150).

1.6.2. Morfologia da planta

Raiz: são geralmente globo ou cilíndrico em forma de vermelho roxo/dourado amarelo/vermelho-branco na cor dependendo da variedade das beterrabas. As beterrabas são

plantadas principalmente pela sua raiz.

Talos: os talos são curtos e achatados, produzindo folhas simples que são arranjadas em espiral fechada;

Folhas: as folhas são em forma de coração, estas também podem ser ingeridas como o espinafre;

Flores: as flores são muito pequenas com um diâmetro de 3 a 5 milímetros e são produzidas em pontas densas. Possuem cor verde ou tingida avermelhado com cinco pétalas;

Frutos: o fruto é um aglomerado de nozes duras com cor escura (14,150,152).

1.6.3. Compostos bioativos (CBs) na beterraba

A beterraba é um vegetal que apresenta na sua composição carotenoides (148), o ácido ascórbico (13), altos níveis de nitratos (644–1800 mg/kg) (153), CFs (9,154,155), vitaminas, minerais como potássio, sódio, fósforo, cálcio, magnésio, cobre, ferro, zinco, manganês e pigmentos solúveis em água (betalaínas) (156), contribuindo para o valor nutricional e consequente benefício na saúde dos seus consumidores (14). Alguns compostos também foram identificados em baixos níveis, como a glicina, a betaína e o ácido fólico (13).

A presença de CBs como os CFs e betalaínas podem conferir propriedades antioxidantes à raiz da beterraba (9).

Na raiz da beterraba existe uma quantidade significativa de derivados do ácido hidroxibenzóico e de hidroxicinâmicos, as duas classes principais de ácidos fenólicos, os identificados nas raízes de beterraba são os seguintes: ácido vanílico, ácido *p*-cumárico, ácido protocatéuico, ácido caféico, ácido siríngico (14). Também foram identificados os seguintes flavonoides na raiz de beterraba: quercetina, epicatequina, catequina, rutina, kaempferol, miricetina e apigenina (14,157).

Segundo Koubaier *et al.*(157) foram identificados em extratos de folhas de talos de beterraba os seguintes ácidos fenólicos: gálico, vanílico, clorogénico, ferúlico, cafeico e siríngico. E os seguintes flavonoides: miricetina, quercetina, rutina e kaempferol (15,157). Também foram identificados alguns glicosídeos derivados da apigenina, como a vitexina (154).

Nas beterrabas estão presentes alguns CBs únicos de antioxidantes solúveis em água e não fenólicos, as betalaínas, incluindo as duas classes destes compostos, a betacianina vermelha-violeta e a betaxantina amarela-laranja. Os efeitos antioxidantes das betalaínas já foram demonstrados em inúmeras experiências *in vitro* (158). As betalaínas são considerados corantes naturais e têm-se verificado um crescente interesse neste tipo de corantes naturais, dado que corantes sintéticos cada vez mais são avaliados negativamente pelos consumidores (146). As betalaínas identificadas nas raízes da beterraba são as betaxantinas (vulgaxatina I e vulgaxatina II) (11) e diversas betacianinas (betanina, prebetanina, isobetanina, e neobetanina) (159). Também foram identificadas em extratos das folhas e ramos da beterraba as betalaínas, nomeadamente a betacianina (betanina e isobetanina) e betaxantina (vulgaxantina I) (157).

1.6.4. Benefícios para a saúde

O consumo de beterraba vermelha é uma fonte de antioxidantes e pode contribuir para a proteção contra doenças relacionadas com o envelhecimento celular. A beterraba vermelha é um vegetal com uma elevada atividade antioxidante (4,10,150,160). No entanto, as folhas e talos da beterraba não são habitualmente incluídas na alimentação, apesar de estarem reportadas como tendo características antioxidantes e nutritivas semelhantes às encontradas nas raízes (154).

A raiz da beterraba possui uma quantidade significativa de vitamina C, vitamina B1, B2, niacina, B6, B12, enquanto as suas folhas são uma excelente fonte de vitamina A (150).

O consumo dos CFs presentes na beterraba está descrito como podendo potenciar o tratamento de algumas patologias, tais como: anemia, pressão arterial, diabetes *mellitus* tipo II, cancro, estados descamativos do couro cabeludo, úlceras gástricas, doenças renais, doenças hepáticas, toxicidade hepática (158) ou doenças biliares como icterícia, hepatite, intoxicação alimentar, diarreia ou vômitos (150,161). Além disso possui atividade sobre o stress oxidativo e atividade anti-inflamatória (148,158).

As betalaínas estão descritas como apresentando efeitos antivirais (150,162) e capacidade de inibir a proliferação celular de células tumorais humanas (150,163). As betalaínas e CFs que existem na beterraba vermelha (folhas, talos e raiz) têm demonstrado a capacidade de aumentar a resistência de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), na prevenção de cancro e DVC, pois parecem apresentar a capacidade de redução do efeito oxidativo dos radicais livres sobre lípidos (156). Tal como referido anteriormente, estes CBs podem ser utilizados como corantes naturais (150), como o corante alimentar denominado como E162 (13,164,165), com aplicação na indústria alimentar: derivados do leite, bebidas, doces e produtos enlatados (164).

Além dos CFs e betalaínas, as raízes das beterrabas contêm quantidades significativas de ácido oxálico. O ácido oxálico é um poderoso quelante de iões metálicos, com a capacidade de interferir com o metabolismo do ferro e do cálcio, no entanto em concentrações elevadas pode conduzir à formação de nefrite (150,161).

Os nitratos presentes na raiz da beterraba foram descritos como apresentando capacidade de controlar DCVs (13), diminuindo a pressão arterial, protegendo as artérias de lesões provocadas pela isquemia e modulação da função mitocondrial (14,166).

Os extratos das folhas e talos da beterraba parecem ainda apresentar a capacidade de controlar a anemia (167), na proteção hepatotóxica contra o tetracloreto de carbono (CCl₄) (168) e podem proteger de danos hepáticos provocados por uma dieta com elevado teor em gordura (169).

1.7. Objetivos e Etapas

O objetivo desta dissertação foi o isolamento de CBs presentes em extratos aquosos de folhas e talos da beterraba, utilizando a tecnologia de membranas como um processo de UF.

Para tal, foi inicialmente desenvolvido um extrato com uma pegada ecológica baixa, dado que foi utilizada como matéria-prima um subproduto agrícola, as folhas e talos da beterraba. Por outro lado, a extração dos CBs foi realizada recorrendo a um “solvente verde”, a água, evitando desta forma a utilização de solventes orgânicos. Também foi tido em conta que a metodologia de extração seria de simples execução, sem necessidade de recorrer a equipamentos específicos e/ou temperaturas elevadas.

Os extratos aquosos das folhas e talos da beterraba foram avaliados em FT, hidratos de carbono, proteínas, atividade antioxidante (DPPH) e atividade inibitória da AChE. Recorreu-se à análise de componentes principais (PCA) para identificar o extrato aquoso com as melhores bioatividades. A análise e identificação dos compostos presentes nos diferentes extratos aquosos foi obtida através do método de cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC-DAD).

A metodologia de isolamento dos compostos de interesse presentes no extrato aquoso das folhas e talos da beterraba foi desenvolvida tendo em consideração que deveria: ser pouco dispendiosa, evitar o recurso a solventes orgânicos, prescindir de temperaturas elevadas e com baixo consumo energético, permitindo preservar a estabilidade dos CBs recuperados. Um processo de UF foi selecionado para efetuar o isolamento do CBs, visto apresentar todas as características pretendidas.

Desenvolveu-se um estudo que pretendia relacionar a porosidade das membranas e a pressão transmembranar (PTM) aplicada com a capacidade de isolar CBs. Para tal, prepararam-se cinco membranas assimétricas de acetato de celulose pelo método de inversão de fases, com MWCO diferentes, seguindo da sua caracterização consoante a sua permeabilidade hidráulica e limite de exclusão molecular. Após preparação e caracterização das membranas, procedeu-se ao fracionamento do extrato aquoso de folhas e talos de beterraba, em modo de recirculação total.

As frações resultantes das permeações pelas membranas às PTMs de 1, 2 e 3 bar, como as amostras da alimentação foram avaliados em FT, hidratos de carbono, proteínas, atividade antioxidante (DPPH) e atividade inibitória da AChE. Recorreu-se novamente à análise de componentes principais (PCA) para identificar a fração dos permeados com as melhores bioatividades. A análise e identificação dos compostos presentes nas diferentes permeados e das amostras da alimentação foi através de cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC-DAD), e a identificação dos compostos foi efetuada por espectrometria de massa de elevada resolução (LC-QTOF-MS).

Por fim, foi determinada a hepatotoxicidade dos permeados e da alimentação do extrato aquoso das folhas e talos da beterraba em linhas celulares humanas do cancro do fígado (Hep-G2).

Capítulo 2: Materiais e Métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Reagentes

Para a preparação dos extratos aquosos foram utilizados os enzimas pancreatina da Panreac e a pepsina da Fluka, o cloreto de sódio (NaCl) e uma solução de fosfatos composta por KH_2PO_4 e K_2HPO_4 da Merck.

Na análise dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fotodíodos (HPLC-DAD), foi utilizado metanol (MeOH) da Riedel-de Haën™, acetonitrilo (ACN) da Fisher-Chemical, ácido trifluoracético (TFA) da Panreac-Applichem e também água Milli-Q (resistividade 18.2 MΩ cm, a 25 °C), retirada de um sistema de purificação de água Milli-Q Academic da Merck.

A análise por espectrometria de massa de elevada resolução (LC-QTOF-MS) recorreu aos seguintes eluentes: o ácido fórmico e água Milli-Q da Merck, e ACN da Fisher Scientific, Optima TM.

Os padrões comerciais utilizados ao longo do trabalho foram os seguintes: o ácido gálico da Sigma-Aldrich, o ácido vanílico, vitexina, ácido ferúlico, ácido síringico da Fluka, rutina, o ácido cafeico, quercetina e miricetina da Sigma, ácido clorogénico da Extrasynthese e por fim o ácido quinino da Merck.

Na quantificação dos fenóis totais (FT) utilizou-se o reagente Folin–Ciocalteu da Sigma e o carbonato de sódio (Na_2CO_3) da Merck. Enquanto na quantificação dos hidratos de carbono recorreu-se ao ácido sulfúrico da Merck e como padrão a glucose da HiMedia. Finalmente, na quantificação de proteínas utilizou-se o reagente de Bradford da Bio-Rad Protein Assay e como padrão para determinar a reta de calibração a albumina do soro bovino (BSA) da Sigma.

Nos ensaios de atividade antioxidante utilizou-se 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) da Sigma-Aldrich e metanol (MeOH) da Riedel-de Haën™.

Nos ensaios da determinação da atividade enzimática adquiriu-se a acetilcolinesterase (AChE), o iodeto de acetilcolina (AChI), tris(hidroximetil)-aminometano (Tris) à Sigma, o 5-5'-ditiobis(2-ácido nitrobenóico) (DTNB) à VWR, o cloreto de sódio e o cloreto de magnésio hexahidratado à Panreac.

Para a preparação das membranas foi utilizado acetato de celulose 30 000 g/mol da Sigma-Aldrich, acetona comercial e formamida da Scharlau. Na determinação da rejeição aos solventes orgânicos foi usado o Dextrano (DEX) 100 000 g/mol e o Polietilenoglicol (PEG) 20 000 g/mol da Fluka, o DEX 70 000 g/mol da Darmstadt, o DEX 40 000 g/mol Sigma-Aldrich, e os PEG 10 000 g/mol, PEG 6 000 g/mol, PEG 3 000 g/mol e PEG 1 500 g/mol da Merck.

Nos ensaios com as linhas celulares, o antimicótico (100x, com 10 000 U/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B), o azul de tripano e o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) eram da Sigma, o meio Roswell Park Memorial

Institute (RPMI), o soro fetal bovino (FBS), a tripsina (10x) e a L-glutamina (2 mM) da Lonza e o MeOH da Riedel-de Haën™.

2.1.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados ao longo deste trabalho experimental foram a balança Sartorius® BP 110S e Sartorius®BP1200, o vortex Heidolph® REAX 2000, o ultrassons Elma® Transsonic 460/H e a placa de aquecimento com agitação Agimatic-N JP Select® e para incubação das amostras utilizou-se o banho da GFL® 1083. Para as medições do pH recorreu-se ao medidor da WTW inoLab®, utilizou-se o liofilizador Heto® PowerDry LL 3000, acoplado a uma bomba Edwards RV3 para a secagem dos talos e folhas da beterraba e dos extratos resultantes das frações das permeações e das amostras da alimentação das diferentes membranas.

Na preparação dos extratos aquosos utilizou-se a centrífuga Beckman® J2-21M/E, com um rotor JA-20.1 e JA-19. Para amostras com menor volume a centrífuga Minispin® 5415D da Eppendorf®.

Os ensaios da inibição da acetilcolinesterase, da redução do radical livre DPPH, quantificação dos FT, de proteínas e dos hidratos de carbono foram realizados no espectrofotómetro Shimadzu® UV-160A.

Para a análise e identificação dos CBs presentes nos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba recorreu-se ao HPLC-DAD sendo realizadas num VWR-Hitachi Elite LaChrom® equipado com uma coluna LiChroCART® 250-4, LiChrospher® 100 RP-8 (5µm) (Merck), Lt. L10160216 ou com a coluna LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm), e *software* EZChrom Elite® (Agilent Technologies 2007), com injetor automático, um forno de coluna L-2300 e um detetor do tipo DAD (*diode array detector*) L-2455.

Para a separação do extrato aquoso das folhas e talos da beterraba, recorreu-se à instalação de ultrafiltração (UF), modelo Ray-Flow, Tech Sep (Figura 2.1).

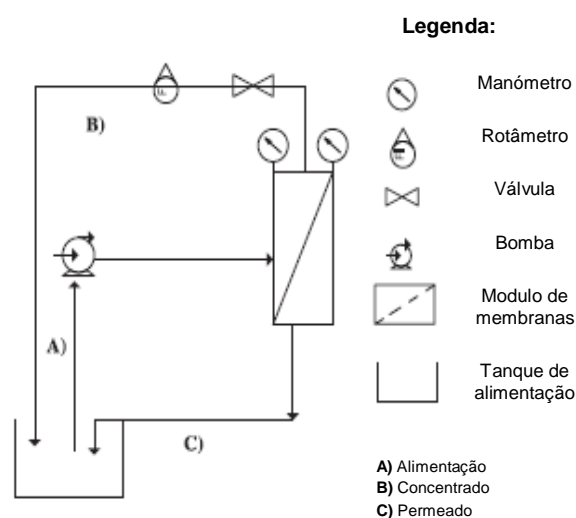


Figura 2.1. Instalação de ultrafiltração (UF) do ISEL: instalação real de UF (esquerda) e esquema da instalação de UF (direita) adaptado de (125).

A instalação de UF era constituída por um tanque de alimentação, uma bomba, com regulador de caudal (Leray Somer®), uma válvula (para regular a pressão de funcionamento), dois manómetros, antes e depois da célula das membranas (uma membrana de área útil 147,8 cm²), e um rotâmetro (Georg Fischer). Para a pesagem dos permeados e alimentações recolhidas recorreu-se à balança Kern P8®.

Para a determinação do limite de exclusão molecular (MWCO) das membranas preparadas efetuou-se a análise das amostras resultantes das permeações pelas membranas em estudo e respetivas alimentações dos PEG e DEX, bem como das soluções de PEG e DEX a diferentes concentrações para elaboração de retas de calibração, foram determinadas por detetor de índice de refração (IR), Cromatógrafo DIONEX (Ultimate 3000) acoplado a um detetor de índice de refração (RI) da Shodex (RI-101), utilizando o programa CHROMELEON® (Chromatography Management System, versão 6.70) para a análise dos cromatogramas.

Para a identificação e análise das frações resultantes das permeações das cinco membranas às pressões transmembranares (PTMs) de 1, 2 e 3 bar e das amostras da alimentação, recorreu-se ao HPLC-DAD sendo realizadas num Alliance Waters e2695® equipado com uma coluna Luna® 5 µm C8(2) 100 Å, 250 x 4.6 mm (Phenomenex), Lt. 00G-4249, com injetor automático e um detetor do tipo DAD (*diode array detector*) Waters2998 PDA®. Enquanto para as análises por LC-QTOF-MS e LC-QTOF-MS/MS foram efetuadas num equipamento HPLC de Elute Autosampler UHPC equipado com a uma coluna Intensity Solo 2 C18 RP (100 x 2.1 mm, 2 µm) e acoplado a um espetrómetro de massa de elevada resolução QTOF Impact II, todos estes equipamentos pertencentes à Bruker, Bremen, Alemanha.

No ensaio de citotoxicidade dos extratos as condições de esterilidade foram garantidas graças à câmara de fluxo laminar Esco® *Class II Biohazard Safety Cabinet*. As células foram incubadas numa estufa Shel Lab CO₂ Series da Sheldon Mfg.Inc®. A visualização e contagem das células foi realizada num microscópio ótico MOTIC® AE21 e a medição das absorvências pelo leitor de microplacas TECAN® Sunrise.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação de extratos aquosos das folhas e talos de Beterraba (*Beta vulgaris L.*)

As folhas e talos de beterraba utilizados para este trabalho experimental provieram da região da Malveira, sendo recolhidas em Outono de 2018.

Após as folhas e talos de beterraba serem limpas e cortadas grosseiramente, efetuou-se a sua secagem através do processo de liofilização.

Os extratos aquosos das folhas e talos de beterraba (*Beta vulgaris L.*) foram obtidos por decocção (Bdec), extração assistida pelo enzima pepsina (BDG), extração assistida pelo enzima pancreatina (BDP) e extração assistida pelos enzimas pepsina e pancreatina (BDC). Foram efetuados os controlos de cada extração assistida pelo enzima sendo denominados BCG, BCP

e BCC, respetivamente (Figura 2.2). Também se efetuou a preparação das soluções de pepsina (SG), pancreatina (SP) e de soluções de pepsina e pancreatina (SC).

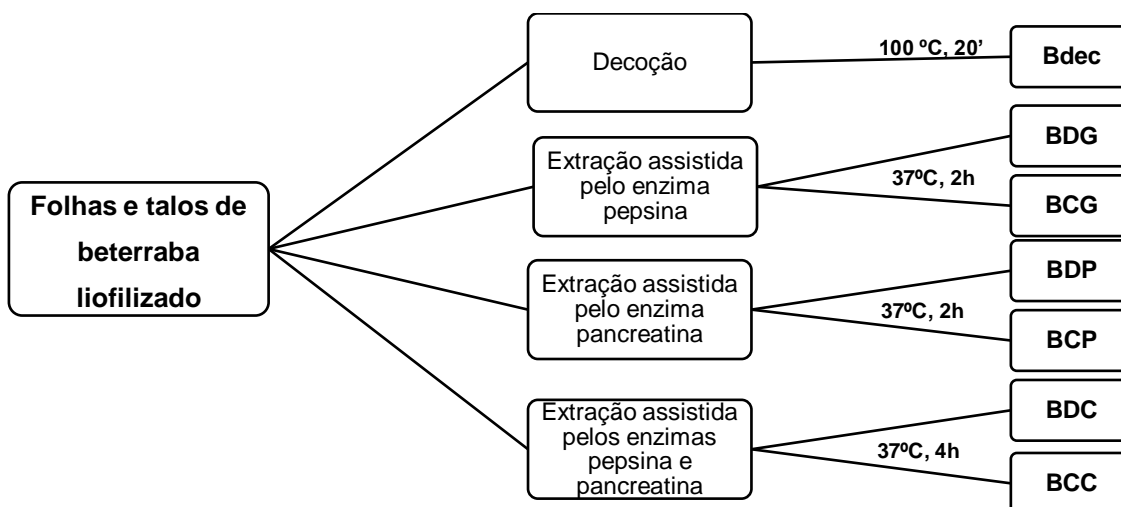


Figura 2.2. Esquema dos diferentes extratos aquosos das folhas e talos da beterraba e controlos.

Para a preparação do extrato aquoso por decocção (Bdec) foi preparado uma suspensão de folhas e talos de beterraba seco à concentração de 0.03 g/mL, e ferveu-se o preparado durante 20 minutos, este procedimento foi adaptado de Falé *et al.* (170). De seguida, filtrou-se o extrato primeiro com gaze, e posteriormente em papel de filtro N°1 da Whatman.

A metodologia para a obtenção dos extratos aquosos de folhas e talos de beterraba por extração assistida por enzima (EAE), para tal utilizando o suco gástrico (SG) e pancreático (SP) artificiais, baseou-se no procedimento descrito em Porfirio *et al.* (171) com algumas adaptações. Os extratos controlo das respetivas EAEs foram obtidos utilizando-se água em vez das soluções enzimáticas, mantendo os outros parâmetros idênticos.

No extrato aquoso com EAE com pepsina (BDG) efetuou-se a adição da solução de pepsina (3.2 mg/ml de pepsina e 2 mg/ml de NaCl a pH 1.2) a uma suspensão de extrato de folhas e talos de beterraba liofilizado a 0.3 g/mL numa proporção de 1:4. Incubou-se a 37 °C durante duas horas, de forma a simular a digestão. Posteriormente, efetuou-se a centrifugação do extrato durante trinta minutos a 3 500 g à temperatura de 4 °C, e recolheu-se o sobrenadante sendo este transferido para *eppendorfs* e centrifugado durante cinco minutos a 10 000 g (171,172).

No extrato aquoso com EAE com pancreatina (BDP) efetuou-se a adição da solução de pancreatina (25 mg/ml de pancreatina em tampão fosfato de potássio 50 mM em pH 8) a uma suspensão de extrato liofilizado a 0.3 g/mL numa proporção de 1:1. A mistura foi incubada a 37 °C durante duas horas, de forma a simular a digestão. Posteriormente, efetuou-se a centrifugação do extrato durante trinta minutos a 3 500 g à temperatura de 4 °C, e recolheu-se o sobrenadante sendo este transferido para *eppendorfs* e centrifugado durante cinco minutos a 10 000 g (171,172).

Para o extrato aquoso com EAE com pepsina e pancreatina (BDC) efetuou-se a adição da solução de pepsina à solução de extrato liofilizado a 0.3 g/mL na proporção de 1:1 e foi a incubar

a 37°C durante duas horas, sendo adicionado à mistura previamente incubada a solução de pancreatina na proporção de 1:1 e voltou a incubar a 37°C por mais duas horas. De seguida, efetuou-se a centrifugação do extrato durante trinta minutos a 3500 g à temperatura de 4 °C, e recolheu-se o sobrenadante, sendo este transferido para *ependorfs* e centrifugado durante cinco minutos a 10 000 g (171,172).

Foi efetuado, a posteriori, a secagem por liofilização dos extratos aquosos das folhas e talos de beterraba para determinação da concentração em extrato seco (EXS) expresso em mg/mL como demonstrado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Quantificação do extrato seco dos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba.

Extratos	Extrato seco (mg/mL)
Bdec	6.9
BCG	23.2
BDG	23.7
BCP	17
BDP	36.5
BCC	7.9
BDC	N/D

No entanto não foi possível a quantificação da concentração do extrato BDC devido à sua indisponibilidade.

Para os ensaios de fragmentação do extrato dos talos e folhas de beterraba por tecnologia de membranas, foi necessário a preparação do extrato (BCP) com o volume de 1 L. Para tal, efetuaram-se algumas adaptações ao protocolo, como o ajuste do volume de água destilada, a quantidade de extrato seco de folhas e talos de beterraba e o volume da solução de pancreatina correspondente a um volume de 1 L. De forma a extrair maior quantidade de CBs realizaram-se três lavagens do *pelet*, com água destilada, resultante das centrifugações com recuperação do sobrenadante com o volume final de 2 L de extrato BDP.

2.2.2. Análise e identificação dos compostos bioativos (CBs) dos extratos das folhas e talos de beterraba (*Beta vulgaris L.*)

2.2.2.1. Condições analíticas do HPLC-DAD

Na análise por HPLC foi utilizada uma fase móvel constituída por um sistema binário de acetonitrilo (ACN) (A) e ácido trifluoracético (TFA) (0.05 % em água *Milli-Q*) (B) e a um fluxo de 0.8 mL/min. O volume de injeção foi de 25 µL de amostra (com concentrações de 5 mg/mL e 10 mg/mL) com eluição em modo gradiente (composição do eluente varia com o tempo de análise) (Tabela 2.2), sendo a deteção feita entre os 200 e os 600 nm. Também se efetuou a injeção de padrões de CFs com a concentração de 0.1 mg/mL: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico, rutina, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido clorogénico e vitexina.

Tabela 2.2. Gradiente utilizado no método de análise das amostras por HPLC-DAD.

Tempo (min)	% A	% B	Caudal (mL/min)
0	8	92	0.8
20	28	72	
25	55	45	
28	8	92	
30	8	92	

2.2.2.2. Condições analíticas do LC-QTOF-MS

Os espectros de massa de alta resolução foram adquiridos através dos modos de ESI positivo e negativo, com os seguintes parâmetros experimentais: voltagem do capilar: 3.500 - 4.000 V; gás nebulizador (N₂): 2.0 bar; gás de secagem (N₂): 4.0 L/min; temperatura do gás de secagem: 200°C. Os espectros foram adquiridos num intervalo entre *m/z* 50-1500 e energia de colisão das células de 5.0 eV.

Tabela 2.3. Gradiente utilizado durante as análises por LC-QTOF-MS.

Tempo (min)	% A	% B	Caudal (mL/min)
0	95	5	0.25
1.5	95	5	
13.5	25	75	
18.5	0	100	
21.5	0	100	
23.5	95	5	
30	95	5	

A coluna e o amostrador automático foram mantidos a 35 °C e 10 °C, respetivamente. Foi utilizado um gradiente de eluição (Tabela 2.3) com fase móvel de 0.1 % v/v de ácido fórmico em água (A) e 0.1 % v/v de ácido fórmico em ACN (B).

Para calibração interna utilizou-se uma solução com a seguinte composição: 750 L de ácido acético, 200 L ácido fórmico e 0.5 mL de uma solução NaOH a 1N, introduzida na fonte de iões no início de cada aquisição, através de um *loop* de 20 µL.

A aquisição e processamento de dados foram realizados utilizando o *software* DataAnalysis 4.1 (Bruker Daltoniks).

As amostras do extrato BDP (alimentação) e dos seus permeados analisados foi efetuado à concentração de 1 mg/mL, também se efetuou a injeção de padrões de CFs com a concentração de 0.5 mg/mL: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico, rutina, ácido vanílico, ácido síringico, ácido clorogénico, vitexina e ácido quinico. Estes padrões foram preparados com água *Milli-Q* enquanto os flavonoides quercetina e miricetina foram preparados em metanol.

2.2.3. Quantificação dos compostos bioativos (CBs) dos extratos das folhas e talos de beterraba (*Beta vulgaris* L.)

2.2.3.1. Quantificação dos fenóis totais (FT)

Para a quantificação dos FT utilizou-se o método que se baseia na reação dos grupos hidroxilo dos fenóis com o reagente de Folin-Ciocalteu (FCR). Este método centra-se numa reação de oxidação-redução, em meio alcalino, devido à presença de Na_2CO_3 . Nesta reação, os ácidos fosfomolibdemicos presentes no FCR, no qual o molibdénio encontra-se no estado de oxidação VI, são reduzidos a uma mistura de óxidos de molibdénio por eletrões provenientes dos CFs, fazendo então com que a cor da mistura reacional mude de amarelo para azul (Figura 2.3) (170). A coloração da amostra é proporcional ao teor de CFs existentes na amostra e pode ser avaliada espectrofotometricamente a 760 nm, por interpolação numa reta de calibração.

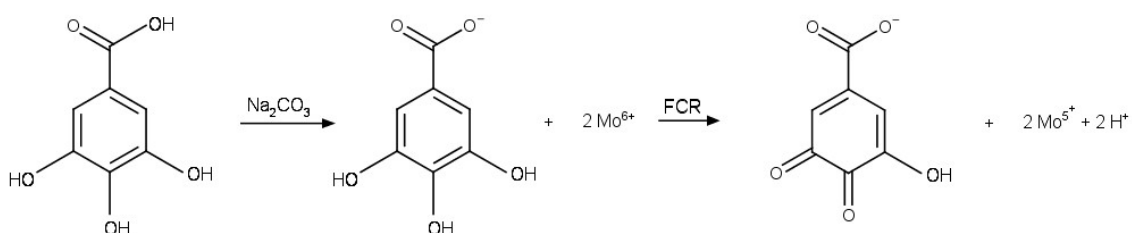


Figura 2.3. Reação do ácido gálico, composto padrão, com o molibdénio, constituinte do reagente de Folin-Ciocalteu, que é reduzido de Mo^{6+} para Mo^{5+} , adaptado de (173).

A quantificação dos FT foi realizada em triplicado, adotando o método descrito por Lee *et al.* (174). Em primeiro lugar, efetuou-se a reta de calibração, tendo como padrão o ácido gálico. Assim adicionou-se, num *ependorf*, 1350 μL de água *Milli-Q*, 30 μL da solução padrão a diferentes concentrações (10 - 500 $\mu\text{L/mL}$), 30 μL de FCR e agitou-se vigorosamente no vortex. Aguardou-se três minutos, adicionou-se 90 μL de Na_2CO_3 2 % e incubou-se durante 1 h, a 4 $^\circ\text{C}$, em agitação contínua. Posteriormente, leram-se as absorvências a 760 nm e traçou-se uma reta de calibração da absorvência em função da concentração de ácido gálico (Anexo 1.1, Figura 6.1), obtendo-se a seguinte equação:

$$\text{Abs}_{760} = (0.0339 \pm 0.0082) \times c - (0.0057 \pm 0.0038) \quad \text{Equação 2.1}$$

Em que Abs_{760} diz respeito à absorvência a 760 nm e c à concentração de equivalentes de ácido gálico (GAE $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

A quantificação dos grupos fenólicos existentes nas amostras em estudo, foi efetuada da mesma forma, substituindo os 30 μL da solução de ácido gálico pelas amostras dos diferentes extratos aquosos e para as amostras dos extratos resultantes das permeações das membranas utilizou-se 60 μL (10 mg/mL). Os resultados obtidos são apresentados em μg GAE/ μL de extrato, expressos em equivalentes de ácido gálico e os resultados são apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.

2.2.3.2. Quantificação dos Hidratos de Carbono

O método utilizado para a quantificação hidratos de carbono totais foi o método da antrona. No qual, a reação de antrona se baseia na ação hidrolítica do ácido sulfúrico concentrado sobre os hidratos de carbono. Quando a reação ocorre os hidratos de carbono com ligações glicosídicas são hidrolisadas e os açúcares simples hidrolisados em furfural ou hidroximetilfurfural. Estas substâncias condensam com a antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno) formando um produto de coloração azul petróleo. Os açúcares totais são quantificados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 620 nm (175).

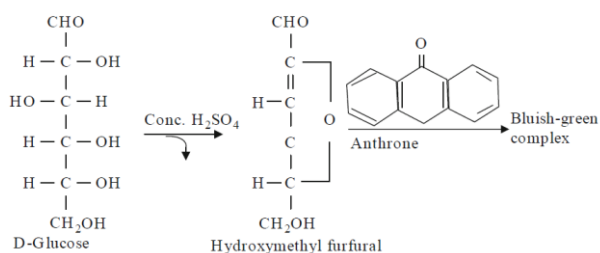


Figura 2.4. Reação da antrona em meio ácido com hidratos de carbono, retirado de (176).

Para tal, foi necessário a preparação de uma solução de antrona a 0.2 % (m/v) em ácido sulfúrico 95 %. A solução de antrona foi preparada 30 minutos antes do ensaio e a mistura incubada a 100 °C durante 10 minutos, sendo posteriormente arrefecida em banho de gelo durante o mesmo período de tempo. Registou-se a absorvência a 620 nm do produto azul (177,178).

Todos os ensaios foram feitos em triplicado, e traçou-se uma reta de calibração de glucose a 60 µg/mL. A partir desta solução obtiveram-se várias concentrações (2 a 20 µg/mL) (178). Os hidratos de carbono foram quantificados com recurso à seguinte reta de calibração de glucose (Anexo 1.2, Figura 6.2):

$$Abs_{620} = (0.04612 \pm 0.001751) \times c + (0.009705 \pm 0.01968) \quad \text{Equação 2.2}$$

Em que Abs₆₂₀ diz respeito à absorvência a 620 nm e *c* à concentração de equivalentes de glucose por mg de amostra (mg Glucose/mL). Os resultados foram apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.

2.2.3.3. Quantificação de Proteínas

A quantificação de proteínas foi feita de acordo com o método de Bradford (179). Este método é um ensaio colorimétrico utilizado para a quantificação de proteínas em solução e baseia-se na interação entre o corante de Coomassie (reagente de Bradford) e macromoléculas de proteínas que contém grupos amino primários: aminoácidos de cadeias laterais básicas (histidina e lisina) ou aromáticas (triptofano, tirosina e fenilalanina) (180). A reação em meio ácido permite a interação entre a proteína de elevado peso molecular e o corante de Coomassie e provoca o deslocamento do equilíbrio do corante da sua forma catiónica (castanho avermelhado), que tem um máximo de absorção a 465 nm, para a forma aniónica que absorve fortemente a 595 nm e apresenta uma cor azul intenso (181).

Para a quantificação de proteínas nos extratos aquosos adicionou-se 795 μL de água *Milli-Q*, 5 μL de amostra e 200 μL de reagente de Bradford e efetuou-se a leitura da absorvência a 595 nm. Neste ensaio foi traçada uma curva de calibração com o padrão de albumina de soro bovino (BSA) a diferentes concentrações, entre 0.001 $\mu\text{g/mL}$ e 0.01 $\mu\text{g/mL}$. A curva de calibração obtida para as proteínas foi (Anexo 1.3, Figura 6.3):

$$Abs_{595} = (48.75 \pm 1.039) \times c + (0.006727 \pm 0.005835) \quad \text{Equação 2.3}$$

onde c representa a concentração de BSA (mg/mL) e Abs_{595} a absorvência a 595 nm. A quantificação das proteínas presentes nas amostras foi feita em quantidade de equivalentes de BSA/mg de amostra. Para cada amostra analisada foram feitas três medições independentes e os resultados foram apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.

2.2.4. Determinação da atividade antioxidante dos extratos das folhas e talos de beterraba (*Beta vulgaris L.*) - Capacidade de redução do radical DPPH

O ensaio do DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) é um dos métodos mais utilizados para avaliar a atividade antioxidante de extratos de plantas. Trata-se de um método colorimétrico, que mede a capacidade antioxidante de uma substância em captar o radical DPPH. Este método baseia-se na transferência de elétrões, ou de radicais de hidrogénio, de um composto antioxidante existente no extrato para o radical DPPH, dando origem a uma molécula diamagnética estável (173). Quando o radical reage com o agente redutor verifica-se a formação de uma nova ligação, alterando a cor da solução, que passa de uma coloração púrpura para uma tonalidade amarelada (Figura 2.5). A reação pode ser seguida espectralotometricamente a 517 nm, comprimento de onda a que o DPPH oxidado absorve (173,182,183).

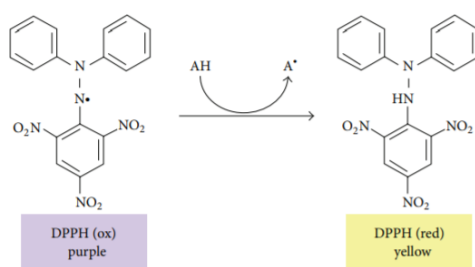


Figura 2.5. Princípio do teste da capacidade de redução do radical livre DPPH na presença de uma amostra com propriedades antioxidantes, retirado de (182).

A atividade antioxidante das amostras foi avaliada de acordo com o método do DPPH (184). A 1000 μL de DPPH (0,002 % em metanol) adicionou-se 10 μL dos extratos aquosos e das frações resultantes das permeações pelas membranas e das amostras da alimentação a 10 mg/ml. Na preparação da solução de DPPH foi necessário verificar se a absorvência da solução ao comprimento de onda de 517 nm se encontrava num valor de 0,7 UA, ajustando-se se necessário com DPPH ou metanol. De seguida, as soluções foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente, e registou-se a sua absorvência a 517 nm. Os ensaios foram realizados em triplicado. O ensaio do controlo foi efetuado substituindo a amostra, pelo solvente da amostra.

Os resultados foram expressos em percentagem de redução do DPPH relativamente ao controlo, sendo calculados através da Equação 2.4.

$$AA (\%) = 100 \times \left(\frac{Abs_{controlo} - Abs_{amostra}}{Abs_{controlo}} \right) \quad \text{Equação 2.4}$$

Onde, AA (%) representa a atividade antioxidante, $Abs_{controlo}$ e $Abs_{amostra}$ são absorvências da solução de controlo e da amostra, respetivamente.

2.2.5. Determinação da atividade enzimática dos extratos das folhas e talos de beterraba (*Beta vulgaris L.*)

2.2.5.1. Inibição da acetilcolinesterase (AChE)

Com este estudo pretendeu-se calcular a velocidade de reação da tiocolina com o DTNB que é catalisado pela AChE, através do método de Ellman, nomeadamente o aparecimento do ião 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), que tem uma cor amarelada e um pico de absorvência a 405 nm (Figura 2.6)(185).

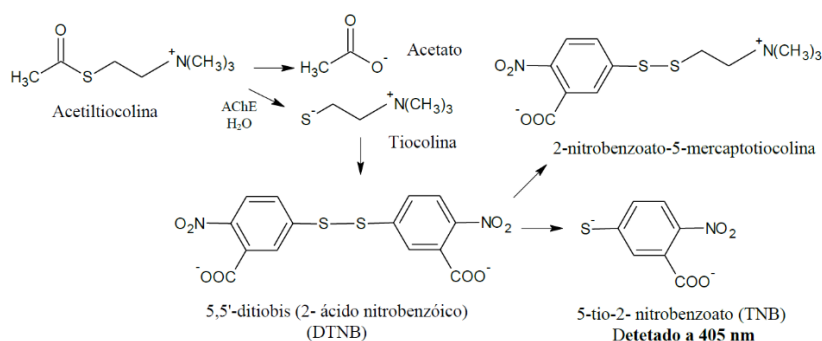


Figura 2.6. Esquema representativo da reação enzimática da AChE, para a determinação da atividade da enzima, através do método de Ellman, adaptado de (185).

Para a determinação da inibição da atividade enzimática da AChE usou-se o método descrito na bibliografia (184). Em primeiro lugar, foi necessário determinar a atividade enzimática sem inibidor, ou seja, o controlo, que corresponde à atividade máxima do enzima (100 %), para tal adicionou-se 325 µL de tampão Tris 50 mM, pH = 8, 100 µL de água *Milli-Q* e 25 µL de uma solução de enzima (1.33 U/mL). Incubou-se durante cinco minutos à temperatura ambiente, seguidamente, adicionou-se 75 µL de uma solução de AChI (0,33 mg/mL em água) e 475 µL de DTNB (1.2 mg/mL em tampão Tris com sais (0.1 M NaCl e 0.02 M MgCl₂)). A absorvência foi lida no espetrofotómetro a 405 nm, durante 4 minutos, com intervalos de 10 segundos contra um branco sem enzima. A atividade inicial do enzima deve estar compreendida entre 0.10-0.12 UA/min. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. O mesmo procedimento foi realizado para as diferentes amostras, mas, em vez de se adicionar 100 µL de água *Milli-Q*, adicionou-se o mesmo volume da solução dos extratos aquosos e das frações resultantes das permeações pelas membranas à pressão transmembranar (PTM) de 3 bar e das amostras da

alimentação à concentração de 10 mg/mL. Para determinar-se a percentagem de inibição da atividade enzimática na presença de cada amostra recorreu-se à Equação 2.5:

$$I (\%) = 100 - \left(\frac{v_{amostra}}{v_{controlo}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2.5}$$

Na qual $I (\%)$ diz respeito à percentagem de inibição da AChE na presença da amostra, $v_{amostra}$ é a velocidade da reação contendo o extrato (inibidor) e $v_{controlo}$ é a velocidade inicial da reação enzimática sem inibidor.

2.2.6. Cultura de Linha Celular Cancerígena Humana

As linhas celulares utilizadas neste trabalho foram as do cancro do fígado, adenocarcinoma hepático (Hep-G2) que foram incubadas a uma temperatura de 37 °C numa estufa com 5 % de CO₂, em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS), 0.1 % de L-glutamina (2 mM) e 0.1 % de antimicótico. Estas foram introduzidas em frascos T25 (25 cm²) após 80% de confluência do frasco foram transferidas para frascos T75 (75 cm²), por tripsinização (186).

A tripsinização consiste na remoção do meio de cultura e a lavagem de pelo menos 2 vezes com *phosphate buffered saline* (PBS), após a lavagem foi adicionado às células 0.5 mL de tripsina. Incubou-se durante 5 min a 37 °C num ambiente com 5 % de CO₂. As células foram depois ressuspendidas em novo meio de cultura para posterior cultivo.

Para a contagem de células utilizou-se uma câmara de contagem *Neubauer Improved* para a quantificação das células viáveis.

2.2.6.1. Avaliação do Potencial Citotóxico

Nos ensaios utilizando linhas celulares do cancro do fígado (Hep-G2) foi usada a concentração de 50 x 10⁴ células/mL (186) para inoculação de microplacas de 96 poços.

Nos ensaios de citotoxicidade das frações resultantes das permeações das membranas e da amostra da alimentação inicial recorreu-se ao método colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólio), um composto de cor amarela que forma o produto formazana após a sua redução, um composto de cor roxa. O MTT, carregado positivamente, tem a capacidade de penetrar as células viáveis, que, graças ao seu metabolismo oxidação/redução ativo, convertem o MTT em cristais de formazan (Figura 2.7). Estes cristais são insolúveis em água, portanto utiliza-se metanol para a sua dissolução e registam-se os valores de absorvência a 595 nm. Quando as células morrem perdem a capacidade de conversão do MTT, assim sendo, quanto maior for a citotoxicidade dos extratos em estudo, menor é o número de células viáveis e o portanto o valor de absorvência registado após inoculação com MTT (187,188).

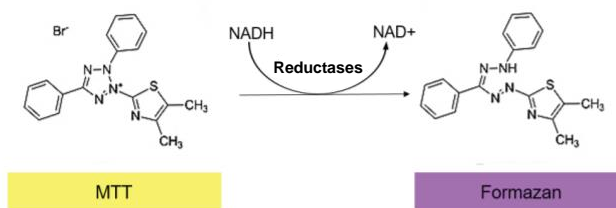


Figura 2.7. Estruturas químicas de MTT e do seu produto reduzido formazan, retirado de (189)

Após o crescimento das células durante 48 horas foi retirado o meio de cultivo da microplaca, sendo adicionado 100 μL por poço de várias concentrações das soluções a testar (a fração da permeação da membrana AC22 à PTM de 3 bar, entre 0.1 e 1 mg/mL, a fração da permeação da membrana AC35 à PTM de 3 bar e amostra da alimentação inicial nas concentrações de 1 e 0.5 mg/mL) em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino, glutamina e antimicótico. Foram ainda usados poços de controlo correspondentes a 0 % de citotoxicidade contendo apenas meio RPMI suplementado com soro fetal bovino, glutamina e antimicótico. A microplaca foi incubada durante 24 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ e num ambiente com 5 % de CO_2 . No dia seguinte, o meio foi retirado das amostras e colocou-se 100 μL por poço de 0.5 mg/mL de MTT em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino, glutamina e antimicótico incubando durante 2.5 a 3 h até se visualizar a formação de cristais. De seguida, removeu-se o meio e dissolveram-se os cristais em 100 μL de metanol e registou-se a absorvência a 595 nm contra 630 nm no leitor de microplacas. A percentagem de morte celular foi calculada através da Equação 2.6:

$$MC (\%) = 100 - \left(\frac{Abs_{amostra}}{Abs_{controlo}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2.6}$$

Na qual morte celular (MC) diz respeito à percentagem de morte celular, $Abs_{amostra}$ é a absorvência registada para as células que estiveram em contacto com o extrato e $Abs_{controlo}$ é absorvência registada para as células controlo e efetuou-se seis repetições para cada extrato e controlos em estudo.

2.2.7. Tecnologia de Membranas

Para efetuar a separação dos CBs presentes nos extratos aquosos das folhas e talos de beterraba recorreu-se à tecnologia de membranas.

2.2.7.1. Preparação das Membranas

Para o isolamento dos CBs do extrato aquoso de folhas e talos de beterraba foi necessário a preparação de cinco membranas de acetato de celulose, com limites de exclusão molecular (MWCO) diferentes. Utilizou-se o método de inversão de fases e para tal, a primeira etapa foi a preparação das soluções poliméricas, cujas composições podem ser visualizadas na Tabela 2.4.

Tabela 2.4. Reagentes e quantidade utilizados na preparação das membranas, adaptado de (126).

Reagentes	AC20 (%p/p)	AC22 (%p/p)	AC25 (%p/p)	AC28 (%p/p)	AC35 (%p/p)
Acetato de celulose	17	17	17	17	17
Formamida	20	22	25	28	35
Acetona	63	61	58	55	48
Condições operatórias					
Temperatura (°C)	20- 25				
Tempo de evaporação (min)	0,5				
Meio de coagulação	0 – 3°C				

Inicialmente, pesou-se o acetato de celulose, seguido da formamida e por último a acetona, nas quantidades descritas para cada reagente na Tabela 2.4. A variação das quantidades de formamida e de acetona determinam a porosidade das membranas, ou seja, quanto maior a quantidade de formamida maior a porosidade. O frasco foi fechado e a tampa vedada com parafilme para evitar a evaporação da acetona. Por fim, o frasco foi agitado durante 24 horas, ao fim desse tempo obteve-se um fluido homogêneo e viscoso (118,125,127).

O passo seguinte consistiu na preparação das membranas, utilizou-se para tal uma faca metálica com uma ranhura calibrada (0.25 mm) e um vidro retangular. Encheu-se a faca com a solução polimérica obtida e fez-se deslizar perpendicularmente, a uma velocidade constante, a faca sobre o vidro. Evaporou-se o filme polimérico durante 30 segundos, e de seguida mergulhou-se o vidro num banho de água desionizada entre 0 a 3 °C. Após alguns minutos, removeu-se o filme do vidro e procedeu-se à identificação da face ativa da membrana. As membranas preparadas foram preservadas em água desionizada até à sua utilização (126).

Após inspeção das membranas preparadas, selecionaram-se as duas melhores e foram cortadas à dimensão da placa porta membranas do módulo de UF. De seguida, instalaram-se as duas membranas na placa, com a camada ativa virada para o exterior (126).

2.2.7.2. Caraterização das membranas

Para caraterizar as membranas foram realizados os seguintes ensaios experimentais: permeabilidade da membrana à água pura – permeabilidade hidráulica – e a rejeição aos solutos orgânicos, que permitiu determinar o limite de exclusão molecular (MWCO) das membranas.

As membranas depois de colocadas na instalação foram compactadas antes de se proceder à sua caracterização. A etapa de compactação consiste em fazer circular água desionizada em modo de recirculação total (onde o concentrado e o permeado são ambos reciclados ao tanque de alimentação) durante 2 horas, na pressão transmembranar (PTM) de 3 bar e com um caudal de alimentação de 180 L/h (126). Com esta etapa foi possível prevenir os efeitos da pressão sobre a membrana durante os ensaios (132).

Após 2 horas de compactação as membranas foram caracterizadas em termos de permeabilidade hidráulica (L_p) e rejeição a solutos orgânicos.

Para a determinação da permeabilidade hidráulica foram realizados ensaios a pressão de trabalho diferentes (1; 1.5; 2; 2.5 e 3 bar). Nestes ensaios, recolheu-se um volume de permeado para um recipiente previamente tarado. Registou-se o peso, a temperatura e o tempo de recolha. O caudal de alimentação utilizado nestes ensaios foi de 180 L/h (118,126).

Para a determinação da rejeição aos solutos orgânicos, prepararam-se várias soluções de Polietilenoglicol (PEG) e Dextrano (DEX) com massas moleculares compreendidas entre 1.500 Da e 100.000 Da a 600 ppm. Foram realizados ensaios à PTM de 1 bar a um caudal de 180 L/h. Recolheu-se o permeado durante cerca de 5 minutos para um recipiente, e registou-se o peso, a temperatura, o tempo de recolha e recolheu-se uma amostra dos solutos orgânicos dos permeados e amostras da alimentação para sua análise por detetor de índice de refração (IR), usando o equipamento HPLC-IR como descrito em 2.1.2. Entre cada ensaio as membranas foram lavadas com 10 L de água desionizada e de seguida ficou a circular com a solução de soluto orgânico a analisar em modo de recirculação total durante 20 minutos (118,126). Na Tabela 2.5. estão descritas as massas moleculares dos solutos orgânicos utilizados para cada membrana em estudo.

Tabela 2.5. Soluções de PEG e DEX utilizados na determinação dos coeficientes de rejeição a solutos orgânicos para as membranas: AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.

Membranas	PEG 1500	PEG 3000	PEG 6000	PEG 10000	PEG 20000	DEX 40000	DEX 70000	DEX 100000
AC20	x	x	x					
AC22	x	x	x					
AC25		x	x	x				
AC28						x	x	x
AC35					x	x	x	

A quantificação da concentração dos solutos orgânicos referentes às amostras das diferentes correntes (alimentação e permeado) foi realizada por detetor IR, que permitiu relacionar a área ao pico da resposta do sinal IR como as concentrações de PEG e DEX presentes na respetiva amostra de solutos orgânicos resultantes das permeações pelas membranas e das respetivas alimentações, mas para tal foi necessário determinar as retas de calibração para cada PEG e DEX (Anexo 4.1, Figura 6.21 à Figura 6.28).

2.2.7.3. Permeação do extrato aquoso de folhas e talos de beterraba

Os ensaios de recuperação do extrato aquoso de folhas e talos de beterraba foram realizados na instalação de UF em modo de recirculação total (i.e. com recirculação do permeado e do concentrado para o tanque de alimentação). Antes da recolha da amostra de permeado o sistema

ficou a estabilizar durante 30 minutos, de forma a se atingir uma boa homogeneização da alimentação.

O fracionamento foi realizado através da permeação do extrato pelas membranas preparadas na Tabela 2.4.

Os ensaios de UF foram realizados com um volume de extrato de 4 L (para tal efetuou-se uma diluição de 1:1 do extrato preparado), à PTM de 1, 2 e 3 bar, caudal de circulação de alimentação de 180 L/h e a uma temperatura de aproximadamente 15°C. Neste estudo utilizou-se o mesmo extrato como alimentação, apenas recolhendo frações dos permeados, com um volume de aproximado de 20 mL, às PTMs 1, 2 e 3 bar nas cinco membranas estudadas, também foram recolhidas amostras da alimentação no início dos ensaios de permeação de cada membrana e no final (estas amostras foram denominadas AC20_A, AC22_A, AC25_A, AC28_A, AC35_A e AF).

O primeiro ensaio foi para a membrana AC20, a que apresentava a porosidade menor, e de seguida trocou-se a membrana na instalação de UF para a AC22 efetuou-se o estudo da permeação para esta membrana, e assim progressivamente até terminar o estudo com a membrana com maior porosidade (AC35). Na Figura 2.8 podem ser observados a coloração resultante da permeação pelas diferentes membranas, bem como da alimentação.



Figura 2.8. As frações dos permeados na PTM de 3 bar e as amostras da alimentação, da esquerda para a direita AC20_A, AC20_3, AC22_3, AC25_3, AC28_3, AC35_3 e A_Final.

2.3. Análise estatística

Para a análise estatísticas dos resultados obtidos utilizou-se o software Excel (versão do Microsoft Office 365 Proplus), o GraphPadPrism 5.0 e o IBM SPSS Statistics 25 – Análise de Componentes Principais (PCA). O desvio padrão utilizado nas retas de calibração foi determinado pelo GraphPadPrism 5.0.

O método de componentes principais (PCA) é uma análise estatística multivariada de dados cujo principal objetivo é a redução de dimensionalidade de um conjunto de dados. Assim, é possível reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados originais num conjunto de novas variáveis não correlacionadas, denominados componente principal (PC), estas novas variáveis são combinações lineares das variáveis originais e que permitem representar a máxima informação dos dados (190).

Neste trabalho utilizou-se a análise PCA para realçar a variância das quantificações dos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba preparados relativamente à sua bioatividade, também se aplicou esta metodologia para compreender o comportamento destas variáveis no fracionamento do extrato BDP pelas membranas em estudo, bem como a influência da PTM sobre as bioatividades exibidas pelas diferentes frações. Como as quantificações das diferentes variáveis não estavam na mesma escala utilizou-se uma matriz de correlação que permitiu padronizar as variáveis (191).

Capítulo 3: Resultados e Discussão

Este trabalho experimental compreendeu três etapas distintas, a primeira abordou o desenvolvimento de uma metodologia para preparação de extratos aquosos de folhas e talos de beterraba e a sua caracterização em termos de composição e atividades biológicas, a segunda incidiu sobre a utilização de um método de separação dos compostos presentes no extrato baseado na tecnologia de membranas e, por fim, a análise e caracterização das frações do extrato aquoso resultantes da permeação (permeados e alimentação) através das diferentes membranas preparadas de modo a identificar a fração onde se conseguiu maiores bioatividades. Adicionalmente foi feita a identificação e quantificação de compostos bioativos (CBs) presentes no extrato de modo a avaliar o potencial de valorização deste resíduo agrícola como fonte de compostos de elevado valor.

Na primeira etapa, foi utilizado um resíduo agrícola para preparar diferentes extratos aquosos de folhas e talos de beterraba. A caracterização dos extratos aquosos preparados permitiu identificar qual apresentava melhores resultados relativamente à sua bioatividade e conteúdo em CBs. Para tal, efetuou-se o doseamento dos fenóis totais (FT), dos hidratos de carbono e proteínas totais. Também se procedeu à avaliação da atividade antioxidante (DPPH) e a atividade inibitória sobre a acetilcolinesterase (AChE).

Mediante os resultados obtidos foi selecionado o extrato aquoso com extração assistida com o enzima (EAE) pancreatina (BDP), para as etapas subsequentes de recuperação de CBs através da tecnologia de membranas.

O fracionamento do extrato BDP através da tecnologia de membranas neste trabalho experimental ocorreu em modo de recirculação total e foram recolhidas frações às pressões transmembranares (PTM) de 1, 2 e 3 bar. Para tal, foram preparadas cinco membranas assimétricas de acetato de celulose através do método de inversão de fases, com porosidades diferentes, e caracterizadas em termos da sua permeabilidade hidráulica e do limite de exclusão molecular (MWCO).

A análise das frações resultantes das permeações das diferentes membranas, bem como das amostras da alimentação, foi efetuada em termos da composição de CBs e da sua bioatividade.

A identificação e quantificação de alguns CBs presentes nos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba e nas frações resultantes das permeações das membranas e das amostras da alimentação foi realizado através do método de cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC-DAD). A identificação dos CBs foi determinada por espectrometria de massa com elevada resolução (LC-QTOF-MS), para as frações resultantes das permeações pelas membranas à PTM de 3 bar e do extrato BDP.

No final, avaliou-se a hepatotoxicidade, das frações do permeados e do extrato BDP que apresentaram os melhores resultados, em linhas celulares humanas do cancro do fígado (Hep-G2), o que permitiu avaliar a sua citotoxicidade.

3.1. Caracterização dos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba

3.1.1. Doseamento dos compostos bioativos (CBs) presentes nos extratos aquosos

Os extratos aquosos foram preparados a partir das folhas e talos da beterraba por decocção (**Bdec**), por extração assistida pelo enzima pepsina (**BDG**), por extração assistida pelo enzima pancreatina (**BDP**) e pela extração assistida pelos enzimas pepsina e pancreatina (**BDC**), também foram preparados os respetivos controlos **BCG**, **BCP** e **BCC**, como descrito em 2.2.1. Com a utilização dos enzimas pepsina ou pancreatina pretendia-se simular a digestão parcial gástrica ou pancreática, respetivamente. Enquanto que para a simulação da digestão completa utilizaram-se ambos enzimas, pepsina e pancreatina.

Os extratos aquosos preparados foram quantificados em termos de fenóis totais (FT), hidratos de carbono e proteínas, de acordo com o procedimento experimental descrito em 2.2.3.1, 2.2.3.2 e 2.2.3.3, respetivamente, tendo-se obtido os resultados da Tabela 3.1 e Figura 3.1.

Tabela 3.1. Quantidade de FT, proteínas e hidratos de carbono presentes nos extratos aquosos preparados e respetivos controlos preparados como descrito em 2.2.1.

Extratos Aquosos	FT ($\mu\text{g GAE}/\mu\text{L}$)	Proteínas (mg BSA/mL)	Hidratos de Carbono (mg Glucose/mL)
Bdec	0.118 ± 0.022	2.159 ± 0.251	1.171 ± 0.075
BCG	0.234 ± 0.035	10.935 ± 0.951	3.187 ± 0.124
BDG	0.356 ± 0.005	21.057 ± 0.090	6.474 ± 0.106
BCP	0.237 ± 0.004	9.613 ± 0.736	2.650 ± 0.113
BDP	0.549 ± 0.030	23.838 ± 0.762	5.468 ± 0.048
BCC	0.237 ± 0.029	6.003 ± 0.571	1.885 ± 0.110
BDC	0.419 ± 0.002	24.557 ± 0.134	5.937 ± 0.117

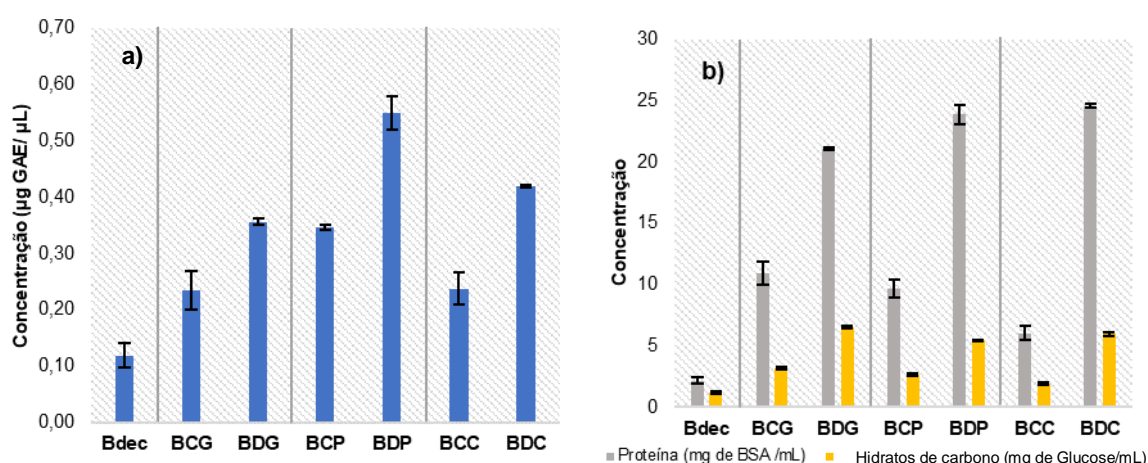


Figura 3.1. Quantificação dos CBs presentes nos extratos aquosos. **a)** FT expressos em $\mu\text{g GAE}/\mu\text{L}$ de extrato; **b)** proteínas (Pt) e hidratos de carbono (HC) expressos em mg BSA/mL e mg Glucose/mL de extrato, respetivamente.

Os CFs presentes em extratos de plantas constituem um dos maiores grupos de metabolitos secundários presentes em frutas, legumes, chás, e habitualmente são-lhes atribuídas

propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e outras propriedades biológicas (26), assim, por esta razão procedeu-se à quantificação dos FT nos extratos preparados. Como é possível verificar pela interpretação da Figura 3.1 a) (barras azuis), o extrato BDP apresentou o valor mais elevado em termos de FT, com uma concentração de 0,549 $\mu\text{g GAE}/\mu\text{L}$ de extrato. Este valor destacou-se dos extratos obtidos por extração assistida pela enzima (EAE) pepsina (BDG), da EAE com pepsina e pancreatina (BDC) e do extrato por decocção (Bdec). Os extratos obtidos pelas EAEs (BDG, BDP e BDC) apresentaram quantificações mais elevadas em FT (barra azul), proteínas (barra cinza) e hidratos de carbono (barras amarelas), em comparação com os extratos controlos das EAEs (BCG, BCP e BCC) que foram preparados nas mesmas condições, mas na ausência dos enzimas e o extrato por decocção (Bdec). Neste sentido, os enzimas associadas à digestão no trato gastrointestinal, como a pancreatina e pepsina, apresentaram maior eficiência de extração dos CFs presentes nas folhas e nos talos da beterraba. Esta elevada eficiência poderá estar associada à capacidade destes enzimas degradarem a estrutura celular, nomeadamente polissacáridos de parede celular e hidrolisar ligações entre alguns CFs e compostos celulares (192,193), o que proporciona melhor contato entre os compostos presentes no extrato e com o solvente, neste caso a água, aumentando a eficiência de extração dos compostos. A pepsina é uma enzima gástrica e digere proteínas por hidrólise das cadeias peptídicas, enquanto a pancreatina é uma mistura enzimática composta por amilase pancreática, lipase e protease que hidrolisam hidratos de carbono, lípidos e proteínas (192).

De ressaltar, no entanto, relativamente à quantificação de proteína, que esta foi efetuada pelo método de Bradford, esta baseia-se na ligação do Coomassie G-250 a grupos ionizáveis, sendo os extratos amostras heterogêneas de compostos, o valor de proteína registado poderá ter sido sobrestimado e devido não apenas às proteínas e aminoácidos presentes, mas a outros compostos interferentes (194).

Após secagem dos extratos preparados verificou-se ainda que o Bdec apresentava uma concentração em massa seca de extrato de 6.9 mg/mL enquanto que o BDP de 36.5 mg/mL, como demonstrado Tabela 2.1. A maior quantidade de massa seca no extrato BDP poderá estar relacionada com a capacidade do enzima pancreatina de extrair maior quantidade de compostos. Com base nas concentrações de extrato seco (EXS) dos extratos foi possível calcular o teor em FT de 17.122 $\mu\text{g GAE}/\text{mg EXS}$ e 15.037 $\mu\text{g GAE}/\text{mg EXS}$, respetivamente para a Bdec e BDP. De acordo com Koubairer *et al.* (157), os extratos de talos de beterraba extraídos com acetonitrilo apresentaram um conteúdo em FT de $10 \pm 0.5 \mu\text{g GAE}/\text{mg EXS}$, inferior aos extratos aquosos obtidos neste trabalho, mas ainda assim dentro da mesma ordem de grandeza. No estudo de Biondo *et al.* (195) que caracterizou as folhas de beterraba em diferentes tempos de germinação, e obtendo extratos com 40 % de metanol, foram obtidos resultados idênticos aos extratos BDP e Bdec. Assim, foi possível concluir que a extração assistida com enzimas apresentou uma capacidade de recuperação de CFs semelhante à extração com solventes orgânicos, sem a necessidade da utilização deste tipo de solventes.

Os extratos Bdec e BDP apresentaram resultados semelhantes a nível de quantificação de FT por extrato seco, o fato do enzima pancreatina ter maior capacidade de extração de CFs, leva a que seja necessária menor quantidade de solvente. Este fato permite uma extração com caráter mais ecológico e eficiente, com necessidade de menor quantidade de solvente, pois com a EAE com pancreatina utiliza aproximadamente 7,5x menor quantidade de solvente, e sem necessidade de utilização de temperatura elevadas (196).

Relativamente aos doseamentos das proteínas (Figura 3.1. barras cinzas) e hidratos de carbono (Figura 3.1. barras amarelas) estes apresentaram o mesmo padrão de variação entre os diferentes extratos que os FT, ou seja, os extratos resultantes das digestões enzimáticas apresentaram sempre valores mais elevados que os extratos dos controlos e da decocção. Na quantificação das proteínas dos extratos os resultados obtidos são semelhantes com os da bibliografia (169).

3.1.2. Determinação da atividade antioxidante – Capacidade de redução do radical DPPH

Foi efetuada a determinação da atividade antioxidante dos diferentes extratos, através do método DPPH, como descrito no procedimento experimental em 2.2.4, e os resultados estão expressos na Tabela 3.2. Também foram determinados ensaios controlos das atividades das soluções enzimáticas de pepsina (SG), pancreatina (SP) e pepsina com pancreatina (SC).

Tabela 3.2. Quantificação da atividade antioxidante (DPPH) dos diferentes extratos aquosos.

Extratos (1:100)	Bdec	BCG	BDG	BCP	BDP	BCC	BDC	SG	SP	SC
Atividade Antioxidante	21.74	33.58	42.73	37.31	72.64	20.65	62.04	6.22	2.21	5.90
DPPH (%)	± 2.820	± 3.905	± 3.676	± 3.107	± 3.600	± 3.131	± 3.786	± 1.464	± 0.841	± 1.524

Com a observação da Figura 3.2 verificou-se que as soluções de enzimas SG, SP e SC apresentaram valores muito baixos de atividade antioxidante, assim foi possível atribuir as quantificações determinadas para os extratos BDG, BDP e BDC apenas aos CBs presentes no extrato das folhas e talos da beterraba.

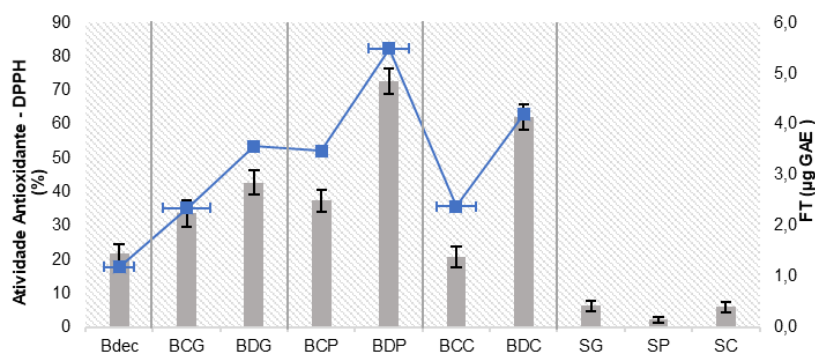


Figura 3.2. Quantificação da atividade antioxidante através do método de DPPH (barra cinza) e FT presentes nos extratos aquosos na determinação da atividade antioxidantes (marcador azul).

Na Figura 3.2 estão representadas as atividades antioxidantes dos diferentes extratos e soluções de enzimas (barra cinza) e a quantidade de FT presentes nos extratos aquosos para a determinação da atividade antioxidante (marcador azul). Permitindo analisar a quantidade de FT que cada extrato aquoso apresenta e a correspondente atividade antioxidante.

Como se pode observar na Figura 3.2, os extratos BDP e BDC apresentaram atividades antioxidantes (barra cinza) mais elevadas comparativamente os outros extratos aquosos estudados. Os extratos Bdec, BCG, BDG e BCP apresentaram aproximadamente a mesma atividade antioxidante e o extrato BCC inferior. Após análise do doseamento dos FT (marcadores azuis) com as atividades antioxidantes (barra cinza) foi possível verificar que existe uma relação direta, ou seja, os extratos com maior quantidade em FT foram também os que apresentaram atividades antioxidantes mais elevadas.

Na Figura 3.3 é uma representação da quantidade de FT presente em cada um dos extratos e a respetiva atividade antioxidante, foi possível verificar que existe uma relação de proporcionalidade direta, com correlação $R^2 = 0.8758$, entre a quantidade de FT presentes nos extratos aquosos e as atividades antioxidante por estes exibidas. Mais uma vez foi notório que o extrato BDP apresentou maior quantidade de FT e conseqüente também exibiu a atividade antioxidante mais elevada de todos os extratos. Estes resultados vão de encontro às referências que os CFs são CBs presentes nas plantas que apresentam uma elevada contribuição para atividade antioxidante exibida nos extratos de plantas (34).

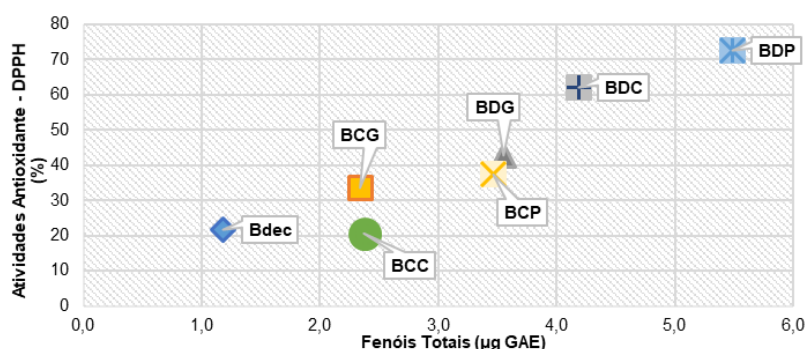


Figura 3.3. Relação entre FT presentes nos extratos aquoso e a sua atividade antioxidante (DPPH).

Com base nos valores determinados, poder-se-á fazer uma aproximação de que o extrato BDP apresentou 50 % da atividade antioxidante (IC_{50}) a uma concentração de 3.8 µg GAE/mL. Os valores encontrados na bibliografia foram sempre mais elevados e na ordem dos 19 µg GAE/mL para extratos de folhas e ramos de beterraba, para outros métodos de extração (157). Isto significa, com as devidas aproximações, que o extrato BDP obtido neste trabalho exibe uma atividade antioxidante superior ao referenciado pela bibliografia necessitando de concentrações inferiores de FT para obter a mesma atividade antioxidante, mais uma vez indicando o que o processo de extração aplicado foi eficiente.

3.1.3. Determinação da atividade inibitória do enzima Acetilcolinesterase (AChE)

Para a determinação da atividade inibitória do enzima AChE nos extratos preparados, recorreu-se ao procedimento descrito em 2.2.5.1, os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.3. Nas atividades inibitórias da AChE para os extratos BDP e BDC foi utilizado 50 µL de extrato.

Tabela 3.3. Determinação da atividade inibitória enzimática da AChE dos diferentes extratos aquosos.

Extratos	Bdec 1:10	BCG 1:10	BDG 1:10	BCP 1:10	BDP 1:20	BCC 1:10	BDC 1:20	SG 1:10	SP 1:10	SC 1:10
Atividade Inibitória AChE (%)	33.34 ± 0.927	58.93 ± 2.621	66.55 ± 0.713	53.69 ± 0.474	65.98 ± 1.138	44.42 ± 1.649	42.43 ± 2.255	0.520 ± 0.297	8.420 ± 1.625	22.78 ± 1.917

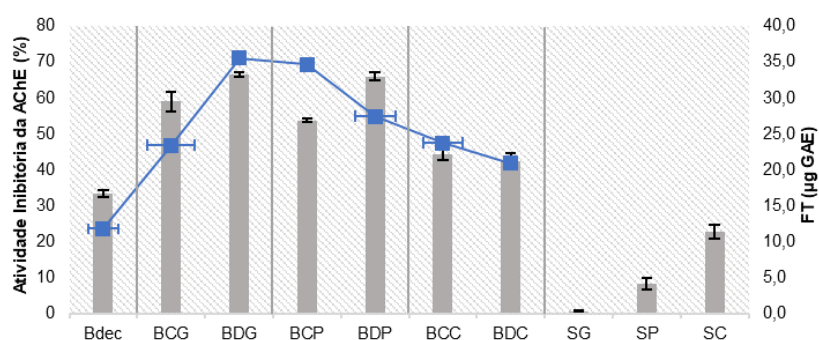


Figura 3.4. Determinação da atividade inibitória enzimática da AChE (barra cinza) e a quantidade de FT presentes nos extratos para cada ensaio (marcador azul).

Para determinar se as soluções de enzimas SG, SP e SC influenciavam a atividade inibitória da AChE, efetuaram-se estes controlos adicionais. Como é possível verificar na Figura 3.4 os extratos SG e SP não apresentaram atividade inibitória significativa sobre a AChE, assim foi possível atribuir as inibições da AChE determinadas apenas aos CBs presentes nos extratos BDG e BDP. Por outro lado, na quantificação do extrato SC este apresentou 22.78 % de inibição da AChE, assim sendo na quantificação da BDC foi necessário ter em consideração a atividade inibitória, com a devida correção o extrato BDC apresentou 31.04 % de inibição da AChE que possa ser atribuído apenas aos CBs presentes nos extratos.

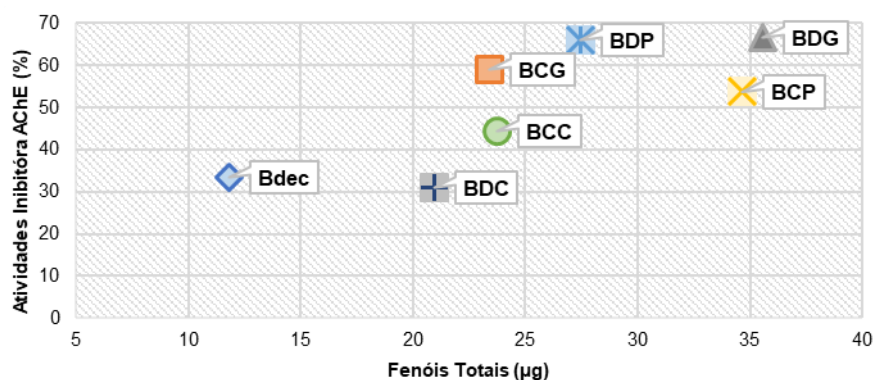


Figura 3.5. Relação entre FT presentes nos extratos aquosos e a sua atividade inibitória da AChE.

Pelos resultados obtidos, foi possível verificar que os extratos BDP e BDG são os que apresentam maior atividade inibitória sobre a AChE, de aproximadamente 65 %. Mas quando se avalia a quantidade de FT presente nos extratos responsáveis pela inibição da AChE, como representado na Figura 3.4 (marcador azul) e a Figura 3.5, a quantidade de FT presentes nos extratos nos ensaios de inibição da AChE foi de 27.44 µg GAE para o extrato BDP e de 35.56 µg GAE para o BDG. Portanto obtendo-se para BDP a mesma inibição da AChE para uma quantidade de FT inferior que no extrato BDG. Assim foi possível supor que a extração assistida pelo enzima pancreatina consegue extrair CFs que exibem maior bioatividade de inibição da AChE.

De uma forma aproximada, o extrato BDP apresentou 50% de inibição da AChE para uma concentração de aproximadamente 20.8 µg GAE/mL, enquanto o extrato BDG necessitou de uma concentração de aproximadamente 26.71 µg GAE/mL, neste tipo de quantificação nos extratos que exibem compostos mais bioativos usa-se menor concentração para apresentarem certa atividade, o que é o caso do BDP.

Após pesquisa bibliográfica relativa a estudos sobre a inibição da AChE em extratos de folhas e talos de beterraba verificou-se que até ao momento ainda não foram reportados estudos nesta temática.

3.1.4. Análise e identificação dos compostos

3.1.4.1. Cromatografia líquida de elevada performance HPLC – DAD

Os extratos aquosos das folhas e talos de beterraba foram analisados através de uma cromatografia líquida de elevada performance (HPLC-DAD) com uma coluna de fase reversa RP-8, descrita em 2.2.2.1, os cromatogramas obtidos são apresentados na Figura 3.6.

O perfil cromatográfico dos extratos foi muito semelhante em termos de número de compostos separados no HPLC. Após a análise dos cromatogramas dos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba, foi possível identificar onze picos de intensidade nos diferentes extratos.

O cromatograma da **Bdec** foi o que apresentou menor quantidade de compostos isolados e com picos com intensidades inferiores (Figura 3.6, Bdec).

Os extratos **BDP** e **BDC** (Figura 3.6) apresentavam um perfil cromatográfico muito semelhante, apenas variando na intensidade de absorvência dos diferentes picos, o extrato BDP exhibe no geral intensidades de absorvência superiores dos picos identificados.

Também foi importante realçar que os cromatogramas dos extratos BDP e BDC possuem uma linha de base elevada relativamente aos outros cromatogramas, este fato pode estar relacionado com a capacidade da digestão enzimática catalisar a degradação das paredes e das membranas celulares, libertando fibras frequentemente denominadas por mucilagens, estas são uma mistura de polissacáridos e outros polímeros presentes nestas estruturas das plantas (197). Como consequência da presença de mucilagens estes extratos apresentam cromatogramas com elevação da linha de base (24). Uma sugestão poderia ser a precipitação das mucilagens

presentes nos extratos BDP e BDC, com etanol através do métodos descrito por Ghanem *et al.* (197), mas implicaria uma nova etapa de processamento do extrato e utilização de solventes orgânicos.

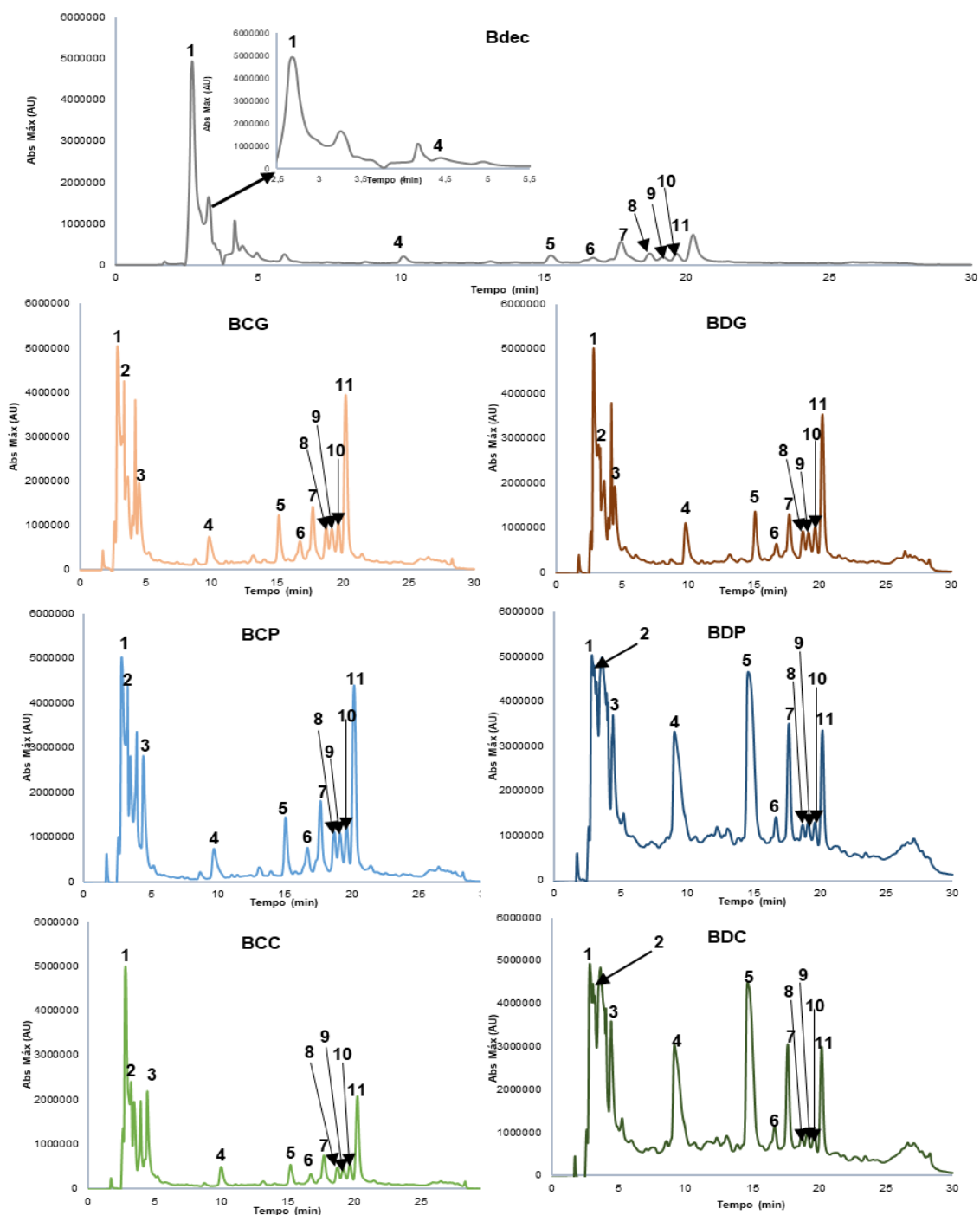


Figura 3.6. Cromatograma dos extratos aquosos de folhas e talos de beterraba: Bdec (com ampliação no intervalo de tempos de retenção de 2.5 a 5 min), BCG, BDG, BCP, BDP, BCC e BDC.

Quando se comparou os cromatogramas dos controlos das digestões enzimáticas denotou-se que o BCC apresentava menor intensidade em todos os picos e com menor resolução. Este fato poderá estar relacionado com as quatro horas de incubação do extrato o que pode conduzir à deterioração dos CBs presentes no extrato.

Relativamente ao extrato preparado por EAE com pepsina (BDG), verificou-se que quando comparado com o seu controlo (BCG) este não apresentou diferenças na intensidade dos picos separados, nem o isolamento de outros compostos. Isto pode explicar porque não exibem entre si diferenças relevantes nas bioatividades anteriormente quantificadas, atividade antioxidante e inibição da AChE. Também é importante realçar que foi efetuado o cromatograma do suco gástrico (SG) e os compostos presentes absorvem muito pouco, não influenciando nos cromatogramas do extrato BDG, como é possível visualizar no Anexo 2.1, Figura 6.4.

Nos cromatogramas BDP e BDC foi possível verificar que ocorreram diferenças relativamente aos controlos (BCP e BCC). Verificou-se um aumento considerável na intensidade dos picos dos compostos isolados, nomeadamente nos picos 3, 4, 5 e 6, e de forma mais evidente no 4 e 5, isto pode explicar o aumento na generalidade das bioatividades quando os extratos são obtidos por digestão enzimática com pancreatina relativamente aos controlos. Foi evidente o aumento da atividade antioxidante em ambos os extratos relativamente aos seus controlos e, no caso do extrato BDP, o aumento da inibição da AChE relativamente ao controlo BCP.

Quando se utilizou a solução contendo pancreatina, a SP e SC, verificou-se que estes cromatogramas apresentam alguns picos. Após a sobreposição destes cromatogramas com os dos extratos BDP e BDC (Anexo 2.1, Figura 6.5 e Figura 6.6), foi possível observar que ao tempo de retenção 10 e 15 min e, sobreponíveis com os compostos 4 e 5 em BDP e BDC, os picos presentes nos cromatogramas do SP e SC apresentam uma intensidade relativa muito inferior à dos referidos compostos e, portanto assumindo-se que os picos no cromatograma do extrato BDP e BDC são compostos presentes no extrato e não interferências das soluções de enzimas de extração.

Na Tabela 3.4, estão representadas as intensidades relativas dos picos maioritários identificados por HPLC-DAD dos compostos presentes nos extratos aquosos.

Tabela 3.4. Intensidade relativa dos sinais dos picos identificados obtidos por HPLC-DAD para os extratos aquosos das folhas e talos das beterrabas.

Composto	Bdec	BCG	BDG	BCP	BDP	BCC	BDC
1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2	ND	+++	++	+++	++	+	++
3	-	+	+	+	+++	+	+++
4	-	+	++	+	+++	+	+++
5	+	+	+	+	+++	+	+++
6	-	+	+	+	+	-	+
7	-	++	++	++	+++	+	+++
8	-	-	-	+	-	-	-
9	ND	+	+	+	+	+	+
10	-	+	+	+	+	-	+
11	-	+++	++	+++	++	+	++

O **composto 1** estava presente em todos os extratos aquosos preparados de folhas e talos de beterraba com um tempo de retenção de aproximadamente 2.8 min e o seu espectro UV-Vis (Anexo 2.2, Figura 6.7) apresentava máximos de absorvência aos comprimentos de onda 213 nm e 270 nm, com elevadas intensidade de absorvência. No entanto, este pico estava melhor resolvido no extrato Bdec.

Ao tempo de retenção de aproximadamente 3 min foi identificado o **composto 2**. O espectro UV-Vis do extrato BCG neste tempo de retenção está representado no Anexo 2.2, Figura 6.8, e verificou-se que neste tempo de retenção os extratos preparados apresentavam um composto com o espectro UV-Vis com o comprimento máximo de absorvência aos 540 nm, na zona do visível.

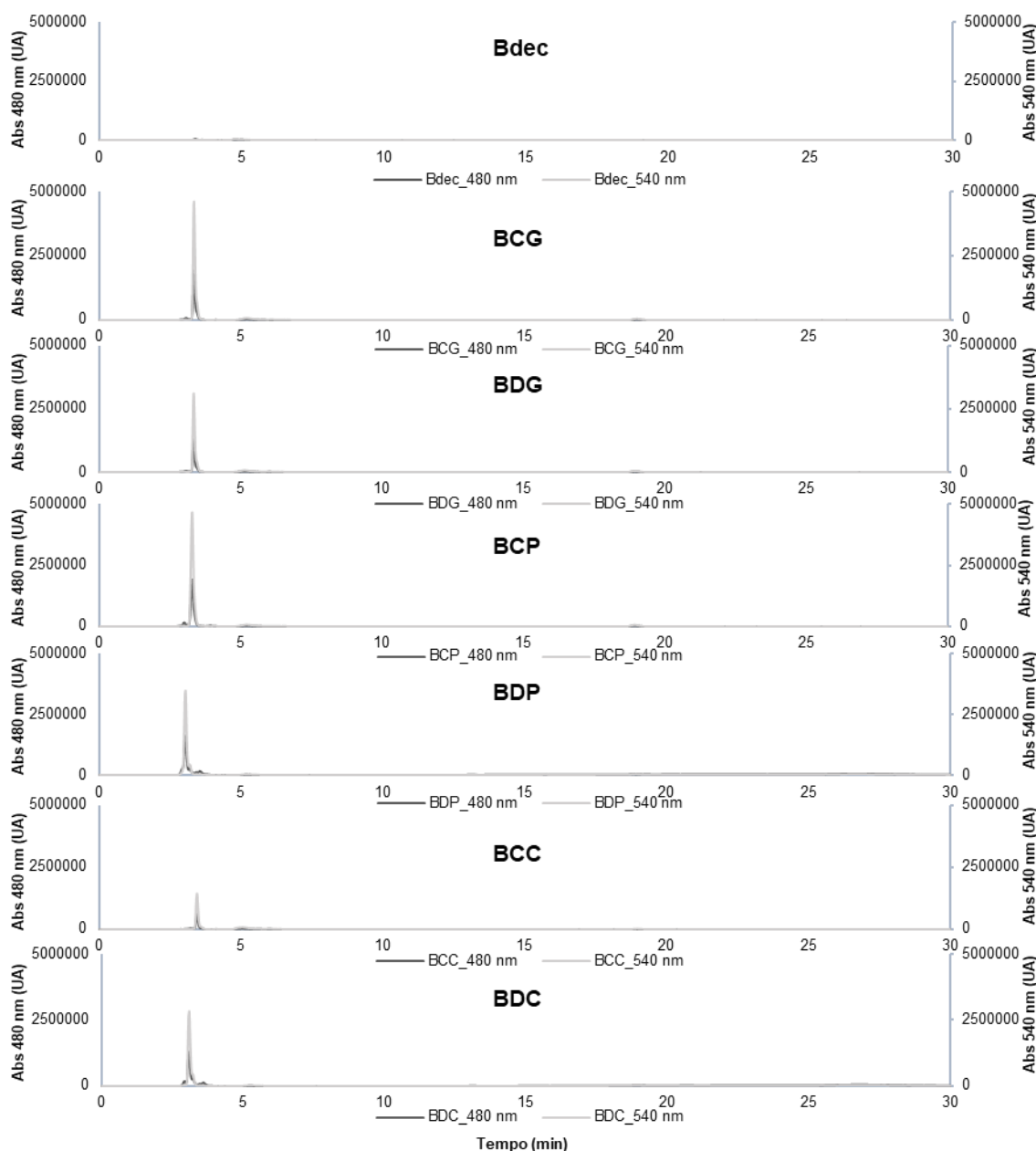


Figura 3.7. Cromatograma dos extratos Bdec, BCG, BDG, BCP, BDP, BCC e BDC no comprimento de onda de 480 nm e 540 nm.

Tendo em conta que as betalaínas são conhecidas por estarem presentes na beterraba (148) e que absorvem na região do UV-Vis de 540 nm e 480 nm, respetivamente as betacianinas e as betaxantinas (157). Por esta razão traçaram-se os cromatogramas dos extratos aquosos a estes comprimentos de onda (Figura 3.7), o que permitiu evidenciar a presença deste tipo de compostos nos extratos ao tempo de retenção de 3 min.

Da interpretação da Figura 3.7 foi possível verificar que no extrato Bdec não apresentava evidência de compostos com absorvência aos comprimentos de onda de 480 nm e 540 nm, possivelmente não possuindo na sua composição este tipo de compostos em concentração detetáveis. Este fato poderá estar relacionado com deterioração devido a temperaturas elevadas durante o período de tempo que decorreu a decocção o que já foi verificado por outros autores (198), e conseqüentemente a baixa bioatividade registada do extrato Bdec nos ensaios efetuados.

De seguida, traçou-se os espectro UV-Vis nestes tempos de retenção ao comprimento de onda de 540 nm podendo ser visualizado na Figura 3.8.

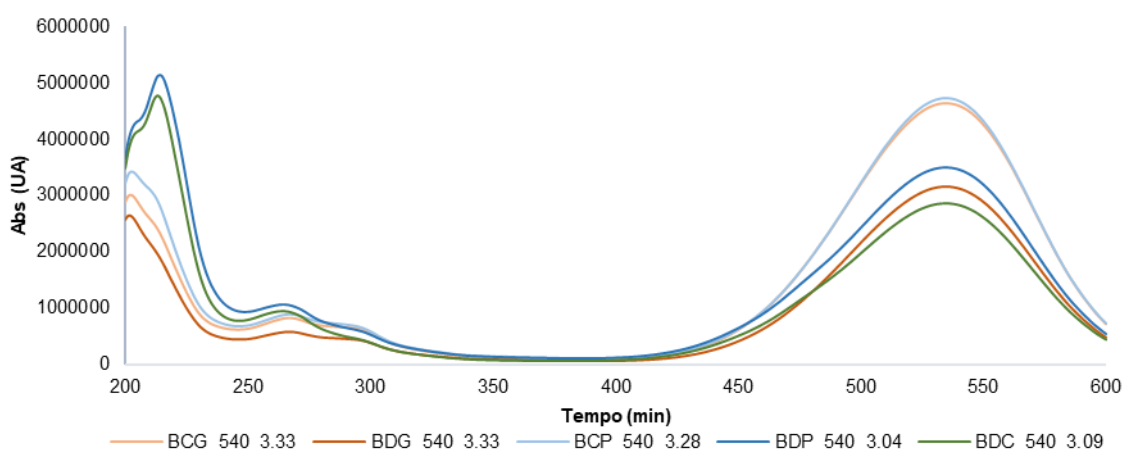


Figura 3.8. Espectros UV-Vis ao tempo de retenção de 3.3 min, composto 2 (betacianina) nos extratos BCG, BDG, BCP, BDP e BDC.

Foi possível deduzir que o **composto 2** pertencente à subclasse da betacianinas, com elevada probabilidade de ser uma betanina, pois apresenta um espectro UV-Vis semelhante ao referenciado pela bibliografia (199). Os extratos que apresentam maiores quantificações são os BCG e BCP, Figura 3.7, pois apresentam intensidades de absorvência mais elevada ao comprimento de onda de 540 nm. Este fato, leva a considerar que as extrações assistidas com enzimas (pepsina e pancreatina) não são vantajosas para a extração destes CBs. No entanto, as extração das betalaínas é favorecida numa razão solvente/extrato baixa, com a adição da solução enzimática verifica-se o aumento desta razão, como sugerido pelas intensidades de absorvência entre os extratos BCG e BCP e os extratos BDG e BDP (200,201).

Quanto às betaxantinas já foram identificados em extratos de folhas e talos de beterraba em menores quantidades que as betacianinas (64,157). Após análise da Figura 3.7 não foi possível detectar as betaxantinas nos cromatogramas com o comprimento de 480 nm.

Nos cromatogramas dos extratos da Figura 3.6 foi possível identificar o **composto 3**, ao tempo de retenção de aproximadamente 4.4 min, encontrando-se presente em todos os extratos aquosos, mas com elevada intensidade de absorvência nos extratos BDP e BDC e com pouca intensidade no Bdec, apresentando o comprimento de onda máximo aos 204 nm e 260 nm (demonstrado no Anexo 2.2, Figura 6.9).

O **composto 4** foi isolado em todos os extratos aquosos preparados, apresentando-se ao tempo de retenção de aproximadamente 9 minutos, mas os extratos BDP e BCP apresentam uma intensidade elevada relativamente aos outros extratos. O UV-Vis deste composto pode ser observado no Anexo 2.2, Figura 6.10, apresentou absorção máxima aos comprimentos de onda de 204 nm e de 257 nm. A extração deste composto parece ter sido intensificada pela extração com o enzima pancreatina. Tal como referido, apesar de ocorrer sobreposição de um pico do cromatograma da solução de pancreatina (SP) e solução de pepsina e pancreatina (SC) utilizadas para a preparação dos extratos BDP e BDC, respetivamente, no espectro UV-Vis pode verificar-se que o composto maioritário presente a este tempo de retenção não era proteína (Anexo 2.2, Figura 6.5 e Figura 6.6), dado que o UV-Vis apresenta uma baixa absorção ao comprimento de onda de 280 nm.

Nos cromatogramas da Figura 3.6 ao tempo de retenção de aproximadamente 15 min foi identificado o **composto 5**. Este composto isolado em todos os extratos aquosos, apresentava uma intensidade de absorvência muito superior nos extratos BDP e BDC, relativamente aos restantes extratos como também é possível observar na Tabela 3.4. Tal como referido, apesar dos cromatogramas do SP e SC apresentarem um pico a este tempo de retenção verificou-se que o composto que saía com este tempo de retenção apresentava nos extratos BDP e BDC intensidades muito superiores aos compostos presentes em SP e SC (Anexo 2.2, Figura 6.5 e Figura 6.6), Através da interpretação do UV-Vis do composto 5 (demonstrado no Anexo 2.2, Figura 6.11), verificou-se que este apresenta dois comprimentos de com absorvência máxima aos 220 nm e aos 275 nm.

Para identificar a presença de flavonoides nos extratos analisados, representou-se os cromatogramas ao comprimento de onda de 340 nm verificou-se que estes CFs se encontravam no intervalo dos tempos de retenção entre os 16 min e os 27 min (Figura 3.9), assim foi possível identificar os compostos que nos cromatogramas dos extratos exibiam picos que correspondiam aos flavonoides, nomeadamente do composto 6 a 11. Os cromatogramas dos extratos ao comprimento de onda de 340 nm apresentavam um perfil semelhante, mas variando consideravelmente na intensidade de absorvência dos picos nos diferentes extratos (Figura 3.9), verificando-se que os extratos Bdec e o BCC apresentavam quantidades inferiores de flavonoides e os extratos BDP e BDC apresentam picos de maior intensidade, nomeadamente um aumento de intensidade do pico correspondente ao composto 7.

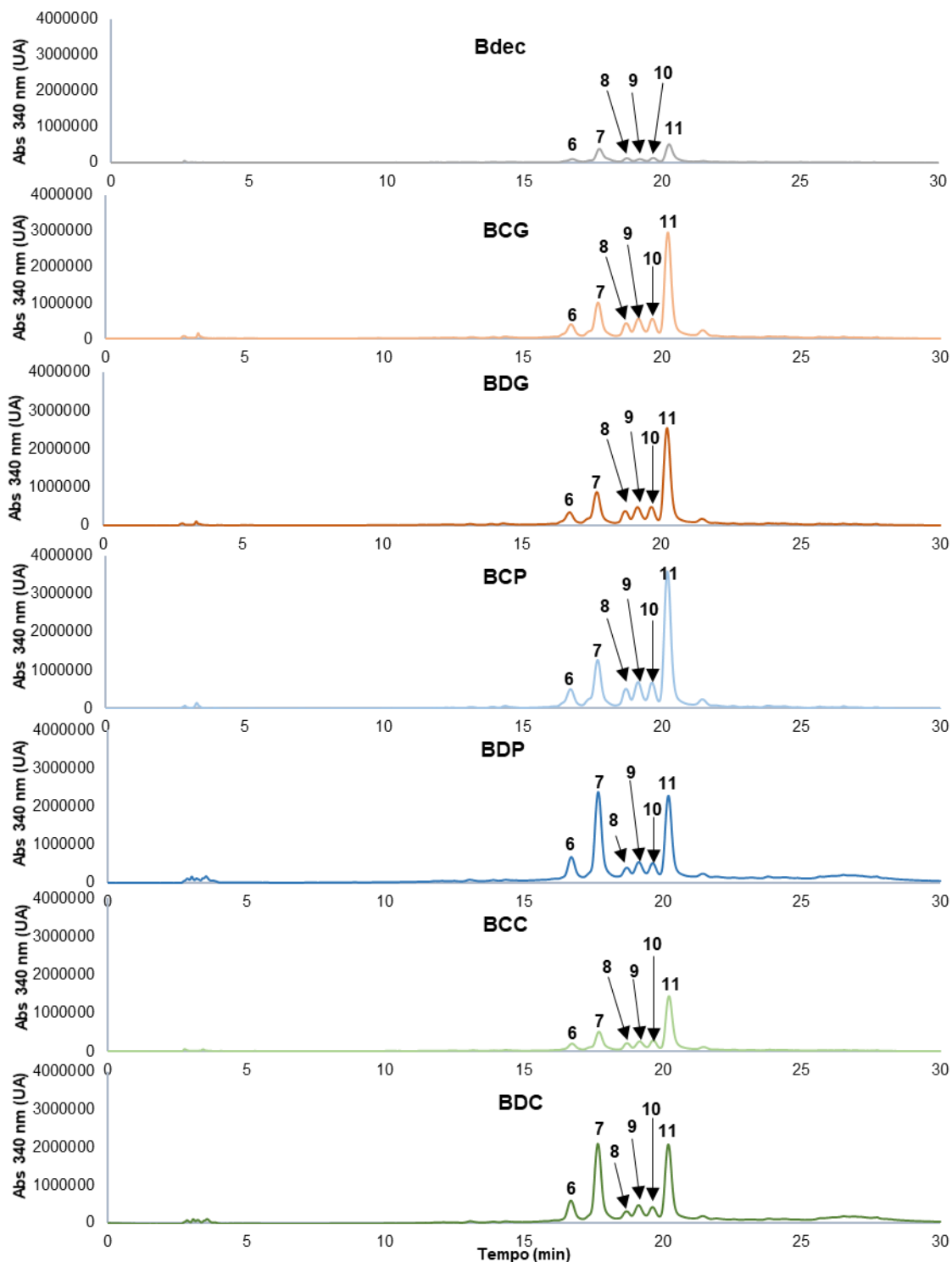


Figura 3.9. Cromatograma dos extratos Bdec, BCG, BDG, BCP, BDP, BCC e BDC no comprimento de onda de 340 nm.

Para efetuar a identificação dos CFs, efetuou-se a análise por HPLC-DAD dos seguintes padrões: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido gálico, rutina, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido clorogénico e vitexina. No Anexo 2.3, Figura 6.14 à Figura 6.20 podem ser observados os tempos de retenção dos flavonoides vitexina, rutina e do ácido ferúlico.

O **composto 6** dos cromatogramas das Figura 3.6 e da Figura 3.9, com um tempo de retenção de aproximadamente de 16.7 min encontra-se presente em todos os extratos. Este composto cujo espectro UV-Vis apresenta absorção máxima aos comprimentos de onda de 213 nm, 270 nm e 340 nm (Anexo 2.2, Figura 6.12), e, apresenta um espectro com um perfil característico de uma apigenina (33,202).

O **composto 7** dos cromatogramas da Figura 3.6 e Figura 3.9 apresentava um tempo de retenção de aproximadamente 17 min, e dado que possui uma absorção máxima ao comprimento de onda dos 340 nm poderá ser um flavonoide (Figura 3.10) (33,202). Pode-se supor que este composto é um apigenina glicosada, ou seja, um derivado da vitexina, e com a sobreposição dos espectros UV-Vis dos extratos como o padrão vitexina verificou-se que todos apresentam o mesmo perfil de absorção, como é visualizado na Figura 3.10.

No entanto, a vitexina possui dois isômeros a apigenina-6-C-glucosido e a apigenina-8-C-glucosido, sendo denominado como isovitexina e a vitexina. De acordo com a bibliografia, estes isômeros apresentam tempos de retenção diferentes, a vitexina sai sempre em primeiro lugar sendo o seu isômero (isovitexina) habitualmente identificado a tempos de retenção superiores aos da vitexina.(169).

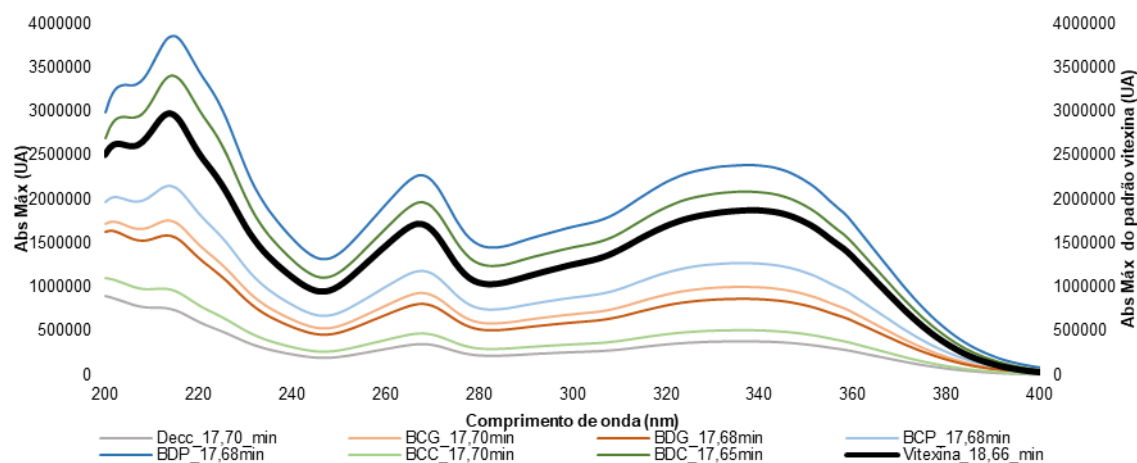


Figura 3.10. Espectros UV-Vis composto 7 (derivado da vitexina) nos extratos aquosos de folhas e talos de beterraba e o padrão vitexina 1 mg/mL.

Como é possível verificar pela análise da Tabela 3.4 os extratos BDP e BDC apresentam intensidades de absorvências mais elevadas relativamente aos outros extratos para este composto 7. Mais uma vez, foi possível relacionar o aumento de intensidade do pico correspondente à vitexina à extração assistida por pancreatina.

O **composto 8** dos cromatogramas das Figura 3.6 e Figura 3.9, poderá pertencer à classe dos flavonoides e pela observação do espectro UV-Vis foi possível verificar que absorve aos 255 nm e 350 nm (Figura 3.11). Tendo em conta a bibliografia foi possível supor que o composto 8 é um o flavonol, possivelmente a quercetina (203), no entanto o pico deste composto está presente com intensidade muito reduzida em todos os extratos aquosos.

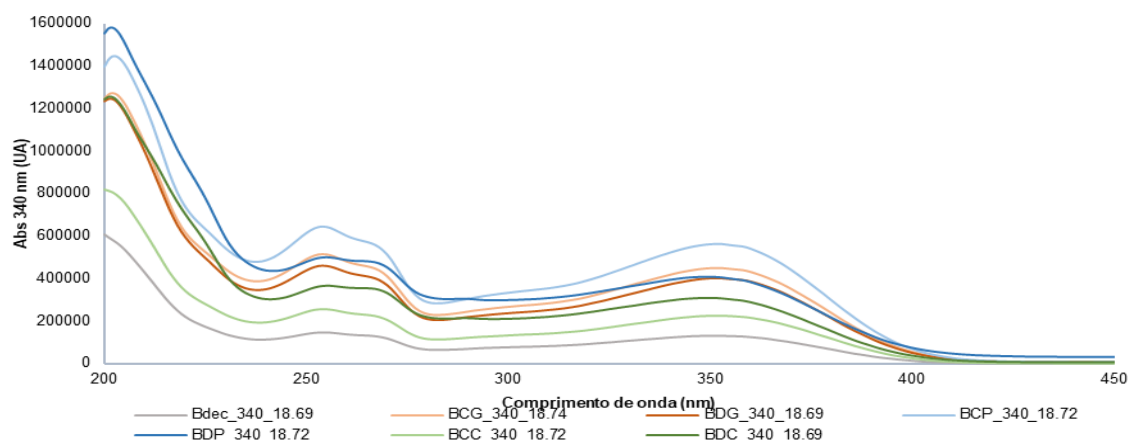


Figura 3.11. Espectros UV-Vis composto 8 (quercetina) nos extratos aquosos de folhas e talos de beterraba.

O **composto 9** com um tempo de retenção de aproximadamente 19.20 min (Figura 3.6 e Figura 3.9), encontrou-se em todos os extratos com pouca intensidade, exceto no extrato Bdec que não possui este pico resolvido. Verificou-se que o espectro UV-Vis deste composto apresenta absorções máximas aos comprimentos de onda 213 nm, 270, e 340 nm (Anexo 2.2, Figura 6.13), pode-se propor que este composto seja uma apigenina.

Nos cromatogramas da Figura 3.6, o **composto 10** poderá corresponder ao composto bioativo a rutina, um flavonol. Esta identificação efetuou-se através da comparação dos espectro UV-Vis dos extratos com o padrão da rutina 1mg/mL, e através do tempo de retenção do padrão rutina que corresponde com os tempos de retenção do composto 10 nos extratos aquosos preparados (Anexo 2.3, Figura 6.14 à Figura 6.20).

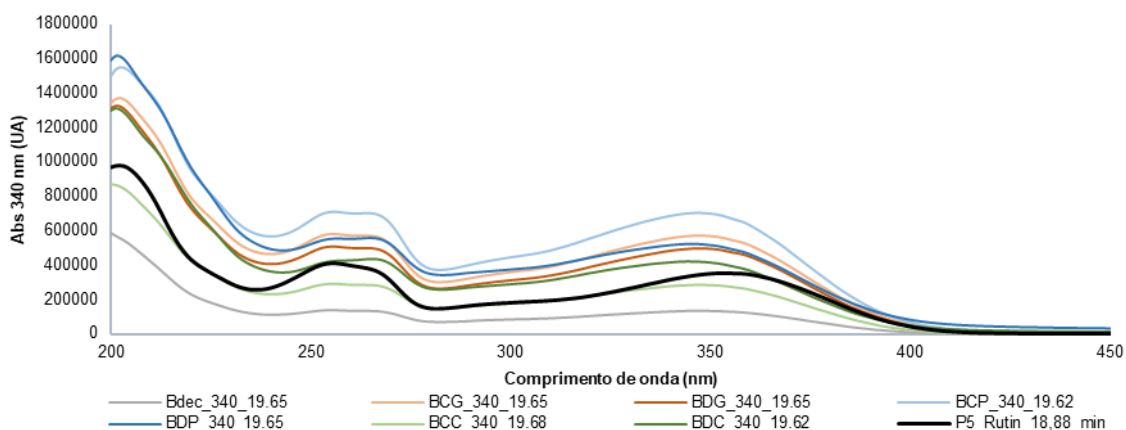


Figura 3.12. Espectros UV-Vis composto 9 (rutina) nos extratos aquosos de folhas e talos de beterraba e o padrão rutina 1 mg/mL.

A rutina (composto 10) está presente em todos os extratos aquosos preparados, no entanto apresenta variações. A rutina (composto 10) foi quantificada recorrendo ao valor máximo de absorvência do padrão (a 350 nm), sendo que a maior concentração foi obtida no extrato BCP, contendo 1.98 mg/mL, e o extrato Bdec apresenta a menor concentração, como é possível verificar pela observação da Figura 3.13.

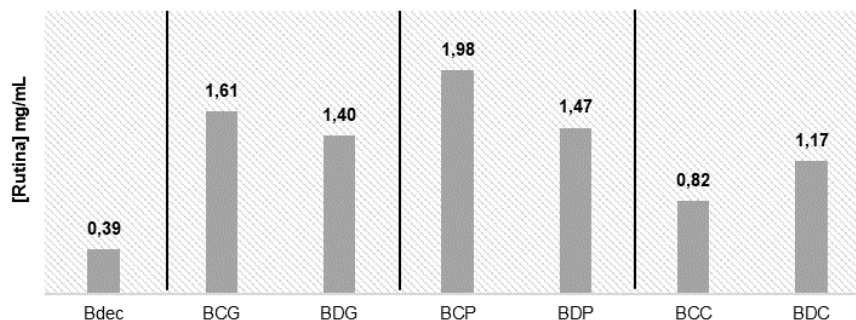


Figura 3.13. Quantificação da rutina (composto 10) nos extratos aquosos da beterraba.

Nos cromatogramas das Figura 3.6 e Figura 3.9 encontrou-se o **composto 11** com elevadas concentrações em todos os extratos aquosos, exceto no Bdec e BCC. Através da comparação do espectro UV-Vis com o padrão da vitexina 1 mg/mL (Figura 3.14), foi possível identificar o composto 11 como sendo o isômero da vitexina, um derivado da isovitexina.

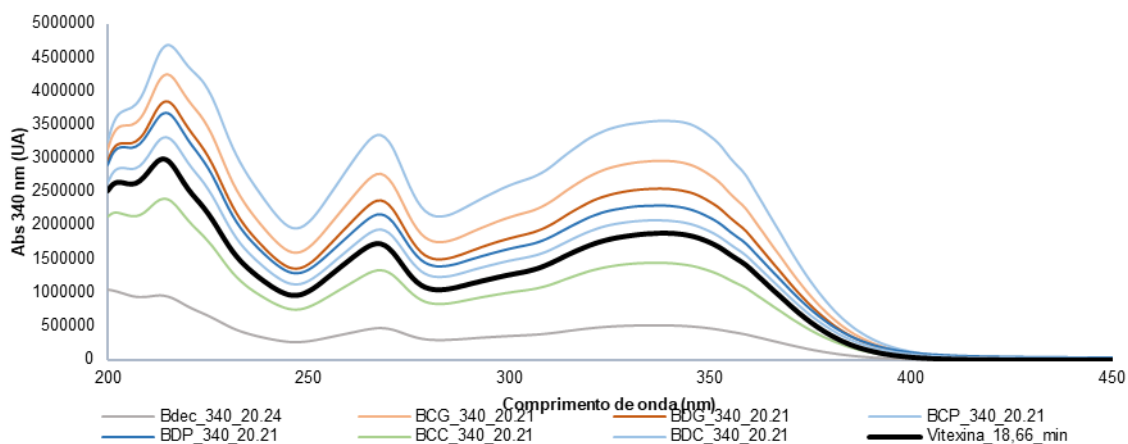


Figura 3.14. Espectros UV-Vis composto 11 (derivado da isovitexina) nos extratos aquosos de folhas e talos de beterraba e o padrão vitexina 1 mg/mL.

O derivado da vitexina (composto 7) e o derivado da isovitexina (composto 11) foram quantificados recorrendo ao valor máximo de absorvência do padrão vitexina, a 340 nm.

No entanto, a intensidade de absorvência do derivado da isovitexina (composto 11) nos diferentes extratos apresentou algumas diferenças relativamente ao derivado da vitexina (composto 7), como explicitado na Tabela 3.4, sendo que o derivado da isovitexina (composto 11) foi encontrada em maior concentração nos extratos controlo BCP e BCG e a vitexina (composto 7) foi encontrada em maior concentração nos extratos das digestões BDP e BDC.

Os isômeros desta apigenina glicosada, derivado da vitexina (composto 7) e da isovitexina (composto 11), variam na sua proporção dependendo do método utilizado na extração dos compostos presentes nas folhas e talos da beterraba. Assim é possível observar na Figura 3.15, a isovitexina (barra cinza) é a flavona predominante nos extratos BCG, BDG, BCP e BCC, enquanto que nos extratos Bdec, BDP e BDC a concentração da vitexina (barra amarela) aumentou, sendo que apresenta valores semelhantes à isovitexina (barra cinza).

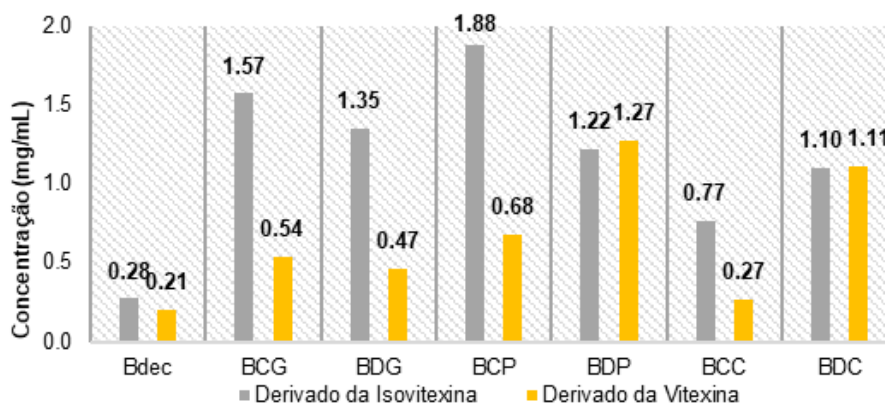


Figura 3.15. Quantificação do derivado da vitexina (composto 7) e do derivado da isovitexina (composto 11) nos extratos aquosos da beterraba.

O padrão de ácido ferúlico apresentou um pico sobreponível ao tempo de retenção de aproximadamente 21.40 min a um pico presente nos cromatogramas de alguns extratos aquosos de folhas e talos de beterraba (Anexo 2.3, Figura 6.14 à Figura 6.20). No entanto, verificou-se que o pico com este tempo de retenção não estava bem resolvido, impossibilitando a sua identificação.

É importante realçar que os CFs com maior intensidade de absorvência em todos os extratos das folhas e talos da beterraba foram os derivados da vitexina e da isovitexina. No entanto, os extratos BDP e BDC apresentaram os compostos 4 e 5 com elevadas intensidades de absorvência.

3.1.5. Identificação do extrato aquoso de folhas e talos da beterraba com maior bioatividade, aplicando a análise de componentes principais (PCA)

Os resultados da extração de CBs dos talos e folhas da beterraba foram analisadas usando a análise estatística por componentes principais (PCA). Esta análise foi útil para explicar a variância das quantificações nos diferentes extratos preparados neste trabalho.

A análise de componentes principais (PCA) realizada neste estudo permitiu relacionar todos os dados obtidos sobre as variáveis: capacidade antioxidante (método de DPPH), atividade inibitória do enzima AChE e o doseamento em FT, proteínas (Pt) e hidratos de carbono (HC) nos diferentes extratos analisados Bdec, BCG, BDG, BCP, BDP, BCC e BDC.

Com o PCA foi possível extrair dois componentes principais, PCEX_1 e PCEX_2, que representam as variáveis das quantificações efetuados para caracterizar e quantificar as bioatividades dos extratos aquosos. O PCEX_1 explica 79.02% da variância das variáveis e PCEX_2 explica 12.56% da variância das variáveis. Ambos explicam quase a totalidade da variância dos dados.

Tabela 3.5. PCA – Contribuições das variáveis FT, proteínas (Pt), hidratos de carbono (HC), atividade inibitória do AChE e atividade antioxidante (DPPH) dos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba. para o componente PCEX_1 e PCEX_2

	PCEX_1	PCEX_2
FT (µg GAE/µL)	0.916	0.209
Proteínas (Pt) (mg BSA/mL)	0.949	-0.264
Hidratos Carbono (HC) (mg Glucose/mL)	0.922	-0.168
Atividade Antioxidante – DPPH (%)	0.885	-0.300
Atividade Inibitória da AChE (%)	0.760	0.630

A Tabela 3.5 representa a matriz dos componentes que corresponde à correlação das variáveis com os componentes principais estimados. Verificou-se que a PCEX_2 aparentemente representa a relação da atividade inibitória da AChE com a composição em FT, enquanto a PCEX_1 representa a conjugação de todas as variáveis para os extratos, como demonstrado na Figura 3.16.

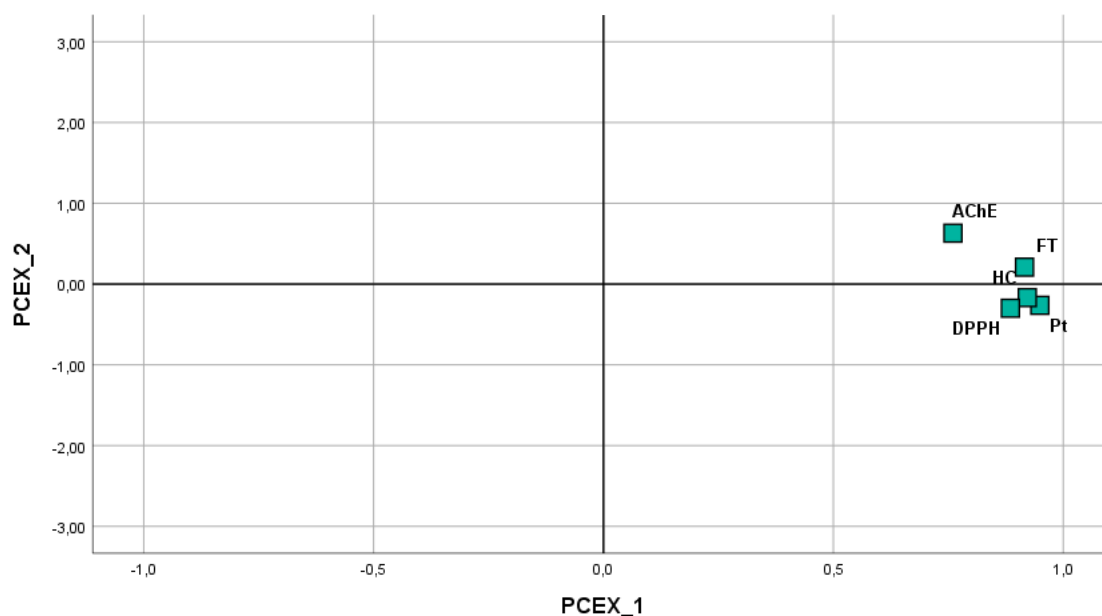


Figura 3.16. Distribuição das variáveis em estudo relativamente às variáveis extraídas através do PCA (PCEX_1 e PCEX_2): **AChE** – Atividade inibitória do enzima AChE (%); **FT** – Fenóis totais (µg GAE/µL); **HC** – Hidratos de carbono (mg Glucose/mL); **Pt** – Proteínas (mg BSA/mL); **DPPH** – Atividade antioxidante pelo método DPPH (%).

Com base nestes dados foi possível verificar, de acordo com a Figura 3.17, como os extratos aquosos se apresentam em relação às componentes principais PCEX_1 e PCEX_2 e às variáveis ao comparar com a Figura 3.16.

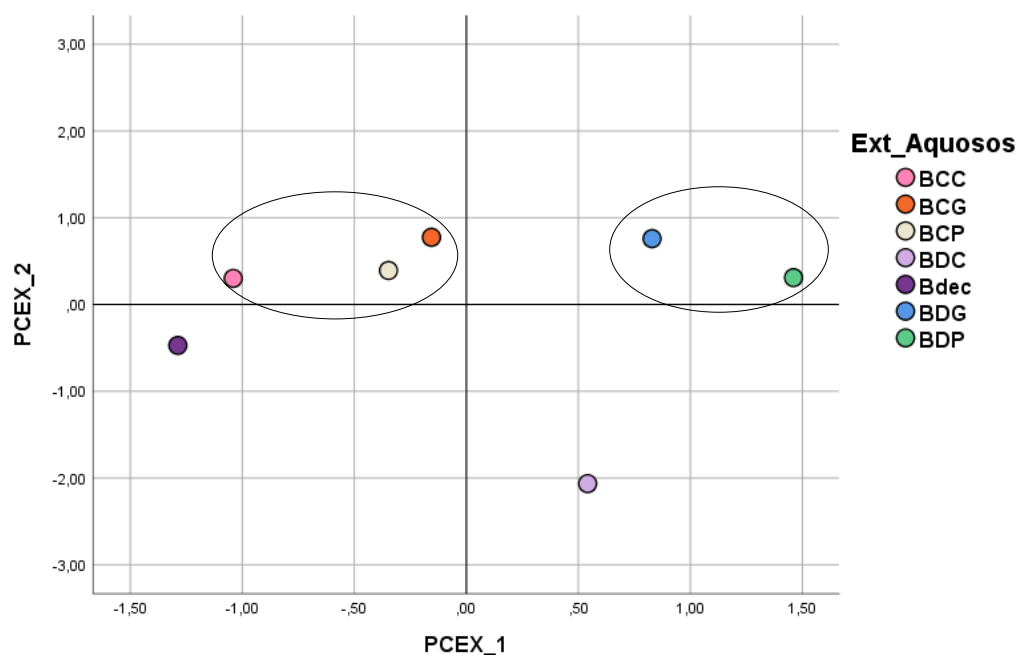


Figura 3.17. Extratos aquosos posicionados em relação das variáveis PCEX_1 e PCEX_2.

Os extratos controlos das digestões enzimáticas (BCG, BCP e BCC) agrupam-se num grupo como se pode verificar na Figura 3.17, apresentando características semelhantes com uma contribuição positiva para PCEX_2 mas negativa na PCEX_1. O Bdec foi o extrato que apresenta menor contribuição para PCEX_1 e segunda menor por parte da PCEX_2 daí a sua contribuição negativa para ambos componentes principais. O extrato BDC apesar de apresentar uma contribuição positiva para PCEX_1 mostra uma contribuição negativa para a PCEX_2, assim foi possível admitir que possui bioatividade como atividade antioxidante e uma atividade inibitória para AChE reduzida relativamente aos restantes. Por outro lado, foi possível agrupar o extrato BDG e BDP, sendo que o extrato BDG já apresenta maiores bioatividades para estes dois métodos estudados, pois apresenta contribuições positivas para PCEX_1 e PCEX_2. Por fim, o extrato BDP exhibe os melhores resultados para o PCEX_1 sendo este componente o que contribuiu em maior percentagem para todos as variáveis em análise e ainda apresenta uma contribuição positiva para PCEX_2. Assim foi possível concluir que possui as melhores características dos extratos aquosos em estudo, por esta razão foi o extrato aquoso BDP selecionado para efetuar o estudo de fracionamento do extrato através da tecnologia de membranas.

3.2. Separação e purificação do extrato BDP através da tecnologia de membranas.

3.2.1. Caracterização das membranas

As cinco membranas utilizadas nesta atividade experimental (AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35) foram preparadas e caracterizadas seguindo os procedimentos descritos em 2.2.7.1 e 2.2.7.2, utilizando uma instalação com duas membranas de acetato de celulose com uma área de

membrana de 147.84 cm². De seguida, serão apresentados os valores obtidos e determinados ao longo das atividades experimentais, tanto a nível da permeabilidade hidráulica (Lp) e limite de exclusão molecular (MWCO).

3.2.1.1. Determinação da permeabilidade hidráulica (Lp)

Para a determinação da permeabilidade hidráulica foi necessário realizar ensaios de permeação com água desionizada e determinar experimentalmente o fluxo volumétrico do permeado (Jp) a diferentes pressões transmembranares (PTM), e através das equações descritas em 1.5.2.1 foi possível relacionar graficamente estes dois parâmetros. Assim sendo, às PTM de 1, 1.5, 2, 2.5 e 3 bar, determinou-se a massa do permeado a um determinado tempo de recolha, e com estes valores foi possível calcular a fluxo volumétrico do permeado (Jp, kg/h.m²). Os valores de Jp foram corrigidos através da Equação 1.2 para a temperatura de 25 °C. Estes valores estão descritos no Anexo 3.

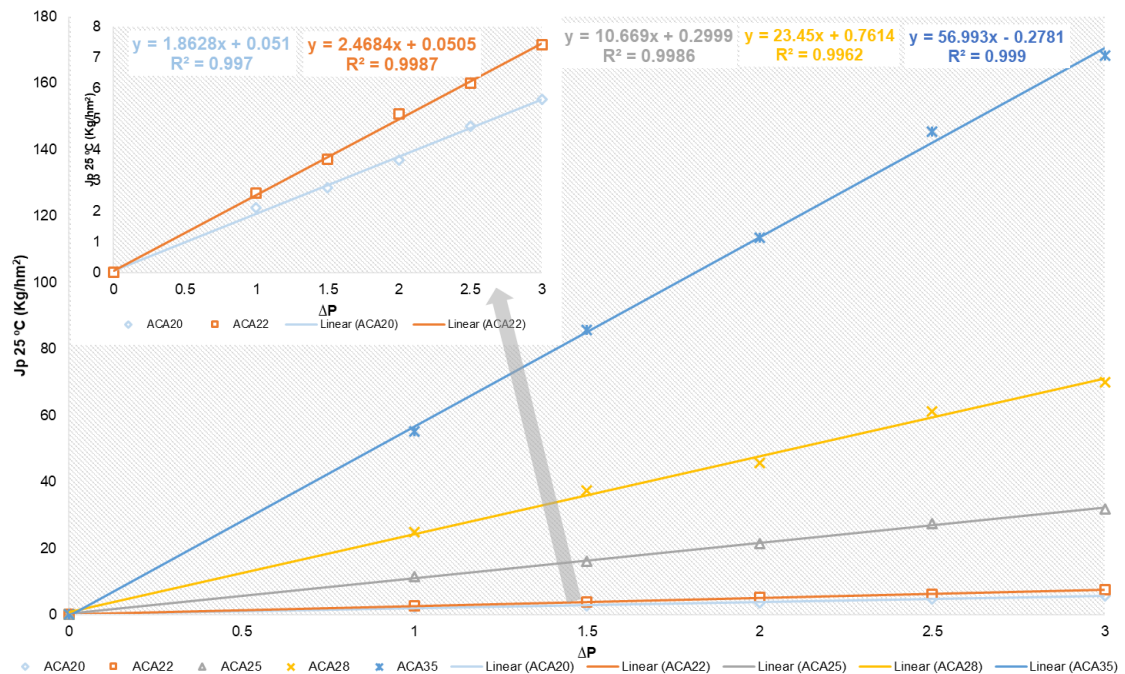


Figura 3.18. Determinação da permeabilidade hidráulica para as membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.

No gráfico da Figura 3.18 estão determinadas as Lps para as diferentes membranas estudadas neste trabalho experimental, ou seja, correspondem aos declives das retas que relacionam o Jp com a ΔP.

Os valores de Lp aumentam com o incremento da quantidade de formamida usada durante a preparação das membranas de acetato de celulose, dado que a formamida é a principal responsável pela porosidade apresentada na membrana (118,125,127). Os resultados obtidos na Tabela 3.6 encontram-se de acordo com os determinados por Minhalma *et al.* (132).

Tabela 3.6. Permeabilidade hidráulica (Lp) das diferentes membranas de UF.

Membrana	AC20	AC22	AC25	AC28	AC35
Lp (kg/m²hbar)	1.886	2.491	10.802	23.788	56.869

3.2.1.2. Determinação do limite de exclusão molecular (MWCO)

A capacidade de rejeição das membranas a solutos orgânicos neutros com massa molecular conhecida permitiu determinar o limite de exclusão molecular (MWCO) de cada membrana de acetato de celulose preparada neste trabalho experimental. Para tal, procedeu-se à preparação de soluções de PEG e DEX a 600 ppm e efetuou-se a sua permeação à PTM de 1 bar, como descrito na Tabela 2.5, sendo registado a massa do permeado, o tempo de recolha do permeado, a temperatura e determinada a concentração dos PEG e DEX nos permeados e nas alimentações (Anexo 4.2).

Para a quantificação da concentração dos DEX e PEG presentes nos permeados e alimentações recorreu-se a um detetor IR, e à construção de retas de calibração com padrões para cada DEX e PEG. No Anexo 4.1, da Figura 6.21 à Figura 6.28, estão representadas as retas de calibração dos solutos orgânicos de referência utilizados, que relacionam a área do pico no cromatograma ($\mu\text{RIU} \cdot \text{min}$) com a concentração (ppm).

Com base nestes valores foi possível determinar o coeficiente de rejeição aparente aos solutos orgânicos para as respetivas membranas (Tabela 3.7), para este cálculo recorreu-se à Equação 1.3.

Tabela 3.7. Coeficiente de rejeição aparente aos solutos orgânicos para as diferentes membranas à PTM de 1 bar, à temperatura de 25°C e caudal de circulação de alimentação de 180 L/h.

	AC20	AC22	AC25	AC28	AC35
PEG 1500	67%	66%	-	-	-
PEG 3000	89%	79%	62%	-	-
PEG 6000	97%	96%	75%	-	-
PEG 10000	-	-	95%	-	-
PEG 20000	-	-	-	-	34%
DEX 40000	-	-	-	93%	87%
DEX 70000	-	-	-	99%	92%
DEX 100000	-	-	-	100%	-

Para calcular o limite de exclusão molecular (MWCO) foi necessário representar graficamente o $\log(f/(1-f))$ (Anexo 4.3) em função da massa molecular (MM) dos solutos orgânicos para cada membrana. Após a construção das retas $\log(f/(1-f))$ vs MM (Anexo 4.4 da Figura 6.29 à Figura 6.33) foi possível determinar os limites moleculares, igualando a reta obtida para cada membrana ao valor 1. Os MWCOs das membranas de acetato de celulose preparadas podem ser observados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8. Limites de exclusão molecular (MWCO) das membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.

Membrana	AC20	AC22	AC25	AC28	AC35
MWCO (kDa)	3.8	4.6	8.6	32	62

Assim foi possível efetuar o fracionamento do extrato aquoso de folhas e talos da beterraba (BDP) através das diferentes membranas, sendo que o permeado AC20 vai apresentar os compostos com menores massas moleculares. E os extratos resultantes das permeações da membrana AC35 irão apresentar todos os compostos que permeiam através da membrana mais porosa, MWCO=62 kDa.

3.2.2. Ensaios de permeação do extrato BDP

Após a caracterização das membranas foi possível a realização do fracionamento do extrato aquoso BDP em modo de recirculação total (i.e. com recirculação do permeado e do concentrado para o tanque de alimentação) utilizando as membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTM de 1, 2 e 3 bar.

Após a preparação do extrato BDP foi efetuado a sua diluição em 1:1 com água desionizada, este extrato foi o utilizado nos ensaios de permeação pelas membranas preparadas. Nestes ensaios foram recolhidas amostras da alimentação antes dos ensaios de permeação pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35, sendo denominadas as amostras AC20_A, AC22_A, AC25_A, AC28_A e AC35_A, respetivamente. No final dos ensaios de permeação recolheu-se a amostra da alimentação correspondente à A_Final.

Com os dados experimentais obtidos, descritos no Anexo 5, foi possível calcular o fluxo de permeação à temperatura 25 °C (aplicando a Equação 1.2), estes são apresentados na Tabela 3.9.

Também se procedeu à determinação do Pr/PWP, este corresponde ao rácio entre o fluxo a 25°C obtido com frações permeadas e o fluxo de permeação obtido com água pura. É utilizado como indicador do desvio à idealidade, ou seja, permite comparar o comportamento do extrato utilizado com o comportamento que se obtém para a água (127). Este parâmetro foi determinado através da Equação 3.1.

$$\frac{Pr}{PWP} = \frac{J_p(25^\circ C)}{L_p \times \Delta P} \quad \text{Equação 3.1}$$

Na Tabela 3.9 pode verificar-se, como esperado, que os fluxos de permeação aumentam com o aumento da PTM e com o MWCO das membranas estudadas. No entanto, tal como Minhalma *et al.* (132) verificaram, a polarização de concentração/colmatação das membranas a quando do processamento de CFs, leva a uma redução significativa no fluxo de permeado, uma vez que a acumulação de solutos à superfície da membrana leva à formação de uma camada que funciona como resistência adicional à permeação, tal é verificado pelos valores baixos da razão Pr/PWP.

Minhalma *et al.* (132) observaram também que o aumento da PTM leva ao agravamento dos fenômenos de polarização de concentração/colmatação e consequente diminuição dos fluxos.

Tabela 3.9. Dados experimentais para as membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 relativos à variação do fluxo de permeação com a PTM a 25 °C (J_p 25°C) e Pr/PWP.

Fração	J_p 25°C (kg/h.m ²)	Pr/PWP
AC20_1	0.689	37%
AC20_2	1.546	41%
AC20_3	2.528	45%
AC22_1	1.382	47%
AC22_2	2.913	50%
AC22_3	4.082	46%
AC25_1	8.453	78%
AC25_2	17.483	81%
AC25_3	23.957	74%
AC28_1	19.546	82%
AC28_2	32.876	69%
AC28_3	40.218	56%
AC35_1	36.905	65%
AC35_2	47.228	42%
AC35_3	51.654	30%

Neste trabalho, este comportamento foi verificado para as duas membranas de maior MWCO, AC28 e AC35. No entanto, para a membrana de menor porosidade (AC20) verificou-se que o aumento da PTM leva ao aumento da razão Pr/PWP, o que demonstra que esta membrana é menos sensível aos fenômenos de polarização de concentração/colmatação.

3.3. Caracterização das frações dos permeados do extrato BDP

3.3.1. Análise e Identificação dos compostos na alimentação e nos permeados obtidos por tecnologia de membranas

3.3.1.1. *Cromatografia líquida de elevada performance HPLC – DAD*

As frações resultantes das permeações das cinco membranas às PTM de 1, 2 e 3 bar e das amostras da alimentação foram analisadas através de uma cromatografia líquida de elevada performance (HPLC-DAD) com uma coluna de fase reversa RP-8, como descrito em 2.2.2.1. Como já referido em 2.1.2 (equipamentos), foi utilizado um HPLC-DAD e coluna RP-8 de outra marca.

Após a análise das amostras da alimentação (AC20_A, AC22_A, AC25_A, AC28_A e AC35_A) foi possível verificar que apresentavam o mesmo perfil cromatográfico e com intensidades iguais. Por esta razão será apenas considerada a amostra da alimentação para a análise dos cromatogramas das frações resultantes das permeações. O cromatograma referente à alimentação, ou seja, o extrato BDP utilizado nos ensaios de permeação é apresentado na Figura 3.19.

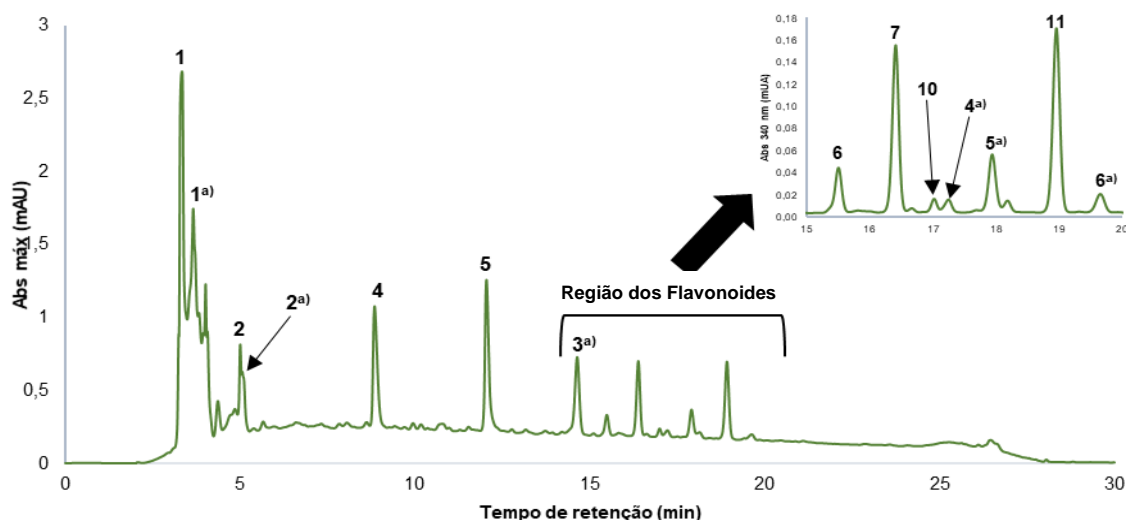


Figura 3.19. Cromatograma da intensidade de absorvência máxima da alimentação (extrato BDP) à concentração de 5 mg/mL, com ampliação da região dos flavonoides (15 ao 20 min) da intensidade de absorvência a 340 nm.

O cromatograma da amostra da alimentação, ou seja, do extrato BDP apresenta a globalidade dos compostos que foram extraídos pela extração assistida com o enzima pancreatina. O mesmo extrato já tinha sido apresentado na Figura 3.6 BDP, no entanto, nesta etapa do trabalho com a utilização de outro equipamento permitiu visualizar outros compostos nomeadamente os 1^{a)} e 2^{a)}, e em particular na região dos flavonoides, foi possível separar os compostos 3^{a)}, 4^{a)}, 5^{a)} e 6^{a)} (Figura 3.19).

Pela análise dos cromatogramas das frações dos permeados pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC38 nas PTM de 1, 2 e 3 bar (Anexo 6.1, Figura 6.34 à Figura 6.38), optou-se por fazer uma representação da variação da intensidade relativa de absorvência dos picos dos compostos separados nas diferentes frações dos permeados e da amostra da alimentação. Também é apresentado o comprimento de onda máximo de absorvência dos espectros UV-Vis bem como o tempo de retenção médio, na Tabela 3.10. Aparentemente não ocorreu muita variação entre os perfis cromatográficos dos diferentes permeados, neste sentido as frações recolhidas parecem ter mantido a maioria dos compostos presentes no extrato BDP, alguns dos quais já identificados como CBs, betalaínas, CFs e flavonoides. No entanto, o HPLC-DAD apenas consegue identificar compostos presentes no extrato de folhas e talos de beterraba (BDP) que possuam um grupo cromóforo forte (204), como é o caso dos CFs e as betalaínas. Desta forma, não consegue identificar todos os compostos presentes em extratos aquosos utilizando apenas esta técnica.

No entanto, a quantificação de FT, proteína total e hidratos de carbono (Anexo 7, Tabela 6.5) dos permeados e alimentação revelou que após a permeação pelas membranas ocorreu redução no conteúdo em hidratos de carbono e uma drástica redução (em média de 7 a 10 x) no conteúdo em proteínas e outros compostos relacionados e quantificados pelo método de Bradford, como referido anteriormente. Nos permeados verificou-se um enriquecimento em CBs, visto que ocorre uma redução significativa pelo menos em proteína.

O cromatograma da amostra da alimentação (Figura 3.19) foi o ponto de partida para a análise das frações resultantes das permeações pelas diferentes membranas nas PTM 1, 2 e 3 bar, e foi possível visualizar 14 compostos isolados na amostra da alimentação, alguns dos quais já referidos no item 3.1.4.1.

Os compostos isolados 1, 2, 4, 5, 6, 7, 10 e 11 já tinham sido identificados no cromatograma da Figura 3.6 BDP, os respectivos espectros UV-Vis podem ser observados no Anexo 6.2, Figura 6.39 à Figura 6.46.

Como já referido anteriormente, o **composto 2** pode tratar-se de uma betacianina (Figura 6.40) e encontrou-se presente em todas as frações analisadas com intensidade relativa semelhante (Tabela 3.10). Os picos com os tempos de retenção correspondentes dos **compostos 6, 7, 10 e 11** encontram-se dentro da região dos flavonoides, tal foi possível como anteriormente efetuar a identificação do **compostos 7** (Anexo 6.2 Figura 6.44) e do **11** (Anexo 6.2 Figura 6.46) como derivado da vitexina e o derivado da isovitexina, respetivamente (através da comparação com o padrão vitexina), enquanto o **composto 10** (Anexo 6.2 Figura 6.45) devido à comparação com os padrões foi possível efetuar a sua identificação como o flavonol rutina, como pode ser observado no Anexo 6.3, Figura 6.52.

No entanto, não foi possível a visualização no cromatograma da Figura 3.19 os picos correspondentes aos compostos 3, 8 (quercetina) e 9 anteriormente identificados no cromatograma do extrato BDP da Figura 3.6, o que poderá dever-se às condições de corrida cromatográfica terem sido diferentes.

Verificou-se pela observação do cromatograma da Figura 3.19 que apresenta picos, que não se encontravam resolvidos no cromatograma anterior da Figura 3.6 BDP, com os tempos de retenção e aos quais foi atribuída a notação de correspondentes compostos 1^a), 2^a), 3^a), 4^a), 5^a) e 6^a).

Nos permeados AC20_1 e AC20_2 verificou-se a diminuição de intensidade do pico correspondente ao composto 1^a) relativamente à alimentação. Por outro lado, todas as frações resultantes das permeações do extrato BDP apresentaram aumento de intensidade para os compostos 2^a), 5^a) e 11 (derivado da isovitexina), enquanto os picos correspondentes aos compostos 6 e 7 (derivado da vitexina) diminuíram de intensidade comparativamente à alimentação (extrato BDP). Também se verificou que o composto 4^a) apenas foi identificado no cromatograma da alimentação (extrato BDP).

O **composto 1^a)** apresenta um tempo de retenção de aproximadamente 3.6 min, e verificou-se que estava presente no geral em todas as frações analisadas com elevada intensidade, exceto nas frações AC20_1 e AC20_2 (Tabela 3.10). O UV-Vis correspondente a este composto pode ser visualizado no Anexo 6.2, Figura 6.47, denota-se que absorve principalmente aos 265 nm e aos 480 nm. Com base neste padrão de comprimento de onda máximo e no seu tempo de retenção, foi possível supor que o **composto 1^a)** é uma betaxantina (205).

Tabela 3.10. Intensidade relativa dos sinais dos picos obtidos por HPLC-DAD para as frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, C28 e AC35 nas PTM de 1, 2 e 3 bar e a respetiva alimentação. Intervalo de intensidade de absorvência: (++++): 3.0 – 2.0; (+++): 2.0- 1.0; (++) : 1.0 – 0.5; (+): 0.5 – 0.20; (-): 0.20 – 0.15; (ND) :≤ 0.15.

Composto	t _r (min)	λ _{máx}	Aliment.	AC20_1	AC20_2	AC20_3	AC22_1	AC22_2	AC22_3	AC25_1	AC25_2	AC25_3	AC28_1	AC28_2	AC28_3	AC35_1	AC35_2	AC35_3
1	3.3	220; 280	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 ^{a)}	3.6	265; 480	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2	5	270; 535	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
2 ^{a)}	5.11	223; 275	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
4	8.89	204; 257	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
5	12.08	218; 280	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
3 ^{a)}	14.67	224; 275; 340	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	15.48	270; 340	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	16.4	214; 270; 337	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	17.06	254; 267; 354	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4 ^{a)}	17.26	270; 340	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5 ^{a)}	17.95	269; 345	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	18.94	214; 270; 337	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6 ^{a)}	19.7	295; 323	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ao tempo de retenção de aproximadamente 5.10 min foi possível a visualização do **composto 2^a**, apresenta um UV-Vis com o comprimento de onda máximo a 223 nm e a 275 nm (Anexo 6.2 Figura 6.48).

O **composto 3^a** foi isolado em todas as frações com uma fraca intensidade de absorvência (Tabela 3.10). Como mencionado anteriormente, pertence à classe dos flavonoides pois absorve aos 340 nm (202), apesar de ser com menor intensidade, como pode ser observado no Anexo 6 Figura 6.49.

O **composto 4^a** pode ser visualizado no cromatograma da Figura 3.19, com um tempo de retenção de aproximadamente 17.06 min, não foi isolado nas frações dos permeados, apenas foi visualizado nos cromatogramas da amostra da alimentação (AC20_A), onde já se encontrava um pico de reduzida intensidade, como demonstrado na Tabela 3.10. O espectro UV-Vis deste composto pode ser observado no Anexo 6, Figura 6. 50, apresentando comprimento de onda máximo aos 270 nm e 340 nm.

Enquanto o **composto 5^a**, que corresponde ao pico do cromatograma da Figura 3.19 com um tempo de retenção de 17.95 min, pela análise do espectro UV-Vis deste composto (Anexo 6.2 Figura 6.51) foi possível supor que se trata de uma apigenina (pertencente à classe das flavonas).

No cromatograma da Figura 3.19 é visualizado o **composto 6^a**, com um tempo de retenção de aproximadamente 19.70 min, está presente em todas as frações estudadas. Através da sobreposição dos espectros do UV-Vis do composto 6^a) com o padrão do ácido ferúlico (Anexo 6.3 Figura 6.52), foi possível a identificação do composto 6^a) como um derivado do ácido ferúlico, como visualizado na Figura 3.20.

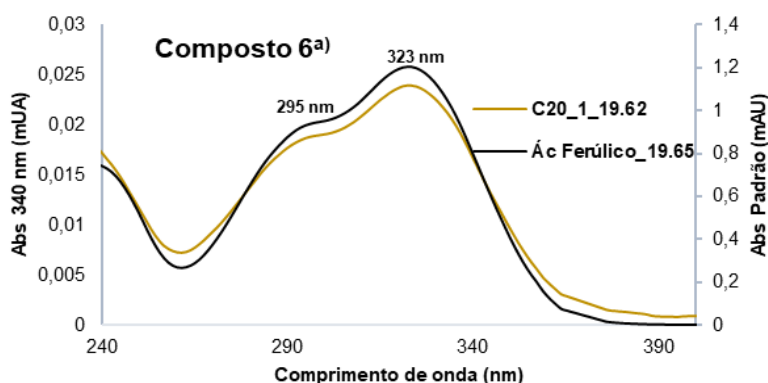


Figura 3.20. UV-Vis referente ao pico do **composto 6^a** presente nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, C28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e na amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL e o padrão ácido ferúlico à concentração de 1 mg/mL.

Com base nestes resultados efetuou-se a quantificação nos permeados e na alimentação do derivado da vitexina (composto 7), rutina (composto 10), do derivado da isovitexina (composto 11) e do derivado do ácido ferúlico (composto 6^a), relacionando a intensidade de absorvência máxima dos padrões (1 mg/mL) com as intensidades dos picos correspondentes nos

cromatogramas, estes valores podem ser visualizados na Tabela 3.11 e representados para simplificação na Figura 3.21. Para os derivados da vitexina (composto 7) e isovitexina (composto 11) foi utilizado por aproximação o padrão vitexina comercial através do valor de absorvência do espectro UV-Vis a 340 nm. Enquanto o valor de absorvência do espectro UV-Vis utilizado na quantificação da rutina e do derivado do ácido ferúlico foi de 350 nm e 323 nm, respetivamente.

Tabela 3.11. Quantificações do derivado da vitexina (composto 7), da rutina (composto 10) e derivados da isovitexina (composto 11) e ácido ferúlico (composto 6^a) ($\mu\text{g}/\text{mg}$ EXS) nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação.

Frações	Deriv. Vitexina (composto 7) ($\mu\text{g}/\text{mg}$ EXS)	Rutina (Composto 10) ($\mu\text{g}/\text{mg}$ EXS)	Deriv. Isovitecina (Composto 11) ($\mu\text{g}/\text{mg}$ EXS)	Deriv. Ác. Ferúlico (Composto 6 ^a) ($\mu\text{g}/\text{mg}$ EXS)
AC20_1	14.463	7.592	23.016	3.406
AC20_2	36.799	5.831	1.127	4.127
AC20_3	19.454	11.138	29.189	5.153
AC22_1	15.611	5.274	23.873	4.167
AC22_2	20.448	7.511	23.967	4.979
AC22_3	19.011	6.180	27.409	4.164
AC25_1	15.612	11.791	32.635	1.211
AC25_2	17.592	14.433	37.034	0.974
AC25_3	17.029	12.700	32.723	2.196
AC28_1	24.604	12.867	36.499	3.752
AC28_2	26.624	14.801	39.038	4.143
AC28_3	22.432	13.385	36.740	3.435
AC35_1	22.212	13.718	39.611	3.193
AC35_2	22.467	13.693	36.278	3.137
AC35_3	23.251	11.261	31.949	3.540
Alimentação	27.630	8.464	25.107	4.037

Pelas quantificações efetuadas e através da observação da Tabela 3.11 e Figura 3.21 foi possível verificar que no geral ocorreu o enriquecimento das frações permeadas pelas membranas AC25 (barras cinza), AC28 (barras laranja) e AC35 (barras azuis) em rutina (composto 10) e no derivado de isovitexina (composto 11) relativamente à alimentação (barras verdes). Para o derivado de vitexina (composto 7) só se verificou este enriquecimento para a membrana AC20 à PTM 2 bar, no entanto para o derivado do ácido ferúlico (composto 6^a) não ocorreu um evidente aumento nas frações permeadas, até porque a quantidade registada para este composto foi muito baixa.

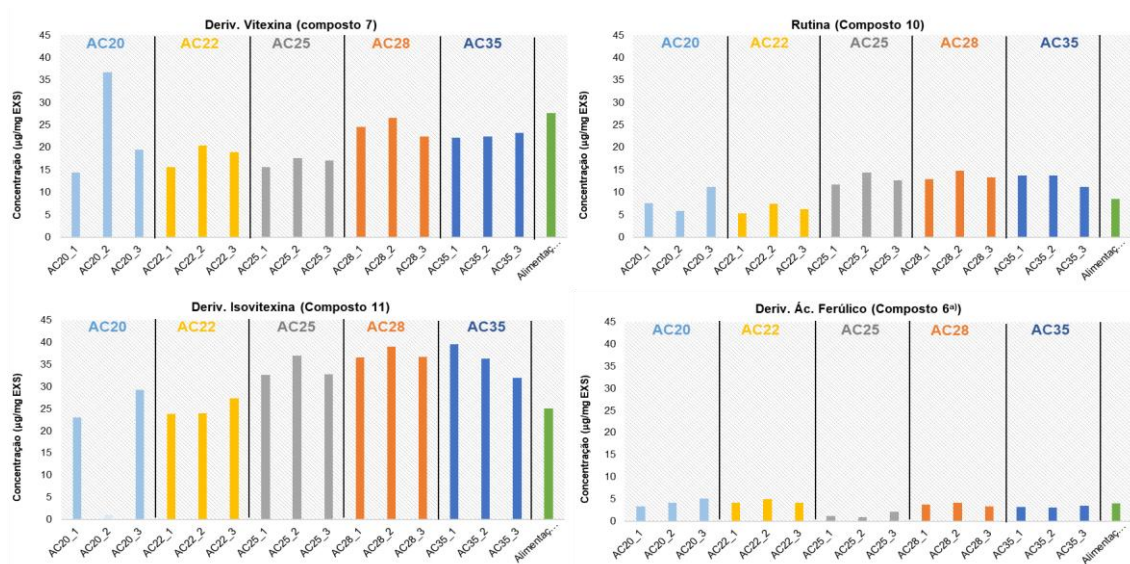


Figura 3.21. Quantificações do derivado da vitexina (composto 7), rutina (composto 10), do derivado da isovitexina (composto 11) e derivado do ácido ferúlico (composto 6ª) (µg/mg EXS) nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, C28 e AC35 às PTMs 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação.

3.3.2. Doseamento dos compostos bioativos (CBs) na alimentação e nos permeados obtidos por tecnologia de membranas

As frações resultantes das permeações pelas diferentes membranas e o extrato utilizado na alimentação foram quantificadas em termos de FT, hidratos de carbono e proteínas, de acordo com o procedimento experimental descrito em 2.2.3.1, 2.2.3.2 e 2.2.3.3, respetivamente, tendo-se obtido os resultados descritos no Anexo 7.

Tanto as frações dos permeados como a alimentação foram quantificados usando a mesma concentração de massa seca por mL de solução (10 mg/mL), na Figura 3.22 é possível observar o doseamento em FT. O valor da alimentação corresponde à quantificação média das amostras recolhidas da alimentação ao longo dos ensaios de permeação.

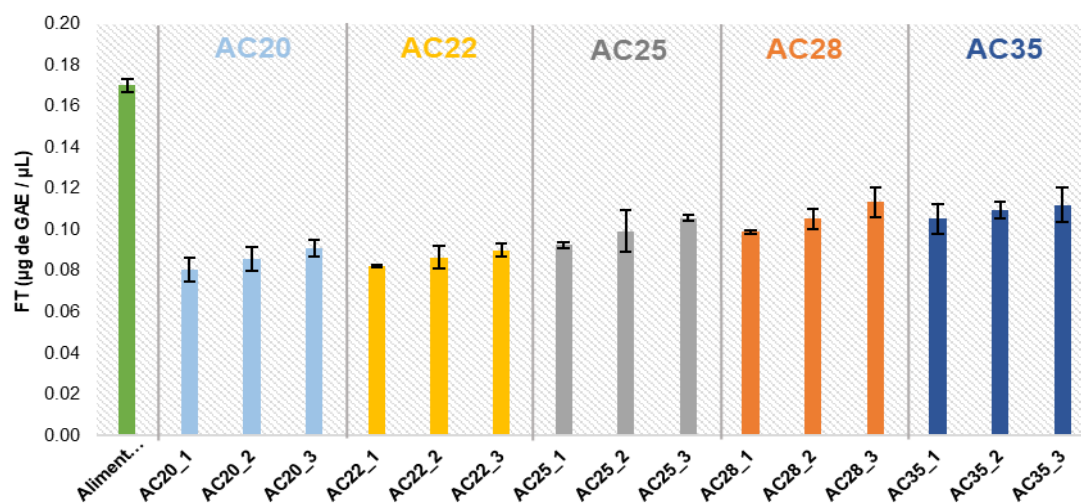


Figura 3.22. Concentração de FT (µg GAE/µL) para as frações dos permeados e alimentação.

Como seria espectável a alimentação apresentou uma concentração em FT ligeiramente mais elevada comparativamente às frações dos permeados, ocorrendo algumas perdas de FT durante o processo. Nas frações dos permeados correspondentes às membranas com menor MWCO (AC20, AC22 e AC25) obteve-se menores concentrações em FT que as membranas AC28 e AC35. Apesar dos CFs apresentarem massas moleculares relativamente mais baixas que o MWCO das membranas preparadas, uma vez que os CFs têm capacidade de se ligarem a outras moléculas (como oses, proteínas ou até mesmo ligados entre si) o que vai a afetar a sua rejeição pelas membranas (128). De acordo com os resultados obtidos por HPLC-DAD descritos anteriormente, nas frações verificou-se a presença de alguns CBs, já identificados flavonoides derivados da vitexina (composto 7), a rutina (composto 10) e o derivado da isovitexina (composto 11), o que corresponde a parte da contribuição para esta quantificação dos FT assumindo-se assim a presença de mais a identificar por espectrometria de massa.

No geral, pode verificar-se que as frações dos permeados na PTM de 3 bar apresentaram maiores quantificações em FT relativamente às outras pressões transmembranares.

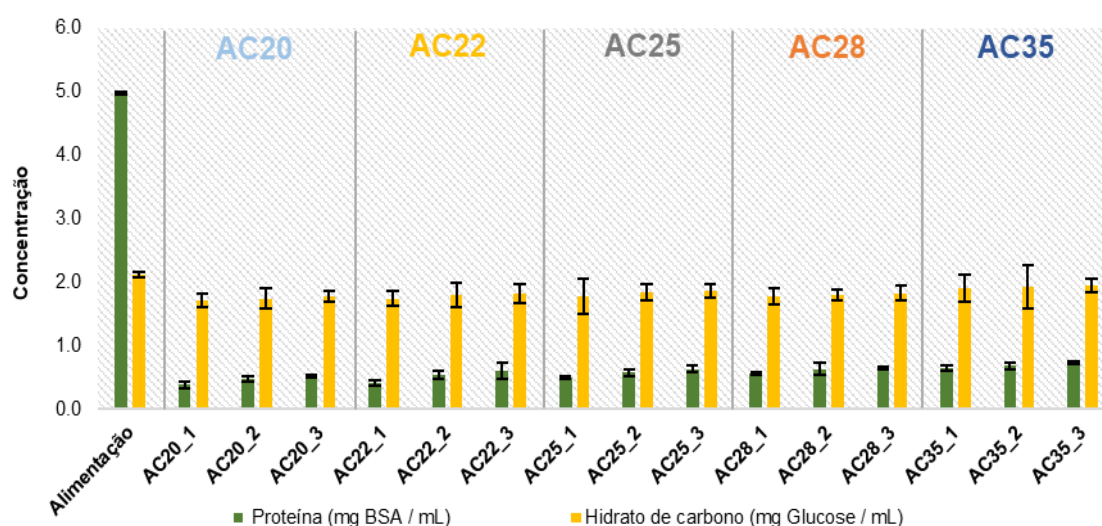


Figura 3.23. Concentração de proteína (mg BSA/mL) (barra verde) e de hidratos de carbono (mg glucose/mL) (barra amarela) para os extratos dos permeados e da alimentação.

Na Figura 3.23, pode verificar-se relativamente à quantificação das proteínas (barra verde na Figura 3.23) que todas as frações dos permeados apresentaram uma concentração muito inferior em proteínas em comparação com a da alimentação. Ou seja, utilizando a tecnologia de membranas foi possível efetuar a separação da maioria das proteínas ou outros compostos semelhantes presentes na alimentação (extrato BDP). Relativamente à quantificação de hidratos de carbono (barra amarela na Figura 3.23), verificou-se uma reduzida diminuição nas frações dos permeados comparativamente à alimentação.

Tabela 3.12. Concentração das frações dos permeados e da alimentação em termos de massa seca, a concentração de FT ($\mu\text{g GAE/mg EXS}$), proteína (mg BSA/mg EXS) e hidratos de carbono (mg Glucose/mg EXS).

Frações	Extrato seco (mg EXS/mL)	Fenóis Totais ($\mu\text{g GAE/mg EXS}$)	Proteína (mg BSA/mg EXS)	Hidratos de carbono (mg Glucose/mg EXS)
AC20_1	6.060	13.265	0.063	0.283
AC20_2	7.380	11.612	0.065	0.236
AC20_3	7.460	12.186	0.069	0.238
AC22_1	8.860	9.293	0.046	0.197
AC22_2	9.760	8.862	0.055	0.184
AC22_3	8.760	10.271	0.069	0.207
AC25_1	11.300	8.182	0.043	0.157
AC25_2	13.000	7.642	0.044	0.141
AC25_3	14.020	7.539	0.045	0.133
AC28_1	10.980	9.023	0.052	0.162
AC28_2	12.760	8.245	0.050	0.141
AC28_3	13.540	8.368	0.048	0.135
AC35_1	13.380	7.863	0.048	0.143
AC35_2	12.880	8.501	0.053	0.150
AC35_3	11.880	9.430	0.062	0.164
Alimentação	14.225	11.962	0.350	0.149

Na Tabela 3.12 é possível verificar que o extrato BDP, utilizado como alimentação para o processo de membranas, possuía 11.962 $\mu\text{g GAE/mg EXS}$, os permeados da membrana AC20 apresentam maior concentração de FT e hidratos de carbono por massa seca enquanto que a maioria dos outros permeados apresentou valores dentro da mesma ordem de grandeza. Tendo em conta que as membranas AC20 rejeitam compostos com massas moleculares superiores a 3.6 kDa e que, quer os CFs presentes nos extratos quer os hidratos de carbono resultantes da ação da pancreatina, serão de dimensões reduzidas obtiveram-se frações mais enriquecidas em FT e hidratos de carbono. No entanto, nas membranas de maior porosidade outros fenómenos poderão ter contribuído para se obterem valores ligeiramente inferiores de FT e hidratos de carbono nos permeados, nomeadamente estes poderem ter sofrido interações com compostos que permearam membrana o que limitou a sua quantificação.

3.3.3. Determinação da atividade antioxidante – Capacidade de redução do radical DPPH

A determinação da atividade antioxidante, através do método DPPH foi efetuada como descrito no procedimento experimental em 2.2.4 para a alimentação e todos os permeados, e os resultados estão descritos no Anexo 8 na Tabela 6.6.

Os valores indicados para a alimentação foram a quantificação média das amostras recolhidas da alimentação ao longo dos ensaios de permeação, apresentando esta atividade antioxidante de aproximadamente 27 %, como é possível observar na

A atividade antioxidante (barra cinza) das frações dos permeados resultantes das AC25, AC28 e AC35 nas PTMs de 1, 2 e 3 bar apresentaram um comportamento linear com a quantidade em FT presentes nas diferentes frações, obtendo-se uma correlação de 0.8253 (Anexo 8 na Figura

6.53). Pela análise da no geral verificou-se que as frações resultantes das permeações pelas membranas à PTM de 3 bar exibiram atividades antioxidantes mais elevadas (barra cinza).

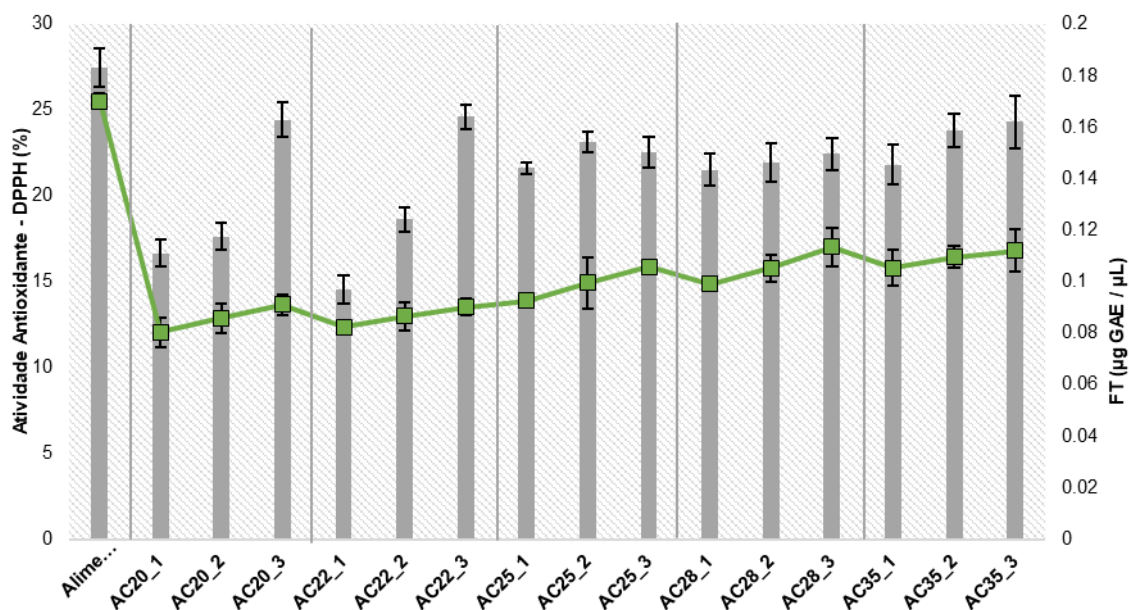


Figura 3.24. Quantificação da atividade antioxidante pelo método DPPH (barra cinza) e FT (marcador verde) presentes nas frações dos permeados e das respectivas membranas.

Pela análise da Figura 3.24, verificou-se ainda nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20 e AC22 que os permeados resultantes da PTM de 3 bar exibiram maiores atividades antioxidantes (barra cinza), no entanto apresentando concentrações de FT (marcador verde) semelhantes aos permeados das PTM de 1 e 2 bar. Este fato pode dever-se aos CFs que foram isolados à PTM de 3 bar por estas membranas apresentarem maior atividade antioxidante que os CFs isolados às outras PTMs.

Numa aproximação pode referir-se que a alimentação apresentou 50 % da atividade antioxidante a uma concentração de FT aproximada de 3.1 µg GAE/mL de extrato (Anexo 8 na Tabela 6. 7), valores semelhantes aos determinados anteriormente neste trabalho no item 3.1.2. Verificou-se que todas as frações dos permeados apresentaram concentrações inferiores para exibirem 50% da atividade antioxidante, principalmente os permeados à PTM de 3 bar, tendo sido os permeados AC20_3 e AC22_3 a apresentaram melhores atividades biológicas com 50% da atividade antioxidante a uma concentração aproximadamente 1.86 µg GAE/mL em FT.

3.3.4. Determinação da atividade inibitória do enzima acetilcolinesterase (AChE)

Para a determinação da atividade inibitória do enzima AChE, recorreu-se ao procedimento descrito em 2.2.5.1, sendo que os resultados obtidos estão descritos no Anexo 9 na Tabela 6.8. Esta quantificação foi realizada para os permeados à PTM de 3 bar e duas amostras da alimentação, pois tal como referido anteriormente estas frações apresentaram atividade antioxidante mais elevadas.

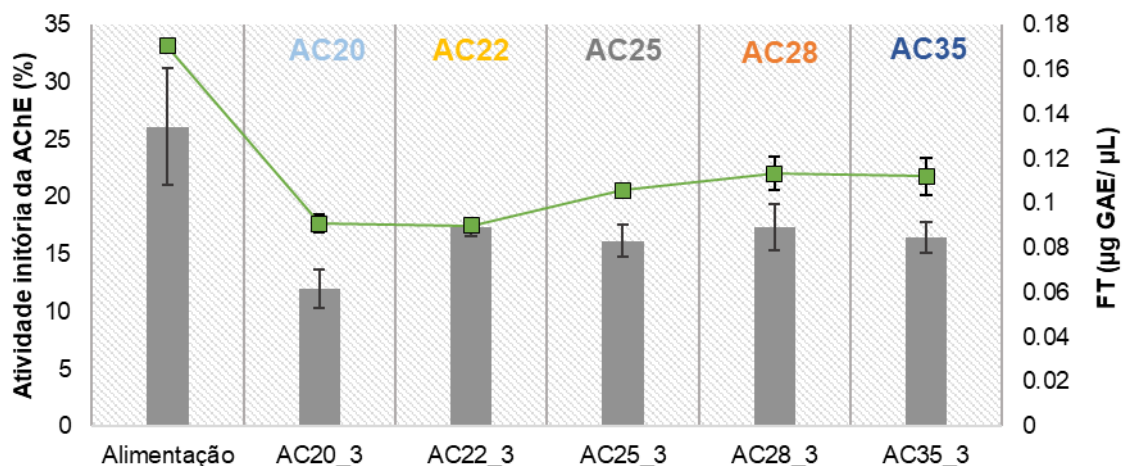


Figura 3.25. Determinação da atividade inibitória enzimática da AChE (barra cinza) e a quantidade de FT (marcador verde) presentes nas frações dos permeados para a PTM de 3 bar e da alimentação inicial e final.

Verificou-se que a alimentação apresentou maior atividade inibitória da AChE que os permeados, sendo a fração do permeado da membrana AC20 a que apresentou a menor atividade inibitória da AChE. Assim foi possível considerar que os FT isolados por esta membrana não apresentam atividade significativa sobre a inibição da AChE.

Foi possível ainda verificar que a fração do permeado da membrana AC22 apresentava a maior percentagem de inibição do enzima AChE de 17.35 ± 0.816 %, possuindo no entanto das menores quantificações de FT (marcador verde). Assim, foi possível supor que o permeado da membrana AC22, apresenta maior atividade inibitória, correspondendo aos FT que possuem maior bioatividade.

Quanto à alimentação aproximou-se 50 % da atividade inibitória da AChE a uma concentração de aproximadamente $33.26 \mu\text{g GAE/mL}$ (Anexo 9 na Tabela 6.8), valor superior ao determinado anteriormente para o extrato BDP no item 3.1.2, onde este apresentou $20.79 \mu\text{g GAE/mL}$ para 50% da atividade inibitória da AChE. Neste sentido, foi possível atribuir esta perda de atividade enzimática a alguma deterioração dos compostos presentes na alimentação durante os ensaios de permeação, ou à alteração do procedimento descrito no 2.2.1, pois na tentativa de extrair maior quantidade de CBs, efetuou-se 3 lavagens do *pelet* resultante das centrifugações após a incubação.

O mesmo tipo de aproximação indicou que as frações dos permeados apresentaram valores para 50 % da atividade inibitória da AChE de aproximadamente $35 \mu\text{g GAE/mL}$, com exceção do permeado AC22_3 com $25.92 \mu\text{g GAE/mL}$ (Anexo 9 na Tabela 6.8). Validando desta forma que o permeado com atividade biológica mais elevada foi a fração resultante da permeação à PTM de 3 bar pela membrana AC22.

A bioatividade quantificada neste permeado poderá dever-se aos derivados da vitexina que foram concentrados no permeado desta membrana com MWCO de 4.6 kDa como referido anteriormente na Tabela 3.11 Na bibliografia foi reportado que as apigeninas C-glicosídeas

(vitexina e isovitexina) apresentam atividades demonstradas sobre a inibição da AChE, e consequentemente sobre as doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (206). Para além disso, de acordo com Choi *et al.* (207), verificou-se que a isovitexina apresentava maior inibição sobre AChE que a vitexina e nos permeados da membranas AC22 verificou-se um aumento da concentração da isovitexina (composto 11) o que poderá justificar a sua bioatividade.

3.3.5. Identificação da fração dos permeados com maior bioatividade, aplicando a análise de componentes principais (PCA)

Quando a magnitude das variações é pequena, por vezes torna-se pouco perceptível a variação dos dados, neste sentido é útil a utilização do PCA que vai permitir a análise estatística da relação entre os diferentes permeados. Os dados obtidos das quantificações das frações dos permeados e das amostras das alimentações foram analisados utilizando uma análise estatística por componentes principais (PCA). Esta análise será útil para explicar a variância das quantificações nas diferentes frações dos permeados e das amostras da alimentação.

A análise de componentes principais (PCA) realizada neste estudo permitiu relacionar todos os dados obtidos sobre as variáveis: capacidade antioxidante (método de DPPH), o doseamento em FT, proteínas (Pt) e hidratos de carbono (HC) nas diferentes frações de permeados: AC20_1, AC20_2, AC20_3, AC22_1, AC22_2, AC22_3, AC25_1, AC25_2, AC25_3, AC28_1, AC28_2, AC28_3, AC35_1, AC35_2, AC35_3 e nas amostras da alimentação: AC20_A, AC22_A, AC25_A, AC28_A e AC35_A.

Com o PCA foi possível extrair duas componentes principais, PCM_1 e PCM_2, que relacionam os doseamentos efetuados para caracterizar as frações resultantes dos diferentes ensaios de permeação e das amostras da alimentação. A PCM_1 extraída explicou 88.78 % da variância das variáveis e a PCM_2 apenas explicou 6.98 % da variância das variáveis, no entanto ambos os componentes principais explicam quase a totalidade da variância dos dados.

Tabela 3.13. PCA – Contribuições das variáveis FT, hidratos de carbono, proteínas e atividade antioxidante (DPPH) para as frações dos permeados e amostras da alimentação, para PCM_1 e PCM_2.

	PCM_1	PCM_2
FT (µg GAE / µL)	0.984	-0.096
DPPH (%)	0.888	0.458
Proteína (mg / mL)	0.956	-0.218
Hidrato de carbono (mg /mL)	0.939	-0.111

A Tabela 3.13 representa a matriz dos componentes que corresponde à correlação das variáveis com os componentes principais estimados. Através da análise da Tabela 3.13 e da Figura 3.32 que representa a projeção das variáveis relativamente às componentes principais, determinou-se que a PCM_2 aparentemente representa a variação positiva da variável atividade antioxidante – DPPH, enquanto a PCM_1 representa a conjugação de todas as variáveis analisadas nas frações dos permeados e nas amostras da alimentação.

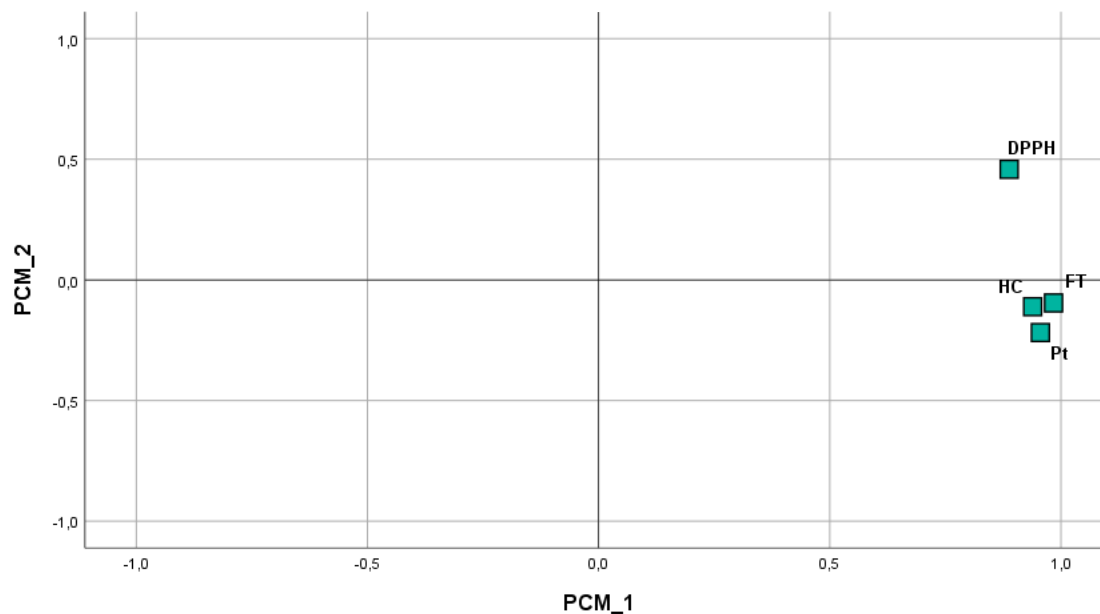


Figura 3.26. Distribuição das variáveis em estudo para as frações dos permeados e das amostras da alimentação relativamente às variáveis extraídas através do PCA (PCM_1 e PCM_2): **FT** – fenóis totais ($\mu\text{g GAE}/\mu\text{L}$); **HC** – hidratos de carbono (mg Glucose/mL); **Pt** – Proteínas (mg BSA/mL); **DPPH** – atividade antioxidante pelo método DPPH (%).

Com base na Figura 3.27 foi possível verificar como as frações resultantes das permeações e das amostras da alimentação se orientam e agrupam em relação aos componentes principais PCM_1 e PCM_2.

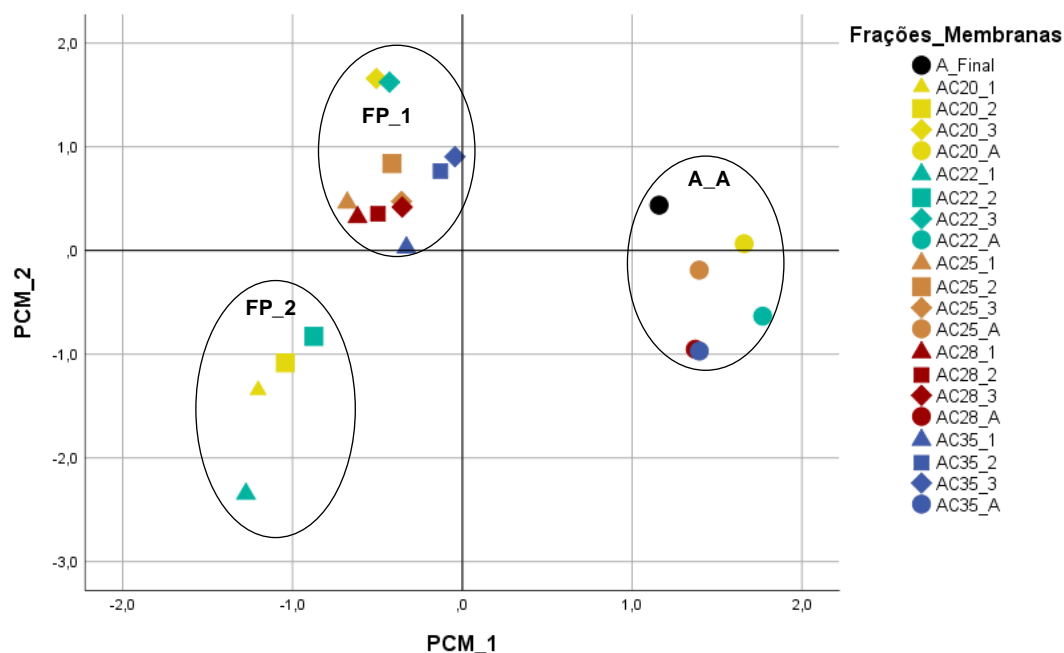


Figura 3.27. Frações dos permeados e das alimentações do posicionados em relação das variáveis PCM_1 e PCM_2.

As amostras das alimentações (AC20_A, AC22_A, AC25_A, AC28_A e AC35_A) agrupam-se no grupo, A_A, como se pode verificar na Figura 3.27, pois apresentaram características

semelhantes com uma contribuição positiva para a PCM_1, e uma contribuição negativa para a PCM_2, com exceção das amostras da alimentação A_Final e AC20_A. Como as amostras da alimentação formam o grupo A_A foi possível justificar a utilização da média dos dados obtidos das amostras da alimentação, visto apresentarem uma variação de variância reduzida, ou seja, as alimentações em cada etapa de permeação apresentam características semelhantes.

Analisando as frações resultantes das diferentes permeações, verificou-se que se agrupam em dois grupos. Verificou-se que a maioria das frações dos permeados agrupam-se no grupo FP_1 e exibe uma contribuição positiva para a PCM_2 e uma contribuição negativa para a PCM_1, enquanto o grupo FP_2 (constituídos pelas frações dos permeados AC20_1, AC20_2, AC22_1 e AC22_2) apresenta uma contribuição negativa tanto para a PCM_1 como para a PCM_2.

No entanto, uma vez que se pretendia identificar a fração do permeado que apresentava as melhores bioatividades, efetuou-se uma análise por PCA apenas considerando as frações correspondentes aos permeados dos diferentes ensaios sem considerar as alimentações.

A análise de componentes principais (PCA) realizada neste estudo permitiu relacionar todos os dados obtidos sobre as variáveis: capacidade antioxidante (método de DPPH), o doseamento em FT, proteínas (Pt) e hidratos de carbono (HC) nas diferentes frações de permeados com as diferentes membranas nas diferentes PTMs: AC20_1, AC20_2, AC20_3, AC22_1, AC22_2, AC22_3, AC25_1, AC25_2, AC25_3, AC28_1, AC28_2, AC28_3, AC35_1, AC35_2 e AC35_3.

Com o PCA foi possível extrair duas componentes principais, PCMP_1 e PCMP_2, que relacionam os doseamentos efetuados das frações resultantes dos diferentes ensaios de permeação. Neste caso, a PCMP_1 justificava 84.42 % da variância das variáveis enquanto a PCMP_2 representava 9.82 % da variância das variáveis, assim sendo estas componentes principais explicam quase a totalidade da variância dos dados.

Tabela 3.14. PCA – Contribuições das variáveis FT, hidratos de carbono (HC), proteínas (Pt) e atividade antioxidante (DPPH) para as frações dos permeados, para PCMP_1 e PCMP_2.

	PCMP_1	PCMP_2
FT (µg GAE / µL)	0.984	-0.096
DPPH (%)	0.888	0.458
Proteína (mg / mL)	0.956	-0.218
Hidrato de carbono (mg /mL)	0.939	-0.111

Através da análise da Tabela 3.14 e da Figura 3.28, determinou-se que o PCMP_2 aparentemente representa a variável atividade antioxidante – DPPH, enquanto o PCMP_1 representa a conjugação de todas as variáveis analisadas nas frações dos permeados e nas amostras da alimentação.

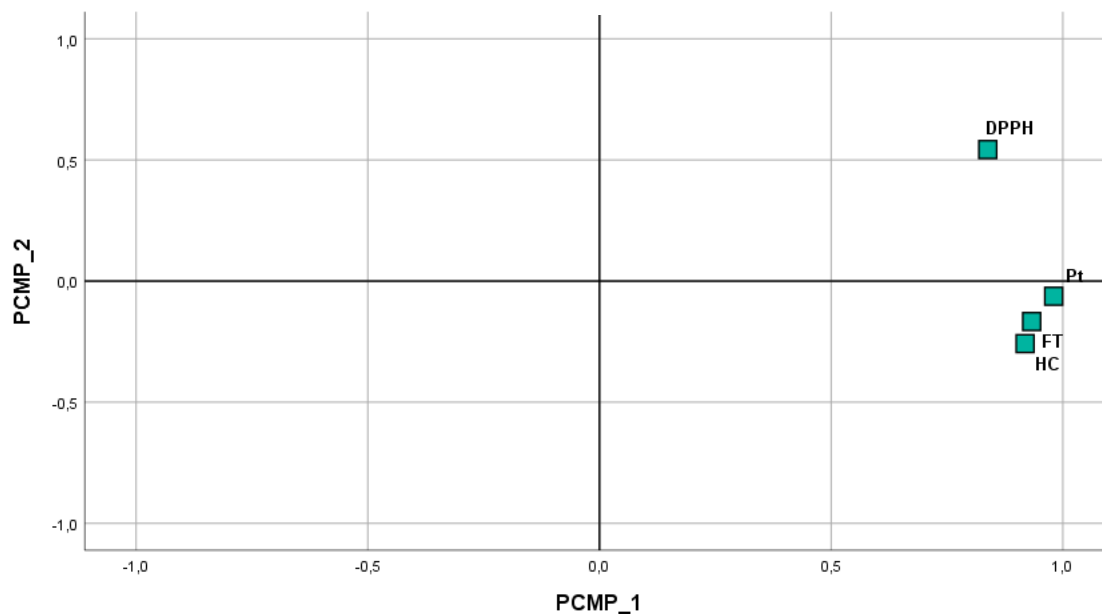


Figura 3.28. Distribuição das variáveis em estudo para as frações dos permeados relativamente às variáveis extraídas através do PCA (PCMP_1 e PCMP_2): FT – fenóis totais ($\mu\text{g GAE} / \mu\text{L}$); HC – hidratos de carbono (mg Glucose / mL); Prot – proteínas (mg BSA / mL); DPPH – Atividade antioxidante pelo método DPPH (%).

Com base na Figura 3.29 foi possível verificar como as frações dos permeados das cinco membranas de acetado de celulose às PTMs de 1, 2 e 3 bar se posicionaram relativamente às componentes principais PCMP_1 e PCMP_2.

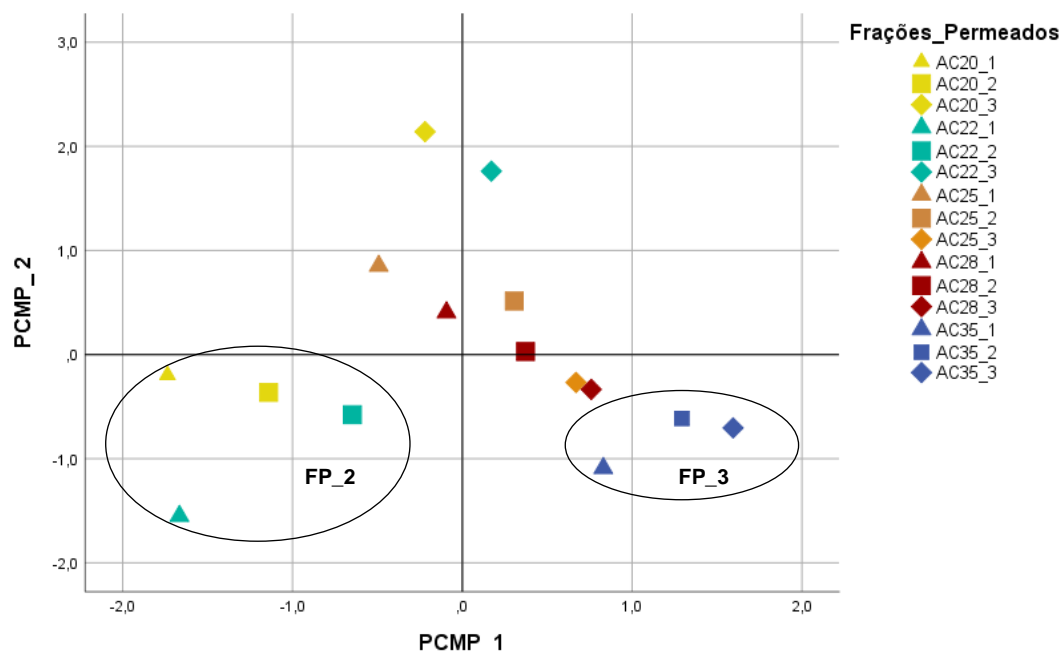


Figura 3.29. Frações dos permeados do extrato BDP posicionados em relação das variáveis PCMP_1 e PCMP_2.

Também foi possível verificar na Figura 3.29, as frações dos permeados das membranas com MWCO menor (AC20 e AC22) às PTMs de 1 e 2 bar (grupo FP_2), apresentavam uma contribuição negativa para a PCMP_1 e a PCMP_2. Nomeadamente, estas duas membranas

apresentaram um comportamento muito disperso para as frações dos permeados às três PTMs, ou seja, para AC20 e AC22 apenas as frações à pressão de 3 bar apresentaram contribuição positiva para a PCMP_2. As diferentes frações dos permeados das membranas AC25, AC28 apresentaram a tendência de agruparem pela porosidade que cada membrana apresenta, exceto AC35 que a todas as pressões apresentou contribuição negativa de PCMP_2 e contribuição positiva de PCMP_1 (grupo FP_3).

Tendo em conta que a maioria das frações dos permeados à PTM de 3 bar foram as que apresentaram uma contribuição mais elevada para a PCMP_1 que representa a generalidade das variáveis foi possível propor que as frações dos permeados que possuem uma variação positiva de todas as variáveis foram os permeados obtidos à PTM de 3 bar. Em particular, relativamente à atividade antioxidante estas frações tinham sido referidas anteriormente como as que exibiram maiores atividades antioxidantes, por esta razão, realizou-se a análise PCA recorrendo apenas às frações dos permeados à PTM de 3 bar adicionando-se a variável da atividade inibitória da AChE das referidas frações.

A análise de componentes principais (PCA) realizada nesta fase permitiu relacionar todos os dados obtidos sobre as variáveis: capacidade antioxidante (método de DPPH), atividade inibitória da AChE, o doseamento em FT, proteínas (Pt) e hidratos de carbono (HC) nas diferentes frações de permeados à PTM de 3 bar: AC20_3, AC22_3, AC25_3, AC28_3 e AC35_3.

Com o PCA foi possível extrair duas componentes principais, PCMPIII_1 e PCMPIII_2, que relacionam os doseamentos efetuados das frações dos permeados à PTM 3 bar. A PCMPIII_1 explica 64.86 % da variância das variáveis enquanto a PCMPIII_2 explica 21.98 % da variância das variáveis. Estes componentes principais explicariam quase a totalidade da variância dos dados.

Tabela 3.15. PCA – Contribuições das variáveis FT, hidratos de carbono, proteínas, atividade antioxidante (DPPH) e atividade inibitória da AChE para as frações dos permeados à PTM de 3 bar, para PCMPIII_1 e PCMPIII_2.

	PCMPIII_1	PCMPIII_2
FT (µg GAE / µL)	0.907	-0.242
DPPH (%)	-0.485	0.863
Proteína (mg / mL)	0.954	0.301
Hidrato de carbono (mg / mL)	0.851	0.451
AChE (%)	0.743	-0.043

Pela interpretação da Tabela 3.15 e da Figura 3.30, determinou-se que o PCMPIII_1 aparentemente representa a relação da variável atividade inibitória da AChE com a composição em FT, proteínas, hidratos de carbono, enquanto a PCMPIII_2 representa maioritariamente a variável atividade antioxidante.

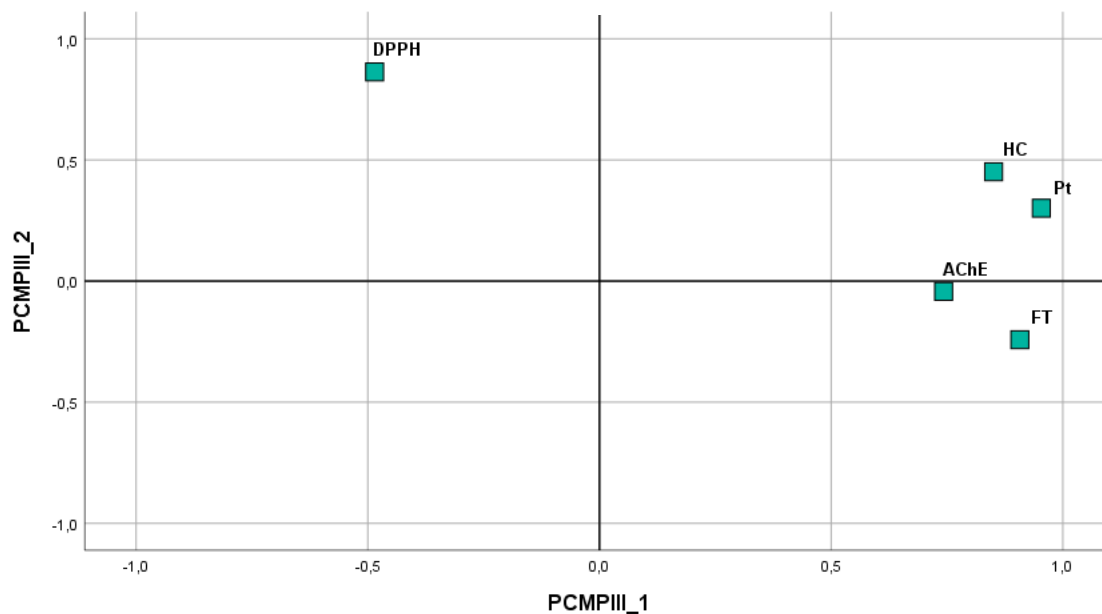


Figura 3.30. Distribuição das variáveis em estudo para as frações dos permeados à PTM de 3 bar relativamente às variáveis extraídas através do PCA (PCMPIII_1 e PCMPIII_2): FT – fenóis totais ($\mu\text{g GAE} / \mu\text{L}$); HC – hidratos de carbono (mg Glucose / mL); Pt – proteínas (mg BSA /mL); DPPH – Atividade antioxidante pelo método DPPH (%); AChE – Atividade inibitória do enzima AChE (%).

Com base na Figura 3.30 foi possível observar como as frações dos permeados das cinco membranas de acetado de celulose à PTM de 3 bar se posicionam relativamente às componentes principais PCMPIII_1 e PCMPIII_2.

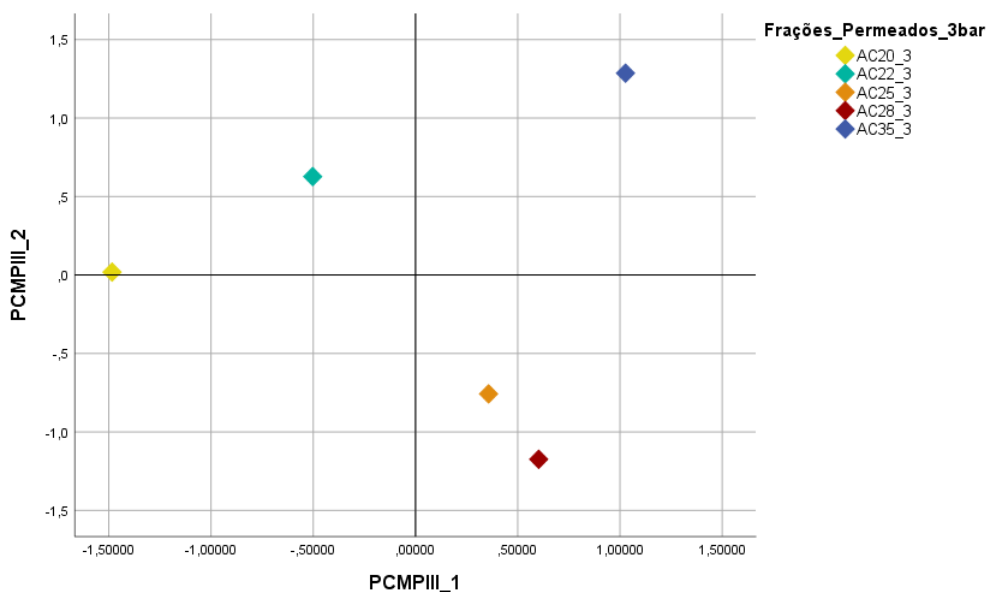


Figura 3.31. Frações dos permeados à PTM de 3 bar do extrato BDP posicionados em relação das variáveis PCMPIII_1 e PCMPIII_2.

Através da análise do posicionamento das diferentes frações dos permeados à PTM de 3 bar (Figura 3.31) foi possível verificar que a fração AC20_3 apresentou uma contribuição negativa para a PCMPIII_1 e nula para a PCMPIII_2, enquanto as frações AC28_3 e AC25_3 têm uma contribuição positiva para a PCMPIII_1 e negativa para PCMPIII_2.

A fração AC22_3 apresentou uma contribuição negativa para a PCMPIII_1 e uma contribuição positiva para a PCMPIII_2, assim foi possível correlacionar que esta fração apresenta menor quantidade de FT, proteínas e hidratos de carbono e menor atividade inibitória sobre a AChE, mas apresenta uma maior atividade antioxidante.

No entanto, a fração AC35_3 apresentou melhor contribuição para a PCMPIII_1 e PCMPIII_2. Este permeado possui a variação mais elevada para os PC, ou seja, foi a fração com a atividade antioxidante e a atividade inibitória da AChE mais elevada, em suma, a que apresenta melhor bioatividade. Não tendo sido esta fração a que apresentou maiores concentrações de CFs este fato poderá ser atribuído à identidade dos CBs presentes neste permeado, nesse sentido foi efetuada a análise dos compostos presentes nas frações permeadas à PTM de 3 bar por HPLC-DAD e feita uma tentativa de identificação de compostos presentes por espectrometria de massa de elevada resolução.

3.3.6. Análise dos compostos identificados por HPLC-DAD permeados á PTM 3 bar e da alimentação

Na Figura 3.32 estão representados os cromatogramas que relacionam a fração resultantes das permeações à PTM de 3 bar (AC20_3, AC22_3, AC25_3, AC28_3 e AC35_3) com a amostra da alimentação (AC20_A), assim foi possível visualizar as variações de intensidade de absorvência para os diferentes picos identificados.

Através da observação dos cromatogramas da Figura 3.32, foi possível verificar que o **composto 2^a** foi isolado em todas as frações estudadas, no entanto nas frações dos permeados resultantes das permeações das membranas com menores porosidades (AC20 e AC22) apresentaram maior intensidade de absorvência comparativamente à amostra da alimentação. Ou seja, o composto 2^a foi concentrado pela tecnologia de membranas majoritariamente nas membranas de menor porosidade.

No mesmo sentido, os **compostos 4 e 5** foram isolados em todas as frações com intensidade de absorvência intermédia (Tabela 3.10) e verificou-se que os picos destes compostos nos permeados das membranas AC20 e AC22, à PTM de 3 bar, apresentaram maior intensidade que na alimentação.

Quanto ao permeado da membrana AC20_3 este também apresentou maior intensidade do pico correspondente ao **composto 3^a**, composto que absorve a 340 nm, em comparação com a alimentação, o mesmo já não se verificou nos permeados das membranas com maiores porosidades.

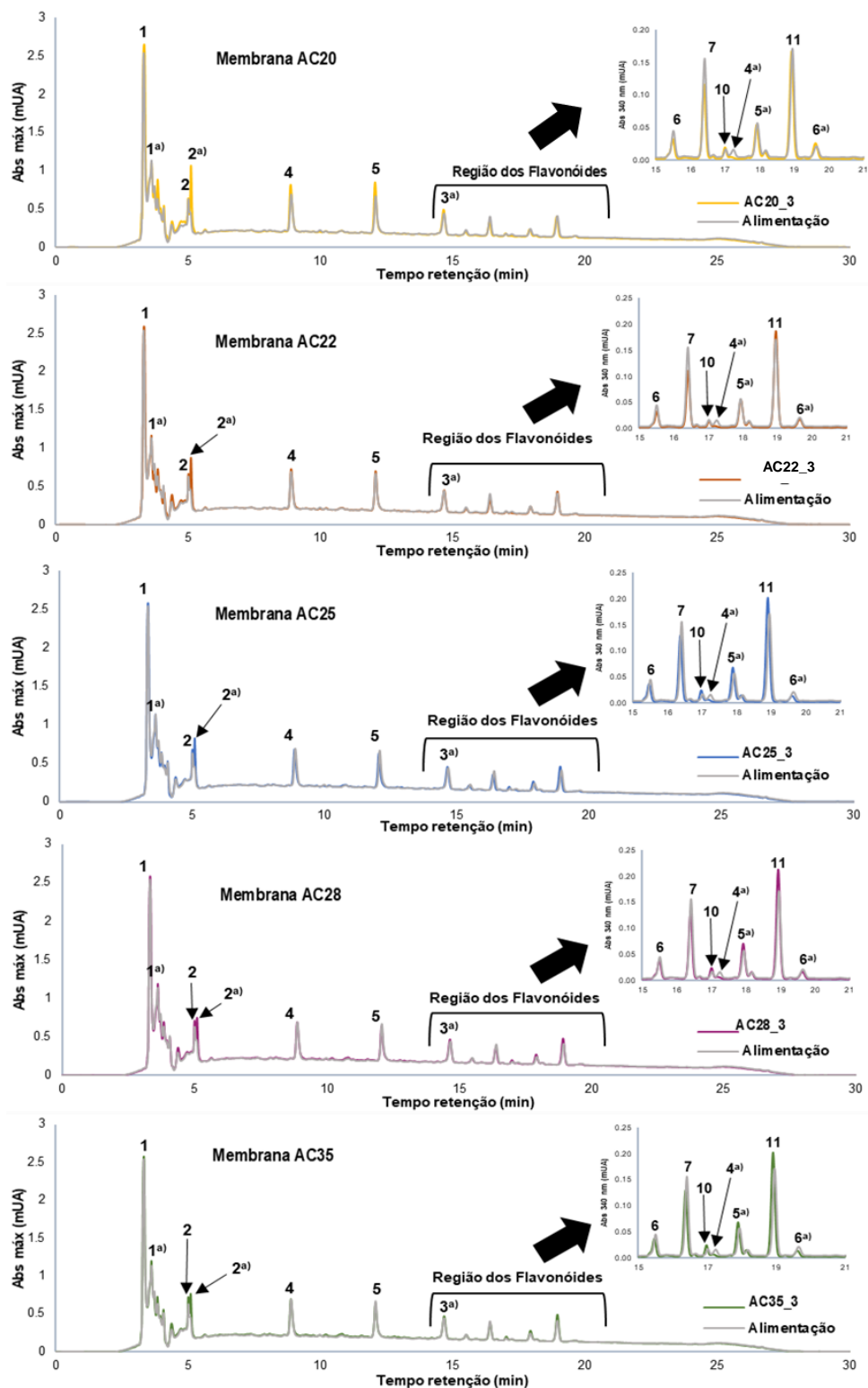


Figura 3.32. Cromatogramas sobrepostos da intensidade de absorvência máxima das frações de permeações AC20_3, AC22_3, AC25_3, C28_3 e AC35_3 e a fração de alimentação AC20_A, à concentração de 5 mg/mL, com ampliação da região dos flavonoides (15 ao 21 min) da intensidade de absorvência a 340 nm.

Os **compostos 6** (flavona) e **7** (derivado da vitexina) apresentaram a mesma relação entre a intensidade de absorvência no permeado e na alimentação, ou seja, existe sempre maior concentração destes CFs na alimentação que nos permeados, e verificou-se um aumento da

concentração destes compostos nas frações dos permeados com o aumento da porosidade da membrana (Figura 3.32). Por esta razão, foi possível concluir que esta flavona (composto 6) e derivado da vitexina (composto 7) poderão estar ligados a outras moléculas o que dificultou a sua permeação em qualquer das membranas. É importante realçar que a vitexina possui massa molecular de 432.38 g/mol, mas pode estar ligada a outros glucósidos ou até com outras moléculas de vitexina. Através da quantificação do derivado da vitexina (composto 7) verificou-se que existe sempre uma maior concentração na alimentação do que nas frações dos permeados, como demonstrado anteriormente na Tabela 3.11. No mesmo sentido, o **composto 4^a** um flavonoide não foi isolado nas frações dos permeados, apenas foi encontrado na amostra da alimentação (Tabela 3.10).

O **composto 10**, ou seja, a rutina, foi isolado em todas as frações estudadas com fraca intensidade, apresentou um tempo de retenção de aproximadamente de 17.06 min (Tabela 3.10). No entanto, através da análise da Tabela 3.11 e Figura 3.32 foi possível verificar que existem maiores concentrações deste composto bioativo maioritariamente nos permeados resultantes das membranas AC25, C28 e AC35.

Os **compostos 5^a** e **11 (derivado da isovitexina)** estão presentes em todas as frações analisadas, no entanto na amostra da alimentação apresentaram uma intensidade de absorvência inferior à dos permeados (Tabela 3.10), exceto o permeado AC20_3 (Figura 3.32) Após a análise da Tabela 3.11 foi possível verificar um aumento da concentração do composto 11, derivado da isovitexina, relativamente à alimentação nos permeados resultantes das permeações pelas membranas AC22, AC25, C28 e AC35. Ou seja, com a utilização da tecnologia de membranas pode ser possível concentrar estes compostos nos permeados.

Finalmente, a concentração do **composto 6^a** (derivado do ácido ferúlico) verificou-se uma ligeira concentração deste CFs nas membranas de menores porosidades (AC20 e AC22) (Tabela 3.11).

3.3.7. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-QTOF-MS)

As frações resultantes das permeações das cinco membranas à pressão de transmembrar de 3 bar e da amostra da alimentação, ou o extrato BDP foram adicionalmente analisados através de uma cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-QTOF-MS) com uma coluna RP-18, como descrito em 2.2.2.2, com o objetivo de identificar mais alguns dos compostos presentes.

Nas Figura 6.56 e Figura 6.57 presentes no Anexo 11, é possível observar os cromatogramas completos das frações resultantes das permeações pelas diferentes membranas à PTM 3 bar e da alimentação no modo de ionização negativo e positivo.

Da análise dos cromatogramas obtidos tanto em modo de ionização positivo como em modo negativo foi possível verificar que apresentam um perfil semelhante.

Após a análise dos cromatogramas verificou-se que apenas foi possível a identificação de compostos nos tempos de retenção entre o minuto 1 e o minuto 10. Os picos presentes nos outros tempos de retenção encontravam-se sobre a influência da fragmentação da água *Mill-Q*.

Assim desta forma, efetuou-se a ampliação dos cromatogramas analisados dentro deste intervalo do tempo de retenção, sendo possível a sua observação nas Figura 3.33 e na Figura 3 34, correspondendo aos modos de ionização negativo e positivos, respetivamente.

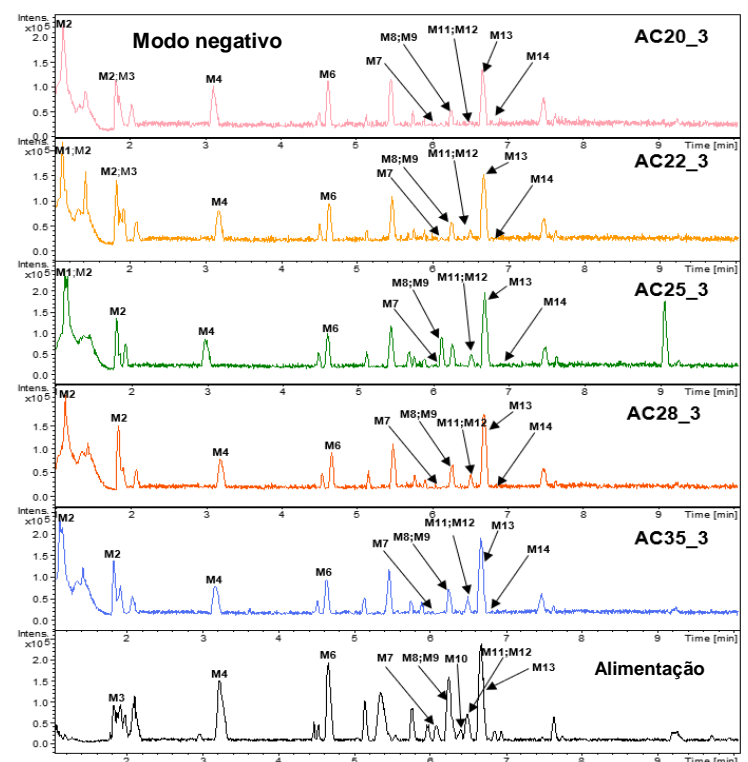


Figura 3.33. Cromatogramas do LC-MS em modo de ionização negativo das frações, ampliação dos tempos de retenção entre 1 e 10 minutos: **AC20_A** – linha preta; **AC35_3** – linha azul; **C28_3** – linha vermelha; **AC25_3** – linha verde; **AC22_3** – linha amarela; **AC20_3** – linha rosa.

A identificação dos compostos foi possível recorrendo ao software de análise dos cromatogramas MS e MS² obtendo a possível fórmula química desse composto, selecionando a que apresentava o menor erro em ppm. De seguida, utilizou-se a plataforma *PubChem* para pesquisar compostos com a respetiva fórmula química, e através das bases de dados como *massbank* e *mzCloud* compararam-se os perfis de fracionamentos (*m/z*) desses mesmos compostos.

Os compostos que foram identificados estão na Tabela 3.16 apresentando perfis de fracionamento (*m/z*) semelhantes aos observados nas diferentes bases de dados. A identificação dos CFs referenciados pela bibliografia efetuou-se pela pesquisa nos diferentes cromatogramas pelas respetivas massas exatas dos compostos, e foi ainda possível comparar os perfis de fracionamento de padrões comerciais de compostos já referidos como estando presentes nas frações analisadas, nomeadamente a rutina identificada no HPLC-DAD como composto 10, o ácido ferúlico (composto 6^a) e os derivados da vitexina e isovitexina, compostos 7 e 11 respetivamente. Os compostos identificados através deste último método foram a rutina, o ácido

ferúlico, a vitexina-2"-O-ramnoside e vitexina que é referenciada na bibliografia como um composto presente nas folhas e talos de beterraba em maior abundância (4,202).

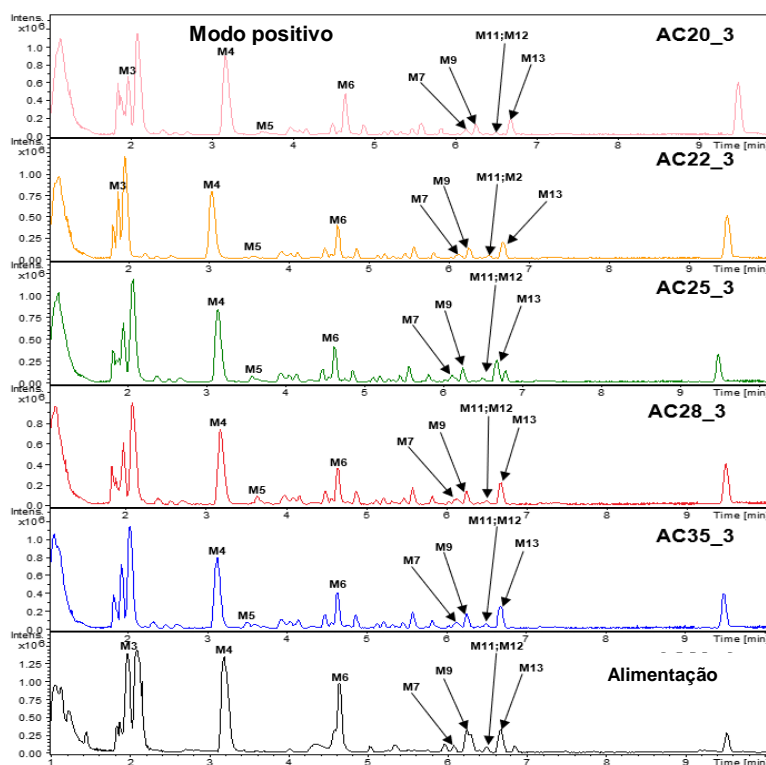


Figura 3.34. Cromatogramas do LC-MS² em modo de ionização positivo das frações ampliação dos tempos de retenção entre 1 e 10 minutos: **AC20_A** – linha preta; **AC35_3** – linha azul; **C28_3** – linha vermelha; **AC25_3** – linha verde; **AC22_3** – linha amarela; **AC20_3** – linha rosa.

A presença dos compostos identificados nas diferentes frações analisadas pode ser observada na Tabela 3.17. No entanto, é necessário salientar que a não identificação de certos compostos em determinadas frações pode estar relacionada com o limite de intensidade relativa de fragmentação ser inferior a 20% ou pelo composto não sendo fragmentado o que limitou a sua identificação.

Foi possível identificar como estando presentes no extrato das folhas e talos da beterraba dois ácidos orgânicos: o **ácido málico (M1)** e o **ácido cítrico (M2)**. A identificação do ácido málico (M1) foi só efetuada nos permeados AC22 e AC25, enquanto o ácido cítrico foi identificado em todos os permeados (Tabela 3.17). Tanto o ácido cítrico como o ácido málico desempenham funções de transporte de micronutrientes nas plantas e encontram-se envolvidos na regulação de processos bioquímicos e fisiológicos, também se encontram associados ao metabolismo energético nas células vegetais (208), em particular o ácido cítrico tem propriedades antioxidantes demonstradas (209,210). Os ácidos orgânicos são amplamente utilizados industrialmente como aditivos alimentares na preparação de bebidas à base de frutas e vegetais, sendo os principais ácidos orgânicos utilizados para realçar sabores da bebida os ácidos cítrico e tartárico. Além disso, o ácido cítrico é muito utilizado como acidificante em sucos de fruta, porque o pH dos ácidos naturais presentes nas frutas não é suficiente para assegurar a estabilidade microbiana a longo prazo (211).

Tabela 3.16. Identificação dos CBs presentes nas frações de permeados e alimentação inicial das folhas e talos da beterraba, através dos perfis de fragmentação MSⁿ.

Composto	Tr (min)	Formula química	Mw (g/mol)	<i>m/z</i> [H ⁻]	<i>m/z</i> [H ⁺]	Erro (ppm)	Intensidade	MS ² , <i>m/z</i> e Intensidade relativa (%)
Ácido málico (M1)	1.1	C ₄ H ₆ O ₅	134.087	133.1		0.0	65135 (84%)	115 (7); 72 (48); 71 (100); 59 (18)
Ácido cítrico (M2)	1.1 e 1.9	C ₆ H ₈ O ₇	192.027	191.01		0.1	55688 (54%)	111 (76); 87 (100); 57 (21)
Ácido <i>p</i> -cumárico (M3)	1.9	C ₉ H ₈ O ₃	164.158	[163.06 + NH ₂] = 180.06		0.1	15093 (59%)	163 (36); 134 (30); 119 (100); 96 (60); 93 (12); 72 (62)
				165.05	0.6	72750 (31%)	147 (9); 136 (54); 123 (43); 91 (100); 77 (18); 65 (33)	
Fenilalanina (M4)	3.2	C ₉ H ₁₀ NO ₃	165.079	164.06		0.3	57222 (100%)	147 (14); 119 (4); 91 (3); 72 (66)
				166.08	1.0	889126 (96%)	120 (98); 103 (40); 91 (16); 77 (33); 53 (13)	
Betanina ou Isobetanina (M5)	3.5	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃	550.5		551.15	-0.7	36108 (100%)	389 (100); 343 (7); 195 (3) 150 (11)
Triptofano (M6)	4.6	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.089	203.07		-0.3	121672 (100%)	157 (3); 142 (29); 116 (100); 74 (37)
				205.09	0.7	539046 (95%)	188 (48); 159 (12); 146 (100); 115 (61); 91 (85); 74 (9)	
Apigenina-6,8-glucoside ou Vicenin (M7)	6.1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594.518	593.13		0.9	28960 (100%)	473 (3); 413 (91); 293 (57); 174 (3); 71 (10)
				595.17	0.7	83778 (100%)	433 (61); 397 (17); 313 (100); 271 (25); 85 (7)	
Vitexina -2''-O-ramnoside (M8)	6.2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	578,533	577.14		0.5	6097 (6%)	457 (7); 413 (100); 293 (45); 175 (18); 117 (28)

Composto	Tr (min)	Formula química	Mw (g/mol)	<i>m/z</i> [H ⁺]	<i>m/z</i> [H ⁺]	Erro (ppm)	Intensidade	MS ² , <i>m/z</i> e Intensidade relativa (%)
Schaftoside ou Corymboside (M9)	6.2	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	564.1	563.12		1.2	100690 (100%)	413 (79); 293 (37); 173 (4); 117 (8)
					565.14	0.9	171164 (100%)	433 (24); 397 (17); 313 (75); 283 (19)
Vitexina (M10)	6.4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.281	431.08		0.2	20381 (100%)	311 (100); 161 (3); 117 (10); 79 (4)
Derivado da Vitexina (M11)	6.5	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₈	680.600	679.13		0.5	49436 (100%)	635 (50); 575 (4); 455 (94); 293 (87); 174 (8); 59 (6)
					681.16	0.9	65419 (100%)	519 (28); 439 (4); 313 (100); 85 (10)
Rutina (M12)	6.5	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.54	609.14		0.6	6448 (14%)	413 (6); 315 (100); 300 (20); 271 (46); 243 (28)
					611.15	1.9	11035 (16%)	479 (2); 317 (100); 181 (13); 75 (9)
Vitexina-6''-O-Malonyl-2''-O-Xyloside (M13)	6.7	C ₂₉ H ₃₀ O ₁₇	650.50	649.12		-0.3	156638 (100%)	605 (49); 545 (2); 455 (58); 293 (91); 174 (9); 117 (7)
					651.16	0.9	238095 (100%)	519 (25); 439 (7); 379 (8); 313 (100); 283 (23)
Ácido ferúlico (M14)	6.8	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.180	193.05		0.3	7748 (30%)	178 (8); 156 (3) 134 (100); 106 (4); 102 (6);

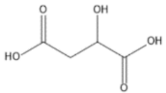
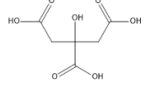
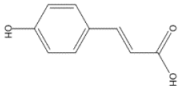
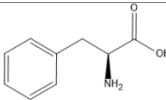
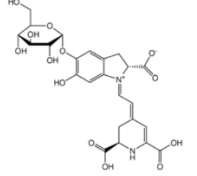
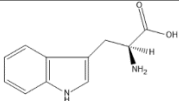
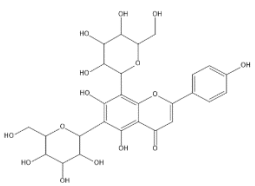
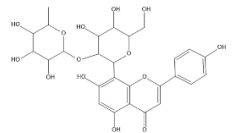
Em todas as frações analisadas e no extrato BDP (Tabela 3.17), os aminoácidos identificados foram a **fenilalanina (M4)** e o **triptofano (M6)**. A fenilalanina e o triptofano pertencem à classe dos aminoácidos essenciais, porque o homem e os animais não possuem os metabolismos necessários para a sua síntese, apenas consegue adquiri-los por ingestão. É possível encontrar estes aminoácidos nas plantas, sendo sintetizados pela via do chiquimato. A maioria dos CFs nas plantas tem como precursor a fenilalanina que através de uma reação de desaminação forma o ácido cinâmico (49).

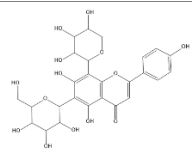
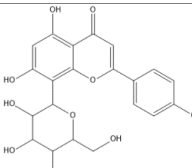
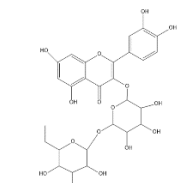
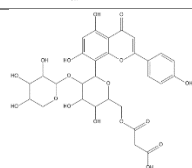
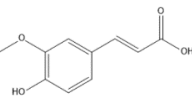
Também foi identificado apenas nos permeados das membranas estudadas a **betanina**, ou do seu isómero, a **isobetanina (M5)**. Este composto bioativo pode ser observado em elevadas concentrações na raiz da beterraba, mas também já foi identificado nos extratos das folhas e talos da beterraba em menor quantidade (157). Assim foi possível concluir que o composto identificado através do HPLC-DAD como uma betacianina (composto 2) é especificamente a betanina ou a isobetanina. Como referido anteriormente a concentração deste composto aumentou em todas as frações relativamente à alimentação (AC20_A). O fato de apenas se verificar a identificação deste composto nas frações dos permeados pode dever-se à sua concentração relativa na alimentação ser inferior. Estes CBs são seguros e para além de apresentam atividades antioxidantes mais elevadas que o ácido ascórbico, rutina, catequinas, β -caroteno e o α -tocoferol, também são compostos com propriedades promotoras de saúde (212).

Os ácidos fenólicos identificados foram o **ácido *p*-cumárico (M3)** e o **ácido ferúlico (M14)**, derivados destes CBs já foram identificados em folhas de beterraba açucareira (202). Na Tabela 3.17 é possível observar que o ácido *p*-cumárico (M3) foi apenas identificado no extrato BDP e nos permeados AC20_3 e AC22_3, e o ácido ferúlico foi identificado em todos os permeados. O ácido *p*-cumárico desempenha um papel importante na síntese de metabolitos secundários, pois este é um precursor dos ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido clorogénico e ácido sinápico), dos flavonoides, lenhina, entre outros metabolitos secundários. O ácido *p*-cumárico e em particular os seus derivados exibem várias atividades biológicas, incluindo atividades anti-inflamatórias e anti-mutagénicas, entre outras, e possuem atividades atenuantes sobre a aterosclerose, lesões neurológicas, ansiedade, etc (213).

O **ácido ferúlico (M14)** foi identificado através do HPLC-DAD como o composto 6^a), mas o fato de apenas ser identificado nas frações resultantes das permeações poderá dever-se à sua concentração relativamente à alimentação. Este facto parece contradizer os resultados obtidos na determinação da concentração de ácido ferúlico por HPLC-DAD em que as diferenças entre a alimentação e as frações permeadas não pareciam tão evidentes, no entanto, a espectrometria de massa é uma técnica de elevada resolução e o HPLC-DAD poderá ter erros associados principalmente na quantificação de concentrações baixas como o caso deste composto. O ácido ferúlico e os seus derivados são CBs que apresentam atividades sobre o stress oxidativo, incluindo cancro, diabetes e doenças neurodegenerativas (214).

Tabela 3.17. Identificação dos CBs nas diferentes frações de permeado e alimentação inicial de folhas e talos de beterraba.

Composto	R _t (min)	Estrutura química	Alimentação	AC20_3	AC22_3	AC25_3	AC28_3	AC35_3
Ácido málico (M1)	1.1				X	X		
Ácido cítrico (M2)	1.1 e 1.9			X	X	X	X	X
Ácido <i>p</i> -cumárico (M3)	1.9		X	X	X			
Fenilalanina (M4)	3.2		X	X	X	X	X	X
Betanina ou Isobetanina (M5)	3.5			X	X	X	X	X
Triptofano (M6)	4.6		X	X	X	X	X	X
Apigenina-6,8-glucoside ou Vicenin (M7)	6.1		X	X	X	X	X	X
Vitexina -2''-O-ramnoside (M8)	6.2		X	X	X	X	X	X

Composto	R _t (min)	Estrutura química	Alimentação	AC20_3	AC22_3	AC25_3	AC28_3	AC35_3
Schaftoside ou Corymboside (M9)	6.2		X	X	X	X	X	X
Vitexina (M10)	6.4		X					
Derivado da vitexina (M11)	6.5		X	X	X	X	X	X
Rutina (M12)	6.5		X	X	X	X	X	X
Vitexina-6''-O-Malonyl-2''-O-Xyloside (M13)	6.7		X	X	X	X	X	X
Ácido ferúlico (M14)	6.8			X	X	X	X	X

Verificou-se que nos cromatogramas de LC-QTOF-MS do extrato BDP (alimentação) e dos seus permeados à PTM de 3 bar, existia uma região corresponde aos flavonoides, a mesmo já tinha sido anteriormente identificada através do HPLC-DAD como a região dos flavonoides. Os CBs identificados em maior quantidade pertencem à classe dos flavonoides, nomeadamente a rutina e derivados da vitexina. Este fato valida as identificações anteriormente efetuadas através dos HPLC-DAD nas seções 3.1.4.1 e 3.3.1.1, em que foi possível a identificação da rutina, como o composto 10, do derivado da vitexina (composto 7) e do derivado da isovitexina (composto 11).

Como relatado em Lorizola *et al.* (169), identificou em folhas e talos de beterraba, elevadas quantidades de derivados de vitexina, em particular a vitexina -2''-O-ramnoside e seus derivados com massas moleculares de 650 g/mol e de 564 g/mol. No entanto, a amostra da alimentação (extrato BDP) e dos permeados, não apresentaram elevada intensidade de fragmentação para a massa molecular correspondente à **vitexina -2''-O-ramnoside (M8)**. Também foram identificados derivados da vitexina, como a **apigenina 6,8-glucosideo ou vicenin (M7)** com massa molecular de 594, 5 g/mol, a **shaftoside** ou o isómero **corymboside (M9)** com massa molecular de 564.1 g/mol, a **vitexina (M10)** com massa molecular de 432.2 g/mol, um derivado da **vitexina** com massa molecular de 680.6 g/mol (**M11**) e a **vitexina-6''-O-malonyl-2''-O-xyloside (M13)** com massa molecular de 650 g/mol. Estes compostos derivados da vitexina apresentam perfis de ionização característicos com os iões (m/z) 413 e 293 em modo negativo (169,202), como pode ser observado na Tabela 3.16.

Assim é possível supor que os derivados da vitexina (composto 7) e da isovitexina (composto 11) presentes no extrato BDP e nos seus permeados reconhecidos anteriormente pelo HPLC-DAD, podem ser alguns dos derivados da vitexina identificados pela espetrometria de massa. No entanto, como as corridas cromatográficas, colunas e equipamento do HPLC-DAD e LC-QTOF-MS são diferentes, dificulta a identificação dos picos dos cromatogramas do HPLC-DAD com os CBs identificados na espetrometria de massa, pois pode ocorrer alterações do perfil cromatográfico, pode ocorrer a inversão dos picos dos compostos já identificados, surgir novos picos ou não ocorrer a resolução de um pico.

Na Tabela 3.17 é possível observar que todos os derivados da vitexina (M7, M8, M9, M11 e M13) foram identificados tanto no extrato BDP (alimentação) como nos permeados, enquanto a vitexina (M10) apenas foi identificada na alimentação. Através da quantificação realizada através do HPLC-DAD, como já mencionado anteriormente, o composto 7, um derivado da vitexina, apresentou sempre concentrações inferiores nos permeados comparativamente à alimentação (extrato BDP). Por outro lado, o composto 11 (denominado como o derivado da isovitexina) apresentou sempre quantificações superiores nos permeados, com a exceção do AC20_1, AC20_2, AC22_1 e AC22_2, que na alimentação.

Também foi identificado o flavonol glicósido, a **rutina (M12)** que corresponde ao composto 10 na análise por HPLC-DAD. A rutina é amplamente investigada pois apresenta atividades biológicas na prevenção e tratamento de diversas patologias, mas é um composto bioativo que possui baixa solubilidade em soluções aquosas e com baixa estabilidade (215). Este composto foi identificado

na alimentação e em todos os permeados (Tabela 3.17), e como referido anteriormente, verificou-se a concentração deste CBs nos permeados resultantes das membranas com MWCO superior a 8.6 kDa (AC25, AC28 e AC35).

Através da identificação por LC-QTOF-MS foram identificados os seguintes CBs que exibem elevadas atividades antioxidantes: betanina (212), derivados da vitexina (216), rutina (215), ácido ferúlico (214) e ácido cítrico (209,210). Através das quantificações efetuadas através dos cromatogramas de HPLC-DAD foi possível verificar que nos permeados AC20_3 e AC22_3 estão presentes em concentrações superiores os derivados do ácido ferúlico (composto 6^a) ou M14) e o derivado da isovitexina (composto 11), poderá corresponder a um dos derivados da vitexina identificados pela espectrometria de massa. No entanto, o composto 2^a), 4 e 5 identificados nos cromatogramas da Figura 3.32, apresentavam elevada intensidade em relação ao cromatograma da alimentação (extrato BDP), estes compostos poderiam explicar a elevada atividade antioxidante exibida nos permeados AC20_3 e AC22_3.

3.3.8. Cultura de linha celular cancerígena humana – avaliação do potencial citotóxico das frações dos permeados (AC22_3 e AC35_3) e da alimentação

A avaliação do potencial citotóxico das três frações em estudo, permeados às pressões transmembranares de 3 bar resultantes das membranas AC22 e AC35 e a amostra da alimentação (ou seja, do extrato BDP) (Anexo 10 Figura 6.54), foi realizada em células Hep-G2, o que permitiu determinar a sua hepatotoxicidade, através do método MTT (217,218), descrito em 2.2.6.1. Os resultados obtidos para a determinação da citotoxicidade estão descritos no Anexo 10

Figura 6.55.

Tendo em conta que alguns dos compostos presentes nos extratos de plantas podem apresentar toxicidade, nomeadamente alguns pigmentos é importante fazer esta avaliação. Um extrato é considerado tóxico para o ser humano quando apresenta um IC₅₀ de toxidade celular com uma concentração de 0.1 mg/mL (219,220). No entanto como é possível verificar pela análise da Tabela 3.18, os valores de citotoxicidade celular à concentração de 1 mg/mL são muito inferiores ao estabelecido pela bibliografia, assim desta forma foi possível concluir que as frações resultantes da permeação das membranas do extrato BDP não apresentam hepatotoxicidade para o ser humano.

Tabela 3.18. Citotoxicidade celular para as frações resultantes das permeações pela membrana AC22 e AC35 à PTM de 3 bar (AC22_3 e AC35_3) e da alimentação (AC20_A).

Fração	Citotoxicidade celular (1 mg/mL)
AC22_3	20.34 ± 1.821
AC35_3	17.63 ± 1.408
Alimentação	13.02 ± 2.698

No entanto, foi possível verificar que a fração resultante da permeação pela membrana AC22, apresenta valores de toxicidade para a linha celular Hep-G2 ligeiramente mais elevado que a

fração AC35_3. E a fração que apresenta um valor de hepatotoxicidade celular inferior foi a amostra da alimentação (AC20_A), ou seja, do extrato BDP. Este facto, pode estar relacionado com a concentração de CBs com potencial citotóxico para as células, neste sentido o enriquecimento dos permeados com compostos poderão apresentar alguma toxicidade celular. Ainda assim em face dos valores obtidos foi possível supor que estes compostos são seguros para serem incorporados na alimentação, como já demonstrado em estudos anteriores (221).

3.4. Determinação dos parâmetros para caracterização das membranas

3.4.1. Coeficientes de rejeição aparentes (f) aos FT, aos hidratos de carbono e às proteínas

Após os doseamentos de todas as frações recolhidas (permeados e alimentação) foi possível determinar o coeficiente de rejeição aparente (f) dos FT, proteínas (Pt) e hidratos de carbono (HC) utilizando a Equação 1.3. Os valores obtidos estão demonstrados na Tabela 3.19.

Tabela 3.19. Determinação dos coeficientes de rejeição aparente (f) do FT, Pt e HC.

Frações (10 mg/mL)	f _{FT}	f _{Pt}	f _{HC}
AC20_1	53%	92%	23%
AC20_2	50%	90%	22%
AC20_3	47%	90%	21%
AC22_1	52%	92%	22%
AC22_2	50%	89%	20%
AC22_3	48%	88%	19%
AC25_1	46%	90%	21%
AC25_2	42%	88%	18%
AC25_3	38%	87%	17%
AC28_1	41%	89%	21%
AC28_2	37%	87%	20%
AC28_3	32%	87%	18%
AC35_1	38%	87%	15%
AC35_2	36%	86%	14%
AC35_3	34%	85%	13%

Pela interpretação da Figura 3.35, verificou-se que as membranas possuem a capacidade de separação das proteínas presentes na alimentação, e os permeados apresentaram um valor de f de aproximadamente 90%. Relativamente aos hidratos de carbono, os permeados exibiram um f aproximado de apenas 22%, enquanto que nos FT já foi possível separar cerca de metade da quantidade de FT presente na alimentação (extrato inicial BDP).

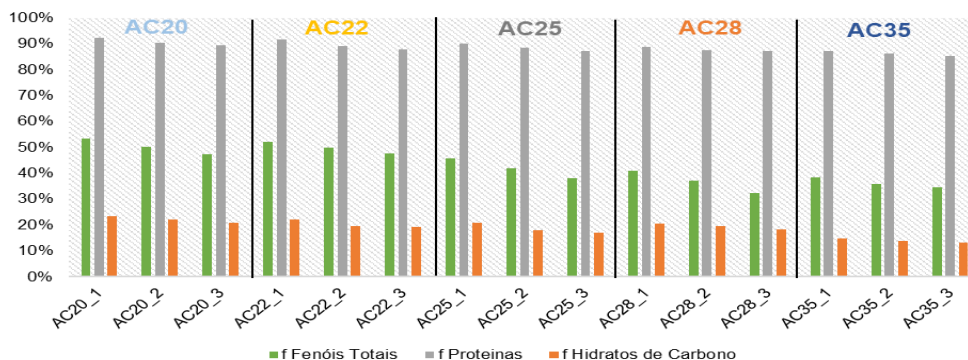


Figura 3.35. Determinação dos coeficientes de rejeição aparente (f) para os FT (barra verde), proteínas (barra cinza) e hidratos de carbono (barra laranja).

Também foi possível verificar que os permeados resultantes das permeações às PTM de 3 bar apresentaram valores de rejeições aparentes menores. Com o aumento da PTM aumenta o fluxo de permeação do extrato, forçando os solutos a atravessarem as membranas estudadas, não se verificando os efeitos de colmatação das membranas com este tipo de solutos.

Variando o MWCO das membranas de UF foi possível efetuar a separação de alguns compostos presentes em extratos aquosos de plantas, assim como membranas com MWCO entre 50 e 100 kDa, podem ser utilizados para recuperar diferentes macromoléculas (tais como sólidos suspensos, hidratos de carbono complexos ou proteínas). Por outro lado, as membranas de UF com MWCO entre 4 e 30 kDa normalmente são eficazes para concentrar componentes de elevado peso molecular (como taninos, proteínas e algumas frações de CFs elevado peso molecular), enquanto as membranas de UF, de 1 a 3 kDa, são eficazes para concentrar compostos de baixo peso molecular (como antocianinas, CFs de baixo peso molecular, hidratos de carbono de baixo peso e peptídeos), na realidade estas membranas estão no MWCO correspondente a um processo de NF (113).

Neste trabalho verificou-se a separação das proteínas com todas as membranas estudadas neste trabalho experimental. No entanto apenas foi possível a separação de 50% de FT para a membrana com MWCO de 3.8 kDa e 4.6 kDa, diminuindo gradualmente com o aumento da porosidade das membranas.

3.4.2. Coeficiente de rejeição intrínseco (f') e coeficiente de transferência de massa (k)

Para determinar o coeficiente de rejeição intrínseco (f') e o coeficiente de transferência de massa (k) experimentalmente foi necessário obter os seguintes dados experimentais: o fluxo de permeação (Jp) e o coeficiente de rejeição aparente (f) às PTMs de 1, 2 e 3 bar.

Para tal foi necessário efetuar a linearização da Equação 1.8, e obtendo-se a seguinte equação:

$$\ln\left(\frac{1-f}{f}\right) = \ln\left(\frac{1-f'}{f'}\right) + \frac{1}{k} \times v_p \quad \text{Equação 3.2}$$

Com base nesta equação foi possível efetuar uma regressão linear, na qual o $\ln\left(\frac{1-f}{f}\right)$ corresponde aos valores da abcissa e o v_p aos valores da ordenada. Desta forma, após a construção da reta de calibração foi possível determinar que $\ln\left(\frac{1-f'}{f'}$) corresponde ao valor na abcissa e o $\frac{1}{k}$ ao declive da reta de calibração.

Neste trabalho foram determinados os coeficientes intrínseco (f') e os coeficientes de transferência de massa (k) para os fenóis totais (FT), proteínas (Pt) e hidratos de carbono (HC). Para construção das retas de calibração foi necessário efetuar a conversão do fluxo de permeação (J_p) para velocidade de permeação (v_p).

Com base nos valores experimentais referentes aos coeficientes de rejeição aparentes (f) e da velocidade de permeação (v_p) para os fenóis totais (Anexo 12 na Tabela 6.9), proteínas (Anexo 12 na Tabela 6.10) e para os hidratos de carbono (Anexo 12 na Tabela 6.11) foi possível a representação gráfica que permitiram a determinação dos parâmetros de coeficientes intrínsecos (f') e o coeficiente de transferência de massa (v_p) para os fenóis totais (Figura 3.36), das proteínas (Anexo 12 na Figura 6.58) e hidratos de carbono (Anexo 12 na Figura 6.59).

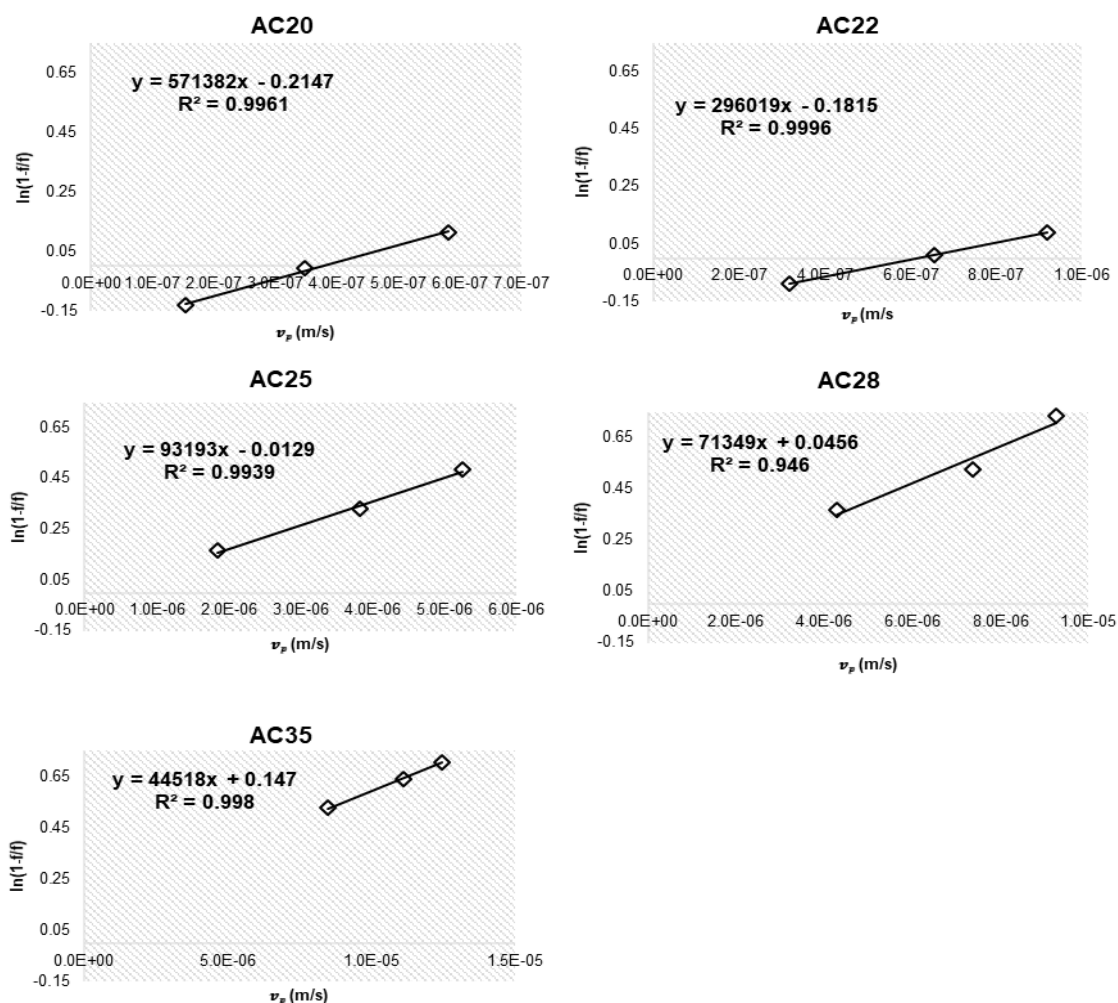


Figura 3.36. Representações gráficas de v_p vs $\ln\left(\frac{1-f}{f}\right)$ para os fenóis totais (FT) nas membranas: AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.

Na Figura 3.37 estão representados os valores dos coeficientes de rejeição intrínsecos (f') e do coeficiente de transferência de massa para os fenóis totais (FT), proteínas (Pt) e hidratos de carbono (HC).

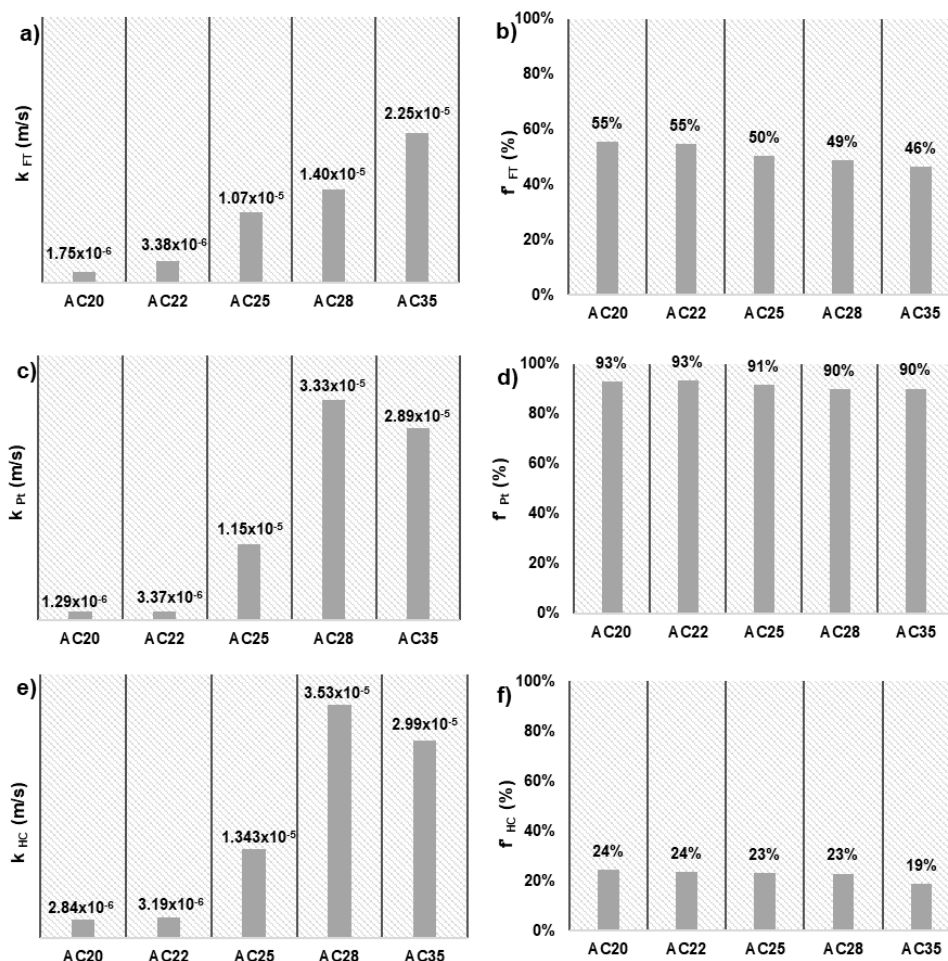


Figura 3.37. Representação gráfica da determinação dos **(a)** k dos FT, **(b)** f' dos FT; **(c)** k das Pt; **(d)** f' das Pt; **(e)** k dos HC e **(f)** f' dos HC para as membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.

Verificou-se que os coeficientes de rejeição intrínseco (f') diminuem com o aumento do MWCO das membranas estudadas para os FT, proteínas e hidratos de carbono (Figura 3.37). O coeficiente de rejeição intrínseco (f') corresponde à concentração de soluto na camada superficial da membrana (132), denotou-se que as proteínas apresentaram um coeficiente de rejeição intrínseco (f') superior aos FT e HC, este fato pode encontrar-se relacionado com a massa molecular que estes compostos apresentam. Ou seja, quanto maior a massa molecular dos compostos maior a rejeição destes pelas membranas, e verifica-se o aumento da concentração destes solutos na camada adjacente à membrana.

Na Figura 3.37 é possível verificar que o coeficiente de transferência de massa (k) aumenta com o aumento da porosidade das membranas.

Na Tabela 3.20 estão descritas as características das membranas de acetato de celulose preparadas (AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35) para os seguintes parâmetros: permeabilidade hidráulica (L_p), limite de rejeição a solutos orgânicos (MWCO), coeficiente de transferência de massa (k) e coeficiente aparente intrínseco (f') para os fenóis totais, proteínas e hidratos de carbono.

Tabela 3.20. Dados da permeabilidade hidráulica (L_p), MWCO e coeficiente de transferência de massa (k) e coeficiente de rejeição intrínsecos (f') para os fenóis totais (FT), proteínas (Pt) e hidratos de carbono (HC) das membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.

Membrana	AC20	AC22	AC25	AC28	AC35
L_p (kg/m².h.bar)	1.886	2.491	10.802	23.788	56.869
MWCO (kDa)	3.8	4.6	8.6	32	62
k_{HC} (m/s)	2.839×10^{-6}	3.193×10^{-6}	1.343×10^{-5}	3.526×10^{-5}	2.988×10^{-5}
K_{FT} (m/s)	1.750×10^{-6}	3.380×10^{-6}	1.070×10^{-5}	1.400×10^{-5}	2.25×10^{-5}
k_{Pt} (m/s)	1.293×10^{-6}	3.370×10^{-6}	1.151×10^{-5}	3.330×10^{-5}	2.892×10^{-5}
f'_{HC}	24%	24%	23%	23%	19%
f'_{FT}	55%	55%	50%	49%	46%
f'_{Pt}	93%	93%	91%	90%	90%

Os resultados obtidos para os coeficientes de rejeição intrínseca (f'), aparente (f) e do coeficiente de transferência de massa (k) são influenciados pelas matrizes orgânicas e inorgânicas presentes no extrato BDP. Os extratos aquosos de plantas são uma mistura complexa de CFs, hidratos de carbono, ácidos orgânicos, proteínas e minerais. Como resultado, estas macromoléculas também desempenham um papel importante no coeficiente de transferência de massa durante a UF do extrato, pois podem aumentar a viscosidade do extrato aquoso, interagir com os CFs, potenciando fenómenos de polarização de concentração/colmatação e aumentando os coeficientes de rejeição (128).

As membranas de UF estudadas neste trabalho permitiram o fracionamento do extrato aquoso BDP, e foi possível concluir que com a membrana AC35, que apresenta um MWCO de 62kDa, permitiu separar aproximadamente 85 % das proteínas totais presentes na alimentação. Relativamente aos hidratos de carbono, a membrana estuda com menor porosidade (AC20) apenas conseguiram separar aproximadamente 23 %, levando a considerar que os hidratos de carbonos no extrato BDP apresentam massas moleculares reduzidas, que poderá estar relacionado com a ação catalítica do enzima pancreatina.

No entanto, as membranas estudadas apresentaram a capacidade de separar os CFs presentes no extrato BDP. Os coeficientes de rejeição aparentes para os FT variaram entre 53 % para as membranas de menor porosidade (AC20 e AC22) à PTM de 1 bar e 38 % na membrana AC35 (MWCO de 62 kDa). No entanto, apesar os permeados das membranas AC20 e AC22 à PTM de 3 bar apresentarem menor conteúdo em FT, comparativamente aos permeados da membrana AC35 à PTM de 3 bar, estes apresentam atividades biológicas semelhantes. Ou seja, os CBs

que as membranas AC20 e AC22 à PTM de 3 bar conseguem separaram apresentam maior atividade biológica.

Capítulo 4: Considerações Finais

Esta dissertação teve como objetivo o desenvolvimento de um extrato aquoso de folhas e talos de beterraba para posteriormente efetuar o isolamento de CBs. Este processo teve como base apresentar uma pegada ecológica baixa, evitar o recurso a temperaturas elevadas e ser de simples desenvolvimento. A metodologia utilizada para efetuar o isolamento de compostos bioativos presentes no extrato aquoso de folhas e talos de beterraba foi a tecnologia por membranas, utilizando um processo por ultrafiltração (UF). Este método está demonstrado como eficaz no isolamento de CBs e no fracionamento de extratos de plantas sem adição de solventes orgânicos, com elevada eficiência e baixo custo (222).

As propriedades medicinais da raiz da beterraba são estudadas intensamente pela comunidade científica, enquanto as suas folhas e talos não têm sido alvo de similar interesse, apesar de poderem apresentar características semelhantes. Assim, as folhas e talos da beterraba, considerados um resíduo agrícola, podem tornar-se uma fonte interessante para efetuar extração de CBs, tais como betanina, ácido cítrico, ácido ferúlico e derivados da vitexina.

Tradicionalmente, para a extração de CBs presentes em extratos de plantas recorre-se habitualmente a água quente, ácidos, bases ou solventes orgânicos. Os CFs são geralmente extraídos com a adição de um álcool, como o metanol ou etanol. No entanto, para a utilização destes extratos na indústria alimentar ou farmacêutica seria necessária uma etapa adicional para evaporar estes solventes orgânicos, também se verifica que extratos hidraalcoólicos influenciam os fluxos de permeação e a integridade das membranas durante o processo de filtração (222).

Em primeiro lugar, realizou-se um estudo para determinar o método de extração aquoso que apresentasse as melhores atividades biológicas e com quantificações mais elevadas em CBs. Para tal, desenvolveram-se os seguintes extratos aquosos: decocção (Bdec), extração assistida pelo enzima (EAE) pepsina (BDG), EAE pancreatina (BDP) e EAE pepsina e pancreatina (BDC), e os respetivos controlos BCG, BCP e BCC. Os extratos desenvolvidos com EAEs pretendiam simular a digestão, por esta razão foram utilizados enzimas do trato gastrointestinal. Verificou-se que os extratos aquosos das folhas e talos da beterraba conseguiram-se extrair CBs com atividades biológicas superiores aos reportados pela bibliografia, mas estes extratos utilizavam solventes orgânicos. Também foi possível verificar uma relação linear entre o conteúdo em CFs presentes nos extratos e a sua atividade antioxidante.

O extrato BDP apresentou as atividades antioxidantes (método DPPH) e a atividade inibitória da AChE mais elevadas, também se verificou que apresentava a maior quantificação em FT, proteínas e hidratos de carbono. Com a EAE pancreatina verificou-se que apresentava a capacidade de extrair maiores concentrações de compostos com menor quantidade de solvente. A análise estatística por PCA confirmou o extrato BDP como o que apresentava as melhores características das variáveis analisadas. Por estas razões foi o extrato aquoso de folhas e talos de beterraba com digestão enzimática com pancreatina (BDP) selecionado para o isolamento e purificação pela tecnologia de membranas.

Para efetuar o isolamento do extrato aquoso BDP recorreu-se a um processo de UF, no qual foram preparadas cinco membranas de acetato de celulose com os seguintes MWCO: 3.8 kDa,

4.6 kDa, 8.6 kDa, 32 kDa e 62 kDa. Efetuou-se a permeação do extrato BDP em modo de recirculação total. Utilizando sempre a mesma alimentação, recolheram-se frações dos permeados das cinco membranas nas PTMs de 1, 2 e 3 bar. Após a quantificação em FT, proteínas e hidratos de carbono, da atividade antioxidante (método DPPH) e da atividade inibitória da AChE, efetuou-se a análise estatística através de PCA para determinar a fração resultante das permeações que apresentava as melhores bioatividades. Foi possível relacionar as melhores atividades biológicas com os permeados resultantes à PTM de 3 bar, nomeadamente das membranas AC22 e AC35. Também se verificou que de entre os permeados os obtidos, as frações resultantes das permeações à PTM de 3 bar apresentaram quantificações superiores em FT.

Com as membranas estudadas neste trabalho foi possível efetuar o fracionamento do extrato BDP os solutos em suspensão e a maioria das proteínas e compostos relacionados quantificáveis pelo Coomassie R-250. Nos permeados foi possível o isolamento de aproximadamente 50 % dos FT e 20 % dos hidratos de carbono presentes no extrato. Os CFs são moléculas de baixa massa molecular, entre os 100 g/mol e os 700 g/mol (52), no entanto, os valores obtidos para os coeficientes de rejeição aparentes (f) dos FT para as membranas com os diferentes MWCO são elevados tendo em conta a massa molecular destes CFs. Este fato pode encontrar-se relacionado com os CFs estarem ligados a macromoléculas encontradas na matriz biológica, especialmente hidratos de carbono complexos, impedindo assim a sua permeação pelos poros da membrana (52).

Relativamente à atividade antioxidante, verificou-se que os permeados do extrato BDP, AC20_3 e AC22_3, apresentaram a concentração para 50 % de atividade antioxidante (método de DPPH) de 1.86 $\mu\text{g GAE/mL}$ em FT, enquanto o extrato original BDP apresentou 3.1 $\mu\text{g GAE/mL}$ em fenóis totais, ou seja, a atividade antioxidante pode ser atribuída aos CBs isolados com a utilização das membranas com MWCO de 3.8 kDa e 4.6 kDa à PTM de 3 bar. Os CBs presentes em maior quantidade nestes permeados foram o derivado do ácido ferúlico (composto 6^a) e dos derivados da isovitexina (composto 11). Contudo, ocorreu um aumento considerável dos compostos 2^a, 4 e 5, ou seja, a atividade antioxidante poderá estar associada a estes compostos, porém não foi possível efetuar a sua identificação.

O permeado do extrato BDP da membrana AC22 à PTM de 3 bar apresentou a atividade inibitória da AChE mais elevada, com 50% desta atividade à concentração de 25.92 $\mu\text{g GAE/mL}$ em FT, validando que este permeado poderá apresentar CBs com maior bioatividade.

Os perfis dos cromatogramas do HPLC-DAD do extrato BDP e dos diferentes permeados estudados apresentaram modificações ligeiras, em termos de compostos separados e na intensidade de absorvência dos picos, no entanto esta técnica de separação e identificação não consegue detetar todos os compostos presentes no extrato BDP. Este fato, pode sugerir que no processo de permeação pelas membranas se perdem outros compostos, e não apenas aqueles que são separados nos cromatogramas da HPLC-DAD. Verificou-se o enriquecimento dos permeados obtidos pelas membranas estudadas em CBs, porque ocorreu a eliminação de

compostos que se viu diminuir na alimentação, como o caso das proteínas, no entanto também pode ter ocorrido a separação de CBs que poderiam estar ligados às proteínas.

Através do HPLC-DAD, foi possível a quantificação dos CBs: rutina (composto 10), derivado do ácido ferúlico (composto 6^a) e de dois derivados da vitexina (vitexina – composto 7 e isovitexina – composto 11). Denotou-se que a concentração do derivado do ácido ferúlico (composto 6^a) era maior nos permeados resultantes das membranas com MWCO de 3.8 kDa e 4.6 kDa e o derivado da isovitexina apresentou maiores concentrações em todos os permeados, com exceção da membrana com MWCO de 3.8 kDa. Os permeados resultantes das permeações das membranas AC25, AC28 e AC35 apresentaram concentrações superiores do flavonol rutina. Mas o derivado da vitexina apresentou sempre concentrações superiores na alimentação do que nos permeados. As atividades biológicas dos permeados das membranas de porosidade (AC20 e AC22) podem ser atribuídas ao derivado do ácido ferúlico e do derivado da isovitexina, bem como à presença de picos nestes permeados com maior intensidade dos compostos 2^a, 4 e 5, mas não foi possível efetuar a sua identificação.

Os permeados resultantes das membranas com maior porosidade (AC28 e AC35) apresentaram maior conteúdo em CFs, e como demonstrado anteriormente, existe uma relação linear entre a atividade antioxidante e quantidade de CFs presentes no extrato. Mas o enriquecimento destes permeados em rutina (composto 10) e no derivado da isovitexina (composto 11) foi importante para a manutenção das atividades biológicas.

Por outro lado, nenhum dos permeados estudado apresentou enriquecimento no composto derivado da vitexina (composto 7), apesar deste composto estar reportado por possuir elevadas atividades biológica (148,205,207,216,223), neste trabalho não foi possível atribuir as atividades biológicas determinadas apenas a este composto.

Os compostos identificados por espectrometria de massa, no extrato BDP e nos permeados das membranas foram: betanina (M5), ácidos orgânicos (ácido málico (M1) e cítrico (M2)), os aminoácidos (fenilalanina (M4) e triptofano (M6)), os ácidos fenólicos (ácido *p*-cumárico (M3) e ácido ferúlico (M14)) e flavonoides (rutina (M12), vitexina -2"-O-ramnoside (M8), apigenina 6,8-glucosideo ou *vicenin* (M7), a *schafoside* ou *corymboside* (M7) e a vitexina-6"-O-malonyl-2"-O-xyloside(M14)). Na sua generalidade, os permeados resultantes das membranas estudadas permitiram a identificação mais simplificada por LC-QTOF-MS.

Para além disso, os resultados de citotoxicidade obtidos para o extrato BDP e os seus permeados resultantes das membranas com MWCO com 4.6 kDa e 62 kDa à PTM de 3 bar permitiu concluir que nenhum é tóxico para as células hepáticas humanas e como tal, apresentam potencial para poderem ser utilizadas como fontes seguras dos compostos fenólicos que contêm.

As membranas de acetato de celulose apresentaram um aumento da permeabilidade hidráulica (Lp) com o aumento da porosidade das membranas estudadas. Enquanto, os coeficientes de rejeição aparente aos FT, proteínas e hidratos de carbono diminuíram com aumento do MWCO das membranas e da TMP. Minhalma *et al.*(132) e Giacobbo *et al.* (128) verificaram o aumento

dos coeficientes de rejeição aparentes para os FT e taninos com o aumento da TMP, mas este fato foi atribuído à composição do extrato utilizado neste estudos, águas residuais do tratamento da cortiça e águas residuais da indústria vitícola, respetivamente. Visto estes efluentes apresentarem compostos fenólicos (taninos) de elevadas dimensões e as membranas ficarem mais suscetíveis a fenómenos de polarização de concentração/colmatação. Por esta razão foi possível supor que os CFs presentes no extrato BDP são de menores massas moleculares, como identificado na composição do extrato BDP em CFs que apresentam compostos de menores dimensões uma vez que o método de extração enzimática por pancreatina hidrolisa as ligações de hidratos de carbono, proteínas ou até mesmo entre os polímeros de CFs.

Relativamente, aos coeficientes de rejeição intrínseco (f') para os FT, proteínas e hidratos de carbono verificou-se que diminuía com o aumento da porosidade da membrana, é importante lembrar que este coeficiente relaciona a concentração de soluto presente na camada adjacente da membrana com a concentração de soluto na alimentação. Enquanto, o coeficiente de transferência de massa (k) aumentou com o aumento da porosidade das membranas. No entanto, não se verificou fenómenos de polarização de concentração nas membranas estudadas.

Os extratos aquosos das folhas e talos da beterraba apresentam elevadas atividades biológicas, e utilizando as extrações assistidas por enzimas foi possível extrair maior quantidade de CBs, em particular o enzima pancreatina. Com as membranas preparadas neste trabalho com diferentes MWCO foi possível verificar que os permeados resultantes destas membranas, apesar de apresentarem perfis de cromatogramas por HPLC-DAD semelhantes, possuem atividades biológicas distintas, este fato pode ser atribuído às diferentes concentrações de CBs presentes em cada permeado. No entanto, verificou-se que os permeados à PTM de 3 bar apresentavam maiores conteúdo em FT e conseqüentemente maiores atividades antioxidantes. Mas os permeados que apresentam tanto maiores atividades antioxidante e atividades inibitórias das AChE foram o permeado AC22_3 (MWCO de 4.6 kDa) e o permeado AC35_3 (MWCO=62 kDa). Desta forma, verificou-se que o permeado AC22_3 enriquecido em ácido ferúlico, betanina e derivado da isovitexina apresentou bioatividades elevadas com menores quantidades em FT. Por outro lado, o permeado AC35_3 apresentou maiores conteúdos em FT e encontrava-se enriquecido em rutina e derivado da isovitexina.

Com a aplicação da tecnologia das membranas foi possível isolar CBs presentes no extrato BDP, permitindo obter um permeado com elevada atividade antioxidante, que pode ser utilizado para suplementar dietas ou incorporar produtos alimentares (massas, sucos ou molhos).

Capítulo 5: Perspetivas Futuras

Para dar continuidade a este trabalho seria interessante aprofundar a preparação do extrato aquoso por digestão enzimática, para tal, seria pertinente efetuar um estudo para determinar as condições ótimas de extração de CBs, variando o tempo de incubação, ratio entre enzima/extrato (222). Também se poderia avaliar se as lavagens do *pelet* resultante das centrifugações apresentam influência sobre a atividade inibitória da AChE, visto ter-se verificado uma diferença relevante entre quantificações efetuadas com estas adaptações.

Este trabalho experimental permitiu analisar membranas com diferentes MWCO na separação do extrato BDP. No entanto, um processo integrado de membranas de MF, UF e NF em modo de concentração, permitiria efetuar a separação das proteínas, dos FT e dos hidratos de carbono com maior eficácia. Assim, com a membrana de MF permitiria a separação dos solutos em suspensão e proteínas, de seguida com a UF os CFs dos hidratos de carbono, e no final com as membranas de NF permitiria obter um concentrado rico em CFs e um permeado com elevadas concentrações em hidratos de carbono (52).

Uma alternativa a este processo integrado de membranas seria a utilização do modo de diafiltração, com duas membranas com MWCO de 62 kDa e de 4.8 kDa. Assim permitiria concentrar os compostos fenólicos que apresentassem melhores atividades biológicas neste trabalho.

Para melhorar a identificação dos compostos presentes no extrato BDP, seria pertinente efetuar a análise do extrato e dos permeados num sistema integrado HPLC com um detetor DAD e com espetrometria de massa acoplado. Assim permitiria a identificação dos outros compostos presentes no extrato e nos permeados, nomeadamente os compostos 2^a), 4 e 5.

Também seria de interesse determinar se as membranas de acetato de celulose estabelecem interações com os compostos presentes nas folhas e talos de beterraba, e efetuar uma avaliação dos compostos que ficam adsorvidos nas membranas após os ensaios de permeação, através do método FTIR.

Para a caracterização do extrato do BDP e dos permeados resultantes das permeações pelas membranas estudadas seria pertinente avaliar o potencial de inibição da HMG-CoA redutase e da capacidade de inibição de permeação do colesterol na barreira gastro intestinal.

Capítulo 6: Referências Bibliográficas

1. World Health Organization - Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. [cited 2019 Oct 16]. Available from: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-cvds>
2. Suwal S, Marciniak A. Technologies for the Extraction, Separation and Purification of polyphenols – A Review. *Nepal J Biotechnol.* 2019;6(1):74–91.
3. Al-Mansoub MA, Asmawi MZ, Murugaiyah V. Effect of extraction solvents and plant parts used on the antihyperlipidemic and antioxidant effects of *Garcinia atroviridis*: A comparative study. *J Sci Food Agric.* 2014;94(8):1552–8.
4. Lorizola IM, Furlan CPB, Portovedo M, Milanski M, Botelho PB, Bezerra RMN, et al. Beet stalks and leaves (*Beta vulgaris* L.) protect against high-fat diet-induced oxidative damage in the liver in mice. *Nutrients.* 2018;10(7).
5. Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D, Hertog MGL, Hollman PCH, Hertog MGL, et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 1993;342(8878):1007–11.
6. Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, et al. Flavonoid Intake and Long-term Risk of Coronary Heart Disease and Cancer in the Seven Countries Study. *Arch Intern Med.* 1995;155(4):381–6.
7. Knekt P, Järvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: A cohort study. *Br Med J.* 1996;312(7029):478–81.
8. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review. Vol. 96, *Journal of the American Dietetic Association.* 1996. p. 1027–39.
9. Pyo YH, Lee TC, Logendra L, Rosen RT. Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. *Food Chem.* 2004;85(1):19–26.
10. Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *J Agric Food Chem.* 2001;49(11):5315–21.
11. Ravichandran K, Ahmed AR, Knorr D, Smetanska I. The effect of different processing methods on phenolic acid content and antioxidant activity of red beet. *Food Res Int* [Internet]. 2012;48(1):16–20.
12. Kadereit G, Borsch T, Weising K, Freitag H. Phylogeny of Amaranthaceae and Chenopodiaceae and the evolution of C4photosynthesis. *Int J Plant Sci.* 2003;164(6):959–86.
13. Clifford T, Howatson G, West DJ, Stevenson EJ. The potential benefits of red beetroot supplementation in health and disease. *Nutrients.* 2015;7(4):2801–22.
14. Chhikara N, Kushwaha K, Sharma P, Gat Y, Panghal A. Bioactive compounds of beetroot and utilization in food processing industry: A critical review. *Food Chem.* 2019;272(August 2018):192–200.
15. Fernandez M V, Jagus RJ, Agüero M V. Evaluation and Characterization of Nutritional , Microbiological and Sensory Properties of Beet Greens. *Acta Sci Nutr Heal.* 2017;1(3):37–45.
16. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology.* 2000;7(3):153–63.
17. Galanakis CM. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci Technol .* 2012;26(2):68–87.
18. Ajila CM, Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Godbout S, Valéro JR. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Crit Rev Biotechnol.* 2011;31(3):227–49.
19. Castro-Puyana M, Marina ML, Plaza M. Water as green extraction solvent: Principles and reasons for its use. *Curr Opin Green Sustain Chem* [Internet]. 2017;5:31–6.
20. Carmona-Gómez LA, Piovesana A, Noreña CPZ, Brandelli A. Separation of polyphenolic compounds by ultrafiltration of bordo grape (*Vitis labrusca* var. bordo) skin extract. *Rev Mex Ing Quim.* 2018 Jan 1;17(1):203–13.
21. Cassano A. Recovery Technologies for Water-Soluble Bioactives: Advances in Membrane-Based Processes. In: Hoss YD, editor. *In Engineering Foods for Bioactives Stability and Delivery.* New York: Springer; 2017. p. 51–83.
22. Guaadaoui A, Benaicha S, Elmajdoub N, Bellaoui M, Hamal A. What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *Int J Food Sci Nutr.* 2014;3(3):17–179.
23. Bernhoft A. A brief review on bioactive compounds in plants. In: *Bioactive compounds in plants - benefits and risks for man and animals.* 2008. p. 11–7.

24. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. *Plant Second Metab Occur Struct Role Hum Diet*. 2007;(November):1–24.
25. Takshak S. Bioactive Compounds in Medicinal Plants: A Condensed Review. *SEJ Pharmacogn* 2018 (1)1. 2018;1(1).
26. Kabera JN, Semana E, Mussa AR, He X. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *J Pharm Pharmacol*. 2014;2:377–92.
27. Balyan U, Verma SP, Sarkar B. Phenolic compounds from *Syzygium cumini* L. Skeels leaves: Extraction and membrane purification. *J Appl Res Med Aromat Plants*. 2019;12(February 2018):43–58.
28. Jamwal K, Bhattacharya S, Puri S. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *J Appl Res Med Aromat Plants*. 2018 May;9:26–38.
29. Ludwiczuk A, Skalicka-Wó Zniak K, Georgiev MI. Terpenoids Learning Objectives G [Internet]. *Pharmacognosy*. 2016. 233–266 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00011-1>
30. El Gharras H. Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *Int J Food Sci Technol*. 2009;44(12):2512–8.
31. Zhao X, Zu Y, Li Q, Wang M, Zu B, Zhang X, et al. Preparation and characterization of camptothecin powder micronized by a supercritical antisolvent (SAS) process. *J Supercrit Fluids*. 2010;51(3):412–9.
32. Shetty K. Role of proline-linked pentose phosphate pathway in biosynthesis of plant phenolics for functional food and environmental applications: A review. Vol. 39, *Process Biochemistry*. 2004. p. 789–804.
33. Shahidi F, Nacz M. Phenolics in Food and Nutraceuticals. 1^a. CRC Press LLD, editor. New York, Florida; 2004.
34. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*. 2006;99(1):191–203.
35. Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. Vol. 3, *Molecular Plant*. 2010. p. 2–20.
36. Nacz M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr*. 2004;1054 (1–2):95–111.
37. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Vol. 2, *Nutrients*. 2010. p. 1231–46.
38. Lorenz M. Cellular targets for the beneficial actions of tea polyphenols 1-4. *Am J Clin Nutr*. 2013;98(6).
39. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:727–47.
40. Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr*. 2005;81(1 Suppl):223S–229S.
41. Vardhan PV, Shukla LI. Gamma irradiation of medicinally important plants and the enhancement of secondary metabolite production. *Int J Radiat Biol*. 2017;93(9):967–79.
42. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:727–47.
43. Mattila P, Hellström J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *J Food Compos Anal*. 2007;20(3–4):152–60.
44. Mudnic I, Modun D, Rastija V, Vukovic J, Brizic I, Katalinic V, et al. Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. *Food Chem*. 2010;119(3):1205–10.
45. Yasuko K, Tomohiro N, Sei-Itsu M, Ai-Na L, Yasuo F, Takashi T. Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab*. 1984;792(1):92–7.
46. King PJ, Ma G, Miao W, Jia Q, McDougall BR, Reinecke MG, et al. Structure-activity relationships: Analogues of the dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids as potent inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and replication. *J Med Chem*. 1999;42(3):497–509.
47. Huang MT, Ma W, Yen P, Xie JG, Han J, Frenkel K, et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and protein in HeLa cells. *Carcinogenesis*. 1996;17(4):761–5.
48. Huang Z, Fasco MJ, Kaminsky LS. Inhibition of estrone sulfatase in human liver microsomes by

- quercetin and other flavonoids. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1997;63(1–3):9–15.
49. PubChem [Internet]. [cited 2019 Oct 5]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
 50. Hsu CL, Wu CH, Huang SL, Yen GC. Phenolic compounds rutin and o-coumaric acid ameliorate obesity induced by high-fat Diet in rats. *J Agric Food Chem.* 2009;57(2):425–31.
 51. Tungmunnithum D, Thongboonyou A, Pholboon A, Yangsabai A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines.* 2018;5(3):93.
 52. Moraes IVM d., Rabelo RS, Pereira JA d. L, Hubinger MD, Schmidt FL. Concentration of hydroalcoholic extracts of graviola (*Annona muricata* L.) pruning waste by ultra and nanofiltration: Recovery of bioactive compounds and prediction of energy consumption. *J Clean Prod.* 2018;174:1412–21.
 53. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 2002;13(10):572–84.
 54. Hollman PCH, Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother.* 1997;51(8):305–10.
 55. Anand David AV, Arulmoli R, Parasuraman S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. Vol. 10, *Pharmacognosy Reviews.* 2016. p. 84–9.
 56. Singh M, Kaur M, Silakari O. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. Vol. 84, *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2014. p. 206–39.
 57. McDougall GJ, Fyffe S, Dobson P, Stewart D. Anthocyanins from red cabbage - stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry.* 2007;68(9):1285–94.
 58. Astadi IR, Astuti M, Santoso U, Nugraheni PS. In vitro antioxidant activity of anthocyanins of black soybean seed coat in human low density lipoprotein (LDL). *Food Chem.* 2009;112(3):659–63.
 59. Du Q, Zheng J, Xu Y. Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity. *J Food Compos Anal.* 2008;21(5):390–5.
 60. Wang H, Cao G, Prior RL. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. *J Agric Food Chem.* 1997;45(2):304–9.
 61. Natesh N H, SK A, L A. An overview of nutritional and anti nutritional factors in green leafy vegetables. *Hortic Int Journal .* 2017;1(2).
 62. Miguel MG. Betalains in some species of the amaranthaceae family: A review. *Antioxidants.* 2018;7(4):1–33.
 63. Guaadaoui A. Betalains, Polyacetylenes and Tocols as Biocompounactives: A Concise Review for Enriching the Bioactivity Concept. *Int J Nutr Food Sci.* 2014;3(4):230.
 64. Gonçalves LCP, Marcato AC, Rodrigues ACB, Pagano APE, De Freitas BC, De Machado CO, et al. Betalains: From the colors of beetroots to the fluorescence of flowers. *Rev Virtual Quim.* 2015;7(1):292–309.
 65. Celli GB, Brooks MSL. Impact of extraction and processing conditions on betalains and comparison of properties with anthocyanins — A current review. *Food Res Int .* 2017;100:501–9.
 66. Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Machado Xavier R. Influência de processos redox na resposta inflamatória da artrite reumatóide. Vol. 48, *Revista Brasileira de Reumatologia.* 2008. p. 17–24.
 67. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging (cancer/mutation/endogenous DNA adducts/oxygen radicals). *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90(17):7915–22.
 68. Gutteridge JMC, Halliwell B. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? Vol. 502, *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2018. p. 183–6.
 69. Cervantes Gracia K, Llanas-Cornejo D, Husi H. CVD and Oxidative Stress. *J Clin Med.* 2017 Feb 20;6(2):22.
 70. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC, et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review. Vol. 15, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2014. p. 4405–9.
 71. Uttara B, Singh A, Zamboni P, Mahajan R. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharmacol.* 2009 Mar 6;7(1):65–74.

72. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.
73. Lushchak VI. Free radicals , reactive oxygen species , oxidative stresses and their classifications *Chemico-Biological Interactions* Free radicals , reactive oxygen species , oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*. 2016;224(April):164–75.
74. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. Vol. 97, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015. p. 55–74.
75. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15(10):7313–52.
76. Kanner J, Harel S, Granit R. Betalains - A new class of dietary cationized antioxidants. *J Agric Food Chem*. 2001;49(11):5178–85.
77. Khan MI. Plant Betalains: Safety, Antioxidant Activity, Clinical Efficacy, and Bioavailability. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2016;15(2):316–30.
78. Gliszczynska-Świgło A, Szymusiak H, Malinowska P. Betanin, the main pigment of red beet: Molecular origin of its exceptionally high free radical-scavenging activity. *Food Addit Contam*. 2006;23(11):1079–87.
79. Kahl R, Kappus H. [Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E]. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1993;196(4):329–38.
80. Roseiro LB, Rauter AP, Serralheiro MLM. Polyphenols as acetylcholinesterase inhibitors: Structural specificity and impact on human disease. *Nutr Aging*. 2012;1(2):99–111.
81. Araújo CRM, Santos VLA, Gonsalves AA. Acetylcholinesterase - AChE: A pharmacological interesting enzyme. *Rev Virtual Quim*. 2016;8(6):1818–34.
82. Silva L, Rodrigues AM, Ciriani M, Falé PLV, Teixeira V, Madeira P, et al. Antiacetylcholinesterase activity and docking studies with chlorogenic acid, cynarin and arzanol from *Helichrysum stoechas* (Lamiaceae). *Med Chem Res*. 2017;26(11):2942–50.
83. Ressaissi A, Attia N, Falé PL V, Pacheco R, Teixeira VH. Aqueous Extracts from Nopal (*Opuntia Ficus-Indica*): Antiacetylcholinesterase and Antioxidant Activity from Phenolic Bioactive Compounds. 2016;5(3):337–48.
84. Rodrigues A, Falé P, Ascensão L, Serralheiro M. *Santolina impressa*, a Portuguese endemic species: Inhibition of acetylcholinesterase, antioxidant activity and cell toxicity. *Planta Med*. 2014;80(16).
85. Chao X, Wang G, Tang Y, Dong C, Li H, Wang B, et al. The effects and mechanism of peiminine-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *PLoS One*. 2019;14(1):1–13.
86. Miret S, De Groene EM, Klaffke W. Comparison of in vitro assays of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2. *J Biomol Screen*. 2006;11(2):184–93.
87. Mustafa A, Turner C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal Chim Acta*. 2011;703(1):8–18.
88. Hutzler P, Fischbach R, Heller W, Jungblut TP, Reuber S, Schmitz R, et al. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J Exp Bot*. 1998;49(323):953–65.
89. Xu G, Ye X, Chen J, Liu D. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *J Agric Food Chem*. 2007;55(2):330–5.
90. Oreopoulou A, Tsimogiannis D, Oreopoulou V. Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. *Polyphenols in Plants*. 2019;(January):243–59.
91. Vinatoru M, Mason TJ, Calinescu I. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. Vol. 97, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2017. p. 159–78.
92. Giergielewicz-Mozajska H, Dabrowski L, Namieśnik J. Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples - Some aspects of theory and practice. *Crit Rev Anal Chem*. 2001;31(3):149–65.
93. Bozinou E, Karageorgou I, Batra G, G. Dourtoglou V, I. Lalas S. Pulsed Electric Field Extraction and Antioxidant Activity Determination of *Moringa oleifera* Dry Leaves: A Comparative Study with Other Extraction Techniques. *Beverages*. 2019;5(1):8.

94. Giacometti J, Bursać Kovačević D, Putnik P, Gabrić D, Bilušić T, Krešić G, et al. Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Res Int.* 2018;113:245–62.
95. Baiano A, Del Nobile MA. Antioxidant Compounds from Vegetable Matrices: Biosynthesis, Occurrence, and Extraction Systems. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016;56(12):2053–68.
96. Azwanida N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants.* 2015;04(03):3–8.
97. Vongsak B, Sithisarn P, Mangmool S, Thongpraditchote S, Wongkrajang Y, Gritsanapan W. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Ind Crops Prod.* 2013;44:566–71.
98. Pedersen AR, Nielsen JF, Jensen J, Maribo T. Referral decision support in patients with subacute brain injury: evaluation of the Rehabilitation Complexity Scale–Extended. *Disabil Rehabil.* 2017;39(12):1221–7.
99. Kaufmann B, Christen P. Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem Anal.* 2002;13(2):105–13.
100. Rathi B, Patil PA, Baheti AM. Evaluation of aqueous extract of pulp and seeds of *Moringa oleifera* for wound healing in albino rats. *J Nat Remedies.* 2004;4(2):145–9.
101. Amid A, Salim RJM, Adenan MI. The factors affecting the extraction condition for neuroprotective activity of *Centella asiatica* evaluated by metal chelating activity assay. *J Appl Sci.* 2010;10(10):837–42.
102. Dhanani T, Shah S, Gajbhiye NA, Kumar S. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arab J Chem.* 2017;10:S1193–9.
103. Alupului A, Călinescu I, Lavric V. Microwave Extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Sci Bull Ser B Chem Mater Sci.* 2012;74(2):129–42.
104. Kate A, Anupama S, Shahi N, Pandey P. Novel Eco-Friendly Techniques for Extraction of Food Based Lipophilic Compounds from Biological Materials. *Nat Prod Chem Res.* 2016;4(5).
105. Belwal T, Ezzat SM, Rastrelli L, Bhatt ID, Daglia M, Baldi A, et al. A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2018;100:82–102.
106. Klejdus B, Kubá V. High performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in seed exudates of *Festuca arundinacea* and *F. pratense*. *Phytochem Anal.* 2000;11(6):375–9.
107. Potter DW, Pawliszyn J. Rapid Determination of Polyaromatic Hydrocarbons and Polychlorinated Biphenyls in Water Using Solid-Phase Microextraction and GC/MS. *Environ Sci Technol.* 1994;28(2):298–305.
108. Eljaddi T, Lebrun L, Hlaibi M, Reactions L, Louraine U De. Review on Mechanism of Facilitated Transport on Liquid Membranes Graphical abstract Keywords. 2017;3:199–208.
109. Jhaveri JH, Murthy ZVP. A comprehensive review on anti-fouling nanocomposite membranes for pressure driven membrane separation processes. Vol. 379, *Desalination.* 2016. p. 137–54.
110. Chaudhuri J. *Bioseparations Engineering: Principles, Practice and Economics.* Food Bioprod Process. 2001;79(4):251–2.
111. Rastreio M da G. Portal Laboratório Virtual de Processos Químicos. [cited 2019 Aug 23]. Available from: http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=57&Itemid=206
112. Yu X, Bogaert L, Hu R, Bals O, Grimi N, Vorobiev E. A combined coagulation–ultrafiltration method for enhanced separation of proteins and polyphenols. *Sep Sci Technol.* 2016;51(6):1030–41.
113. Castro-Muñoz R, Conidi C, Cassano A. Recovery of Phenolic-Based Compounds From Agro-Food Wastewaters Through Pressure-Driven Membrane Technologies. *Separation of Functional Molecules in Food by Membrane Technology.* 2019. 195–228 p.
114. Cui ZF, Jiang Y, Field RW. *Fundamentals of Pressure-Driven Membrane Separation Processes.* In: *Membrane Technology.* 2010. p. 1–18.
115. Cheryan M. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook.* Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. 1998.
116. Yu W, Liu T, Crawshaw J, Liu T, Graham N. Ultrafiltration and nanofiltration membrane fouling by natural organic matter: Mechanisms and mitigation by pre-ozonation and pH. *Water Res.*

- 2018;139:353–62.
117. Baker RW. *Membrane Technology and Applications*. 2^a. California: John Wiley and Sons Ltd; 2004.
 118. Silva D. Otimização do fracionamento do efluente da cortiça recorrendo a tecnologia de membranas e estudo dos seus potenciais biológicos Otimização do fracionamento do efluente da cortiça recorrendo a tecnologia de membranas e estudo dos seus potenciais biológicos. ISEL; 2018.
 119. Mulder M. *Basic principles of membrane technology*. 2^a. Ensched: Kluwer Academic Publishers; 1996.
 120. Hylton K, Mitra S. Automated, on-line membrane extraction. Vol. 1152, *Journal of Chromatography A*. 2007. p. 199–214.
 121. Martín J, Díaz-Montaña EJ, Asuero AG. Recovery of Anthocyanins Using Membrane Technologies: A Review. *Crit Rev Anal Chem*. 2018;48(3):143–75.
 122. Pinnau I, Freeman BD. Formation and modification of polymeric membranes: Overview. *ACS Symp Ser*. 1999;744:1–22.
 123. Van Der Bruggen B, Vandecasteele C, Van Gestel T, Doyen W, Leysen R. A review of pressure-driven membrane processes in wastewater treatment and drinking water production. *Environ Prog*. 2003;22(1):46–56.
 124. Jakubowska N, Polkowska Z, Namieśnik J, Przyjazny A. Analytical applications of membrane extraction for biomedical and environmental liquid sample preparation. Vol. 35, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2005. p. 217–35.
 125. Bernardo M, Santos A, Cantinho P, Minhalma M. Cork industry wastewater partition by ultra/nanofiltration: A biodegradation and valorisation study. *Water Res* 2011;45(2):904–12.
 126. Bernardo M. Fraccionamento do Efluente da Indústria da Cortiça por Ultra-Nanofiltração: Caracterização e Estudo da sua Biodegradabilidade. ISEL; 2010.
 127. Gomes L. Estudo do efeito anti-tumorale antioxidante de diferentes fracções recuperados do efluente da cortiça através do processo de membranas. ISEL; 2016.
 128. Giacobbo A, Bernardes AM, Rosa MJF, De Pinho MN. Concentration polarization in ultrafiltration/nanofiltration for the recovery of polyphenols from winery wastewaters. *Membranes (Basel)*. 2018;8(3).
 129. Porter MC. Concentration Polarization in Reverse Osmosis and Ultrafiltration. In: *Synthetic Membranes: Science, Engineering and Applications*. 1986. p. 367–88.
 130. R. Byron Bird Warren E. Stewart Edwin N. Lightfoot, Bird RB, Stewart WE, Lightfoot EN. Transport phenomena, R. B. Bird, W. E. Stewart, and E. N. Lightfoot, John Wiley and Sons, Inc., New York(1960). *AIChE J*. 1961;7(2):5J-6J.
 131. Giacobbo A, Bernardes AM, de Pinho MN. Sequential pressure-driven membrane operations to recover and fractionate polyphenols and polysaccharides from second racking wine lees. *Sep Purif Technol*. 2017;173:49–54.
 132. Minhalma M, Dias C, De Pinho M. Membrane Fouling in Ultrafiltration of Cork Processing Wastewaters. *Adv Environ Res*. 1999;3(4):539–49.
 133. Corson MacNeil J. Membrane separation technologies for treatment of hazardous wastes. *Crit Rev Environ Control*. 1988;18(2):91–131.
 134. Garcia-Castello E, Cassano A, Criscuoli A, Conidi C, Drioli E. Recovery and concentration of polyphenols from olive mill wastewaters by integrated membrane system. *Water Res*. 2010;44(13):3883–92.
 135. El-Abbassi A, Hafidi A, García-Payo MC, Khayet M. Concentration of olive mill wastewater by membrane distillation for polyphenols recovery. *Desalination*. 2009 Sep 15;245(1–3):670–4.
 136. Díaz-Reinoso B, Moure A, Domínguez H, Parajó JC. Ultra - and nanofiltration of aqueous extracts from distilled fermented grape pomace. *J Food Eng*. 2009;91(4):587–93.
 137. Minhalma M, De Pinho MN. Tannic-membrane interactions on ultrafiltration of cork processing wastewaters. *Sep Purif Technol*. 2001;22–23:479–88.
 138. Liu D., Vorobiev D., Savoie R., Lanoiselle J-. L. Extraction of polyphenols from grape seeds by unconventional methods and extract concentration through polymeric membrane. *Food Process Eng a Chang World Proc 11th Int Congr Eng Food*. 2011;1939–40.
 139. Yammine S, Brianceau S, Manteau S, Turk M, Ghidossi R, Vorobiev E, et al. Extraction and purification of high added value compounds from by-products of the winemaking chain using

- alternative/nonconventional processes/technologies. Crit Rev Food Sci Nutr . 2018;58(8):1375–90.
140. Magueijo V, Minhalma M, Queiroz D, Geraldés V, Macedo A, de Pinho MN. Reduction of wastewaters and valorisation of by-products from “Serpa” cheese manufacture using nanofiltration. Water Sci Technol. 2005;52(10–11):393–9.
 141. Russo C. A new membrane process for the selective fractionation and total recovery of polyphenols, water and organic substances from vegetation waters (VW). J Memb Sci. 2007;288(1–2):239–46.
 142. Nawaz H, Shi J, Mittal GS, Kakuda Y. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. Sep Purif Technol. 2006;48(2):176–81.
 143. Díaz-Reinoso B, Moure A, Domínguez H, Parajó JC. Membrane concentration of antioxidants from *Castanea sativa* leaves aqueous extracts. Chem Eng J. 2011;175(1):95–102.
 144. Cassano A, Conidi C, Ruby-Figueroa R, Castro-Muñoz R. Nanofiltration and tight ultrafiltration membranes for the recovery of polyphenols from agro-food by-products. Int J Mol Sci. 2018;19(2).
 145. Khemakhem I, Gargouri OD, Dhoubi A, Ayadi MA, Bouaziz M. Oleuropein rich extract from olive leaves by combining microfiltration, ultrafiltration and nanofiltration. Sep Purif Technol. 2017;172:310–7.
 146. Gokhale S V., Lele SS. Betalain Content and Antioxidant Activity of *Beta vulgaris*: Effect of Hot Air Convective Drying and Storage. J Food Process Preserv. 2014;38(1):585–90.
 147. Chawla H, Parle M, Sharma K, Yadav M. Beetroot: A health promoting functional food. Inven Rapid Nutraceuticals . 2016;2016(1):1–5.
 148. Ninfali P, Angelino D. Nutritional and functional potential of *Beta vulgaris cicla* and *rubra*. Fitoterapia. 2013;89(1):188–99.
 149. USDA. Natural Resources Conversation Service [Internet]. [cited 2010 Aug 6]. Available from: <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=BEVU2>
 150. Neha P, Sk J, Nk J, Hk J, Hk M. Chemical and Functional Properties of Beetroot (*Beta vulgaris* L .) for Product Development : A Review. Int J Chem Stud. 2018;6(3):3190–4.
 151. Plantfinder: Inspiration, Ideas, Advice [Internet]. [cited 2019 Aug 20]. Available from: https://www.gardensonline.com.au/GardenShed/PlantFinder/Show_2003.aspx
 152. Jeba Kezi J JHS V. Betalain- a boon to the food industry. Discovery. 2014;20(63):51–8.
 153. Lidder S, Webb AJ. Vascular effects of dietary nitrate (as found in green leafy vegetables and beetroot) via the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. Br J Clin Pharmacol. 2013;75(3):677–96.
 154. Vissers A, Kiskini A, Hilgers R, Marinea M, Wierenga PA, Gruppen H, et al. Enzymatic Browning in Sugar Beet Leaves (*Beta vulgaris* L.): Influence of Caffeic Acid Derivatives, Oxidative Coupling, and Coupled Oxidation. J Agric Food Chem. 2017;65(24):4911–20.
 155. Gil MI, Ferreres F, Tomás-Barberán FA. Effect of Modified Atmosphere Packaging on the Flavonoids and Vitamin C Content of Minimally Processed Swiss Chard (*Beta vulgaris* Subspecies *cycla*). J Agric Food Chem. 1998;46(5):2007–12.
 156. Guldiken B, Toydemir G, Nur Memis K, Okur S, Boyacioglu D, Capanoglu E. Home-processed red beetroot (*Beta vulgaris* L.) products: Changes in antioxidant properties and bioaccessibility. Int J Mol Sci. 2016;17(6).
 157. Koubaier HBH, Snoussi A, Essaidi I, Chaabouni MM, Thonart P, Bouzouita N. Betalain and phenolic compositions, antioxidant activity of Tunisian red beet (*Beta vulgaris* L. *conditiva*) roots and stems extracts. Int J Food Prop. 2014;17(9):1934–45.
 158. Kujawska M, Ignatowicz E, Murias M, Ewertowska M, Mikołajczyk K, Jodynis-Liebert J. Protective effect of red beetroot against carbon tetrachloride- and N-nitrosodiethylamine-induced oxidative stress in rats. J Agric Food Chem. 2009;57(6):2570–5.
 159. Nemzer B, Pietrzowski Z, Spórna A, Stalica P, Thresher W, Michałowski T, et al. Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. Food Chem. 2011;127(1):42–53.
 160. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. J Agric Food Chem. 1998;46(10):4113–7.
 161. Holmes RP, Assimos DG. The impact of dietary oxalate on kidney stone formation. Vol. 32, Urological Research. 2004. p. 311–6.
 162. Strack D, Vogt T, Schliemann W. Recent advances in betalain research. Vol. 62, Phytochemistry. 2003. p. 247–69.

163. Reddy MK, Alexander-Lindo RL, Nair MG. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *J Agric Food Chem.* 2005;53(23):9268–73.
164. Georgiev VG, Weber J, Kneschke EM, Denev PN, Bley T, Pavlov AI. Antioxidant activity and phenolic content of betalain extracts from intact plants and hairy root cultures of the red beetroot *Beta vulgaris* cv. *Detroit Dark Red*. *Plant Foods Hum Nutr.* 2010;65(2):105–11.
165. Zielińska-Przyjemska M, Olejnik A, Dobrowolska-Zachwieja A, Grajek W. In vitro effects of beetroot juice and chips on oxidative metabolism and apoptosis in neutrophils from obese individuals. *Phyther Res.* 2009;23(1):49–55.
166. Satyanand V, Vali S, Krishna B. A study of beet root derived dietary nitrate efficacy on performance of Runners. *Ind J Basic Appl Med Res.* 2014;3(May):690–5.
167. Gheith I, El-Mahmoudy A. Laboratory evidence for the hematopoietic potential of *Beta vulgaris* leaf and stalk extract in a phenylhydrazine model of anemia. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol.* 2018;51(11):e7722.
168. El-Gengaihi SE, Hamed MA, Aboubaker DH, Mossa ATH. Flavonoids from sugar beet leaves as hepatoprotective agent. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2016;8(4):281–6.
169. Lorizola IM, Furlan CPB, Portovedo M, Milanski M, Botelho PB, Bezerra RMN, et al. Beet stalks and leaves (*Beta vulgaris* L.) protect against high-fat diet-induced oxidative damage in the liver in mice. *Nutrients.* 2018;10(7).
170. Falé PL, Borges C, Madeira PJA, Ascensão L, Araújo MEM, Florêncio MH, et al. Rosmarinic acid, scutellarein 4'-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* ("falso boldo"). *Food Chem.* 2009;114(3):798–805.
171. Porfírio S, Falé PLV, Madeira PJA, Florêncio MH, Ascensão L, Serralheiro MLM. Antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of *Plectranthus barbatus* tea, after in vitro gastrointestinal metabolism. *Food Chem.* 2010;122(1):179–87.
172. Yamamoto Y, Takahashi Y, Kawano M, Iizuka M, Matsumoto T, Saeki S, et al. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *J Nutr Biochem.* 1999;10(1):13–8.
173. Oliveira AC, Valentim IB, Goulart MOF, Silva CA, Bechara EJH, Trevisan MTS. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quim Nova.* 2009;32(3):689–702.
174. Lee C-H, Hwang K-E, Kim H-W, Song D-H, Kim Y-J, Ham Y-K, et al. Antioxidant Activity of Brown Soybean Ethanol Extracts and Application to Cooked Pork Patties. *Korean J Food Sci Anim Resour.* 2016;36(3):359–68.
175. Silva R do N, Monteiro VN, Alcanfor JD, Assis EM, Asquieri ER. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Ciência e Tecnol Aliment.* 2003;23(3):337–41.
176. Katoch R, Katoch R. Carbohydrate Estimations. In: *Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology.* Springer New York; 2011. p. 67–76.
177. Xu YQ, Hu XF, Tang P, Jiang YW, Yuan HB, Du QZ, et al. The major factors influencing the formation of sediments in reconstituted green tea infusion. *Food Chem.* 2015;172:831–5.
178. Yemm EW, Willis AJ. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem J.* 1954;57(3):508–14.
179. Singh AB, Malik P, Parkash D, Gangal S V. Identification of specific IgE binding proteins in castor bean (*ricinus communis*) pollen obtained from different source materials. *Grana.* 1993;32(6):376–80.
180. Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem.* 1985;151(2):369–74.
181. Zaia DAM, Zaia CTBV, Lichtig J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Quim Nova.* 1998;21(6):787–93.
182. Teixeira J, Gaspar A, Garrido EM, Garrido J, Borges F. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *Biomed Res Int.* 2013;2013(February 2014):1–11.
183. Alves CQ, David JM, David JP, Bahia M V., Aguiar RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quim Nova.* 2010;33(10):2202–10.
184. Serralheiro MLM, Falé PL, Ferreira C, Rodrigues AM, Cleto P, Madeira PJA, et al. Antioxidant and

- anti-acetylcholinesterase activity of commercially available medicinal infusions after in vitro gastrointestinal digestion. *J Med Plants Res.* 2013;7(20):1370–8.
185. Frasco MF, Fournier D, Carvalho F, Guilhermino L. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers.* 2005;10(5):360–75.
 186. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. *Cell Viability Assays. Assay Guid Man.* 2004;(Md):1–25.
 187. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 2012;114(8):785–96.
 188. Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. Vol. 120, *Acta Histochemica.* 2018. p. 303–11.
 189. Magalhães W, Thá E, Leme D. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA da lignina contra danos ao DNA. 2018;
 190. Boeing JS, Barizão ÉO, e Silva BC, Montanher PF, de Cinque Almeida V, Visentainer J V. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: Application of principal component analysis. *Chem Cent J.* 2014;8(1).
 191. Wong SP, Leong LP, William Koh JH. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chem.* 2006;99(4):775–83.
 192. Zhu Y, Li T, Fu X, Brennan M, Abbasi AM, Zheng B, et al. The use of an enzymatic extraction procedure for the enhancement of highland barley (*Hordeum vulgare* L.) phenolic and antioxidant compounds. *Int J Food Sci Technol.* 2016;51(8):1916–24.
 193. Papillo VA, Vitaglione P, Graziani G, Gokmen V, Fogliano V. Release of antioxidant capacity from five plant foods during a multistep enzymatic digestion protocol. *J Agric Food Chem.* 2014;62(18):4119–26.
 194. Boyes S, Strübi P, Dawes H. Measurement of Protein Content in Fruit Juices, Wine and Plant Extracts in the Presence of Endogenous Organic Compounds. *LWT - Food Sci Technol.* 1997;30(8):778–85.
 195. Biondo PBF, Boeing JS, Barizão ÉO, de Souza NE, Matsushita M, de Oliveira CC, et al. Evaluation of beetroot (*Beta vulgaris* L.) leaves during its developmental stages: A chemical composition study. *Food Sci Technol.* 2014;34(1):94–101.
 196. Gligor O, Mocan A, Moldovan C, Locatelli M, Crişan G, Ferreira ICFR. Enzyme-assisted extractions of polyphenols – A comprehensive review. Vol. 88, *Trends in Food Science and Technology.* 2019. p. 302–15.
 197. Edmond Ghanem M, Han RM, Classen B, Quetin-Leclerq J, Mahy G, Ruan CJ, et al. Mucilage and polysaccharides in the halophyte plant species *Kosteletzkya virginica*: Localization and composition in relation to salt stress. *J Plant Physiol.* 2010;167(5):382–92.
 198. Cejudo-Bastante MJ, Hurtado N, Delgado A, Heredia FJ. Impact of pH and temperature on the colour and betalain content of Colombian yellow pitaya peel (*Selenicereus megalanthus*). *J Food Sci Technol.* 2016 May 1;53(5):2405–13.
 199. Faridah A, Syukri D, Holinesti R. Simple characterization of betalain compound from red pitaya (*Hylocereus Polyrhizus*) peel solution. *Int J Adv Sci Eng Inf Technol.* 2015;5(3):207–11.
 200. Silva NA Da, Rodrigues E, Mercadante AZ, De Rosso VV. Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. *J Agric Food Chem.* 2014;62(22):5072–84.
 201. Swamy GJ, Sangamithra A, Chandrasekar V. Response surface modeling and process optimization of aqueous extraction of natural pigments from *Beta vulgaris* using Box-Behnken design of experiments. *Dye Pigment.* 2014;111:64–74.
 202. Vissers A, Kiskini A, Hilgers R, Marinea M, Wierenga PA, Gruppen H, et al. Enzymatic Browning in Sugar Beet Leaves (*Beta vulgaris* L.): Influence of Caffeic Acid Derivatives, Oxidative Coupling, and Coupled Oxidation. *J Agric Food Chem.* 2017;65(24):4911–20.
 203. Arapitsas P. Identification and quantification of polyphenolic compounds from okra seeds and skins. *Food Chem.* 2008;110(4):1041–5.
 204. Wolfender JL. HPLC in natural product analysis: The detection issue. Vol. 75, *Planta Medica.* 2009. p. 719–34.

205. Farabegoli F, Scarpa ES, Frati A, Serafini G, Papi A, Spisni E, et al. Betalains increase vitexin-2-O-xyloside cytotoxicity in CaCo-2 cancer cells. *Food Chem.* 2017;218:356–64.
206. Ali F, Rahul, Naz F, Jyoti S, Siddique YH. Health functionality of apigenin: A review. *Int J Food Prop.* 2017;20(6):1197–238.
207. Choi JS, Nurul Islam M, Yousof Ali M, Kim EJ, Kim YM, Jung HA. Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. *Food Chem Toxicol.* 2014;64:27–33.
208. Goldberg I, Rokem JS, Pines O. Organic acids: Old metabolites, new themes. Vol. 81, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 2006. p. 1601–11.
209. Gąsecka M, Magdziak Z, Siwulski M, Mleczek M. Profile of phenolic and organic acids, antioxidant properties and ergosterol content in cultivated and wild growing species of *Agaricus*. *Eur Food Res Technol.* 2018;244(2):259–68.
210. Anggraini T, Kurniawan Y, Yenrina R, Sayuti K. Effect of 'Jamblang' (*Syzygium cumini*) peel and citric acid addition on antioxidant activity of 'Kolang-Kaling' Jam. *Pakistan J Nutr.* 2018;17(3):140–5.
211. Scherer R, Rybka ACP, Godoy HT. Determinação simultânea dos ácidos orgânicos tartárico, málico, ascórbico e cítrico em polpas de acerola, açaí e caju e avaliação da estabilidade em sucos de caju. *Quim Nova.* 2008;31(5):1137–40.
212. Slimen IB, Najar T, Abderrabba M. Chemical and antioxidant properties of betalains. Vol. 65, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2017. p. 675–89.
213. Pei K, Ou J, Huang J, Ou S. p-Coumaric acid and its conjugates: Dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *J Sci Food Agric.* 2016 Jul 1;96(9):2952–62.
214. Silva E, Batista de Oliveira R. Ferulic Acid and Naturally Occurring Compounds Bearing a Feruloyl Moiety: A Review on Their Structures, Occurrence, and Potential Health Benefits. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2017;16(4):580–616.
215. Gullón B, Lú-Chau TA, Moreira MT, Lema JM, Eibes G. Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends Food Sci Technol.* 2017;67:220–35.
216. Ninfali P, Antonini E, Frati A, Scarpa ES. C-Glycosyl Flavonoids from *Beta vulgaris* *Cicla* and Betalains from *Beta vulgaris* *rubra*: Antioxidant, Anticancer and Antiinflammatory Activities—A Review. Vol. 31, *Phytotherapy Research.* John Wiley and Sons Ltd; 2017. p. 871–84.
217. Moscato S, Ronca F, Campani D, Danti S. Poly(vinyl alcohol)/gelatin Hydrogels Cultured with HepG2 Cells as a 3D Model of Hepatocellular Carcinoma: A Morphological Study. *J Funct Biomater.* 2015;6(1):16–32.
218. Mueller D, Koetemann A, Noor F. Organotypic Cultures of Hepg2 Cells for In Vitro Toxicity Studies. *J Bioeng Biomed Sci.* 2011;01(S2).
219. Oonsivilai R, Mario GF, Ningsanond S. Antioxidant activity and Cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) Extracts. *Asian J Food Agro-Industry.* 2008;1(02):116–128.
220. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1–2):55–63.
221. Lee EJ, An D, Nguyen CTT, Patil BS, Kim J, Yoo KS. Betalain and betaine composition of greenhouse- or field-produced beetroot (*Beta vulgaris* L.) and inhibition of HepG2 cell proliferation. *J Agric Food Chem.* 2014;62(6):1324–31.
222. Zhu Z, Li S, He J, Thirumdas R, Montesano D, Barba FJ. Enzyme-assisted extraction of polyphenol from edible lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome knot: Ultra-filtration performance and HPLC-MS2 profile. *Food Res Int.* 2018;111:291–8.
223. Ninfali P, Bacchiocca M, Antonelli A, Biagiotti E, Di Gioacchino AM, Piccoli G, et al. Characterization and biological activity of the main flavonoids from Swiss Chard (*Beta vulgaris* *subspecies cycila*). *Phytomedicine.* 2007;14(2–3):216–21.

Capítulo 7: Anexos

Anexo 1. Quantificação dos CBs presentes nas folhas e talos da beterraba (*Beta vulgaris* L.)

Anexo 1.1. Reta de calibração dos FT

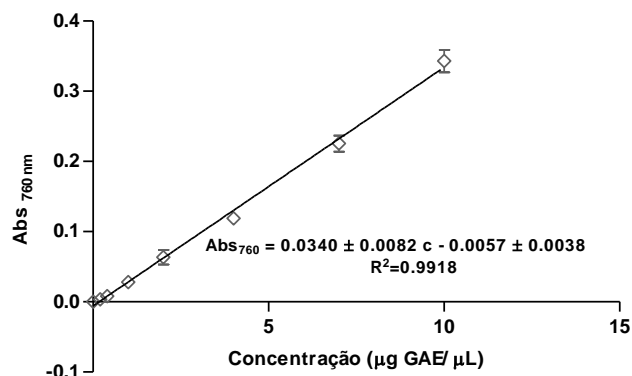


Figura 6.1. Curva de calibração para a quantificação dos FT. utilizando o ácido gálico (GAE) como padrão.

Anexo 1.2. Reta de calibração dos hidratos de carbono

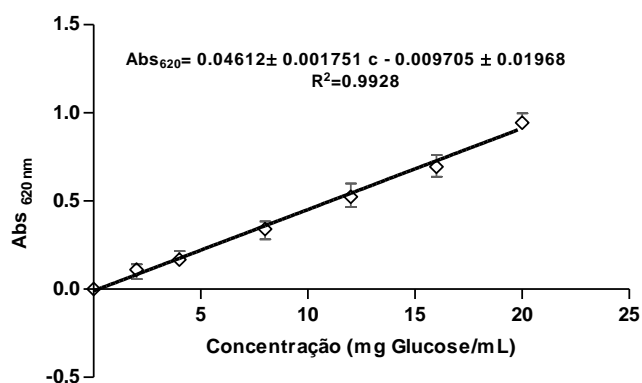


Figura 6.2. Curva de calibração para a quantificação dos hidratos de carbono. utilizando a glucose como padrão.

Anexo 1.3. Reta de calibração das proteínas

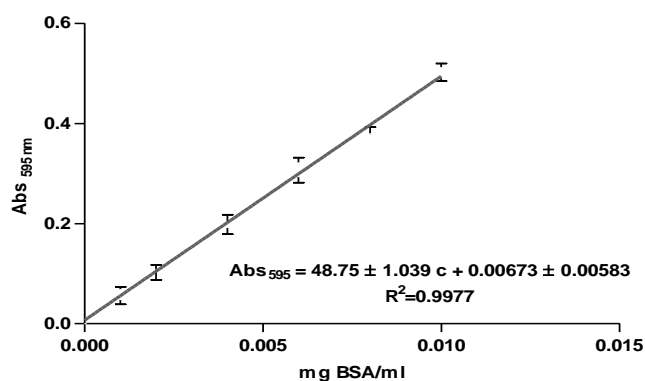


Figura 6.3. Reta de calibração para o doseamento das proteínas. utilizando como padrão a BSA.

Anexo 2. Cromatografia líquida de elevada performance (HPLC-DAD) dos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba

Anexo 2.1. Cromatogramas dos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba e da solução de pepsina (SG), solução de pancreatina (SP) e solução de pepsina e pancreatina (SC)

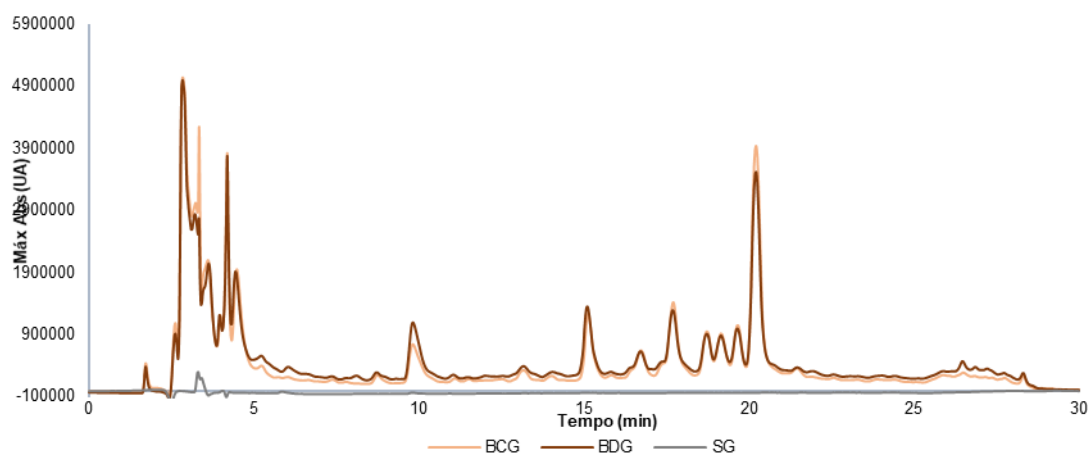


Figura 6.4. Cromatograma sobrepostos dos extratos BCG, BDG e SG.

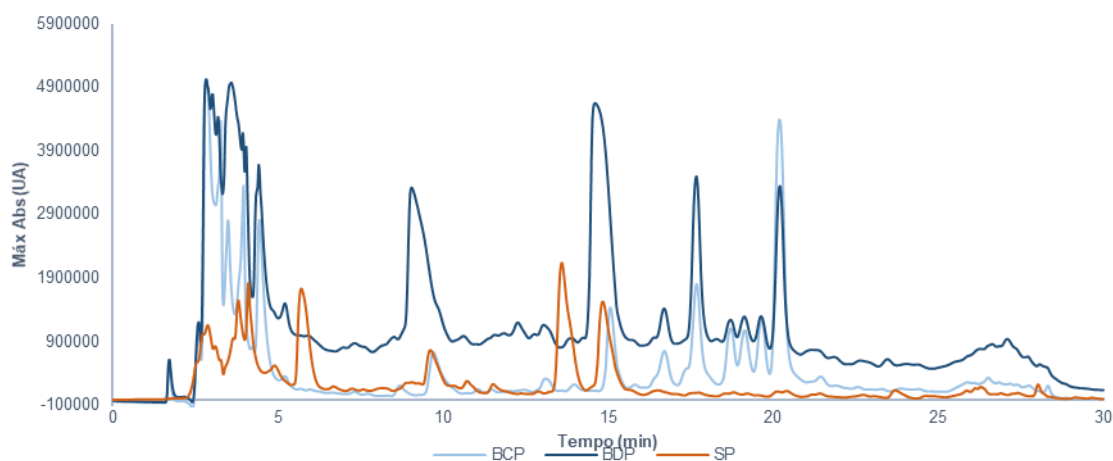


Figura 6.5. Cromatograma sobrepostos dos extratos BCP, BDP e SP.

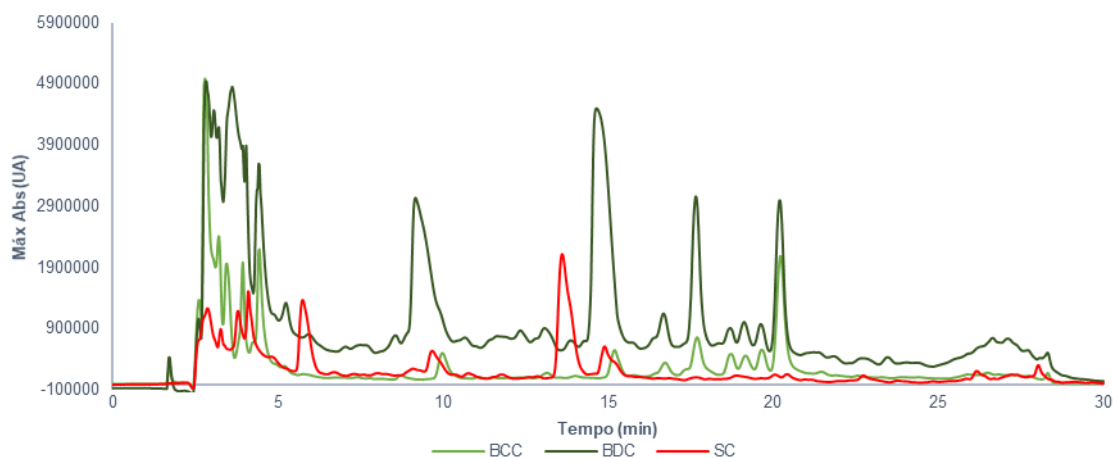


Figura 6.6. Cromatograma sobrepostos dos extratos BCC, BDC e SC.

Anexo 2.2. UV-Vis dos compostos maioritários presentes nos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba.

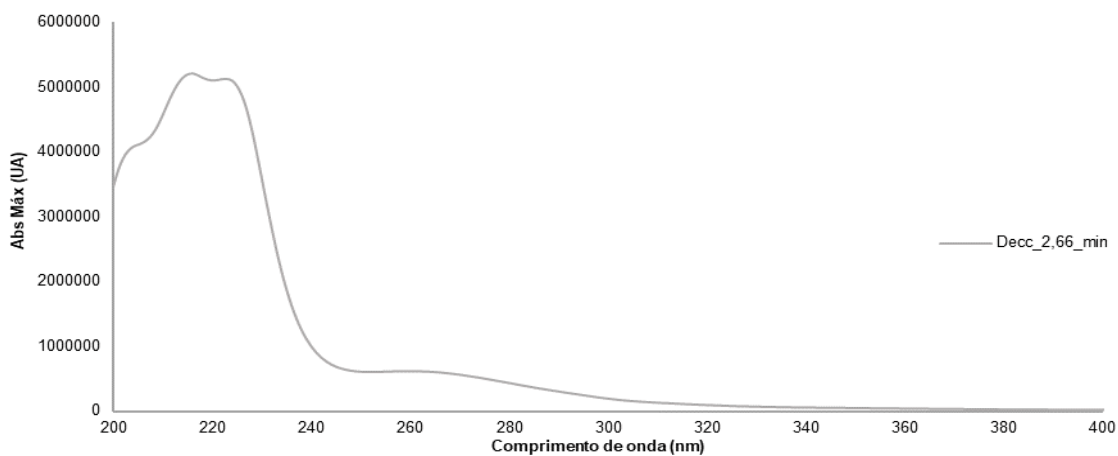


Figura 6.7. UV-Vis referente ao pico do composto 1 presentes nos extratos aquosos.

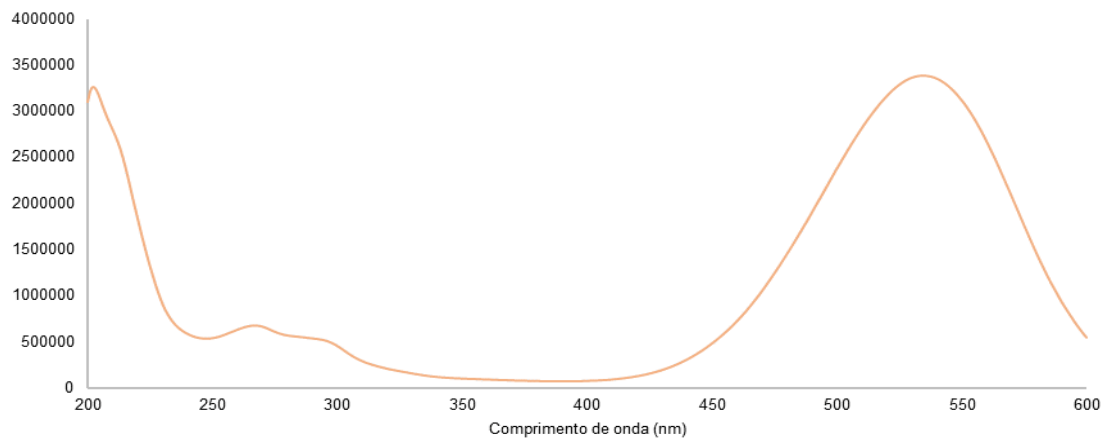


Figura 6.8. UV-Vis referente ao pico do composto 2 presentes no extrato BCG.

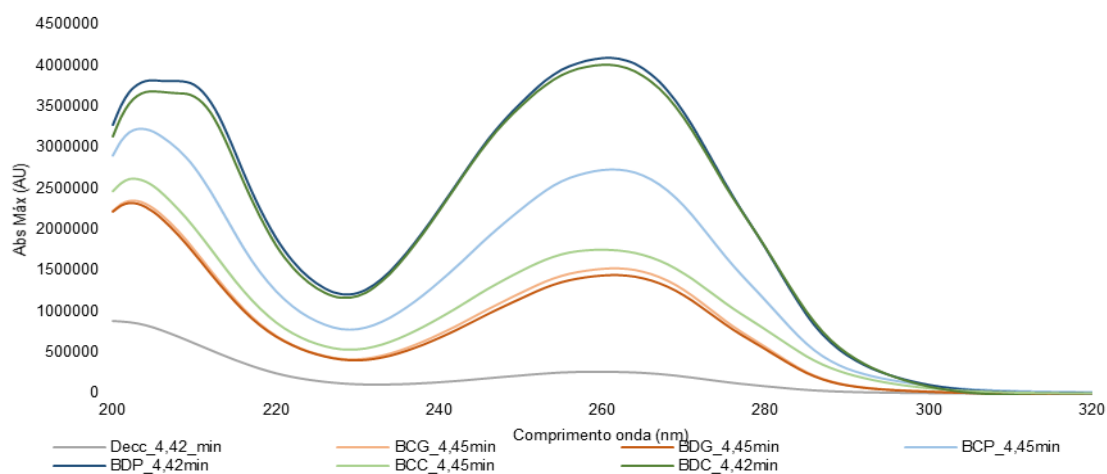


Figura 6.9. UV-Vis referente ao pico do composto 3 presentes nos extratos aquosos.

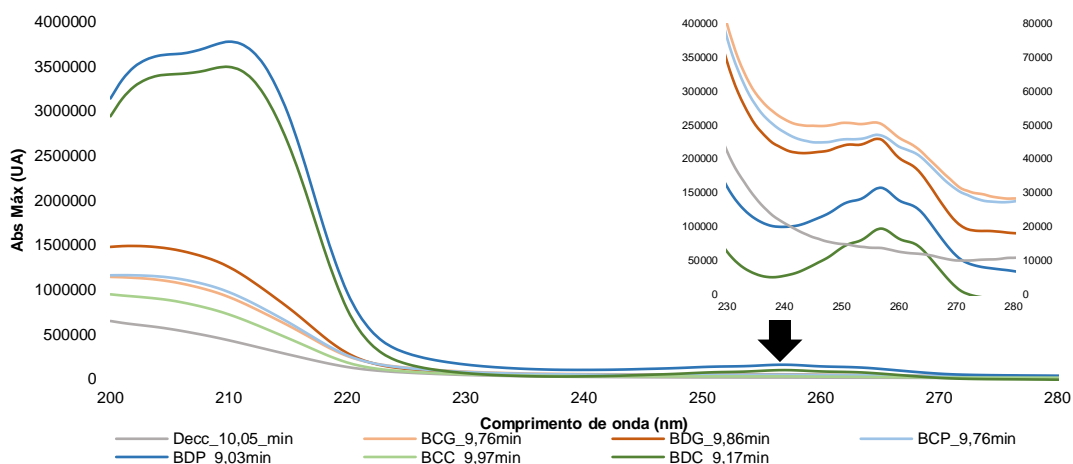


Figura 6.10. UV-Vis referente ao pico do composto 4 presentes nos extratos aquosos, com ampliação do comprimento de onda entre os 230 nm e 280 nm.

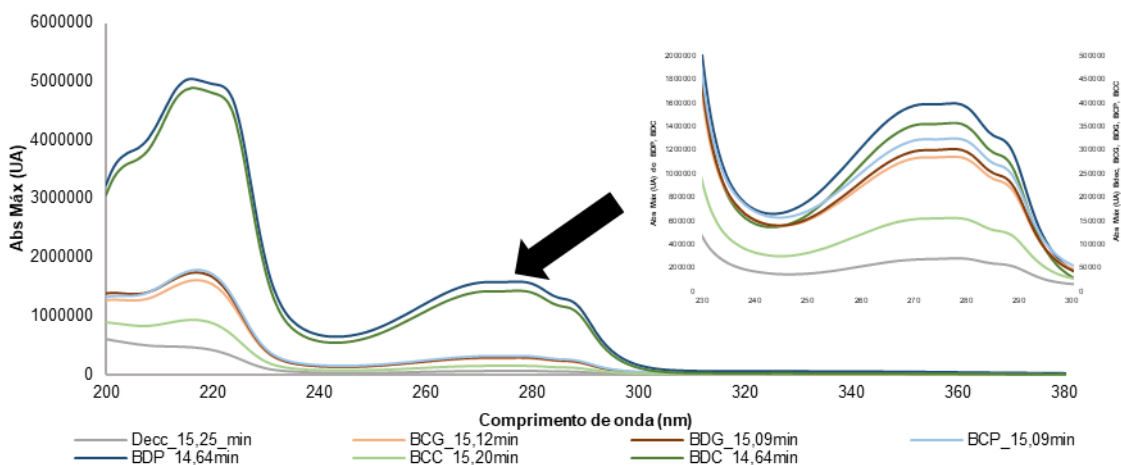


Figura 6.11. UV-Vis referente ao pico do composto 5 presentes nos extratos aquosos, com ampliação do comprimento de onda entre os 250 nm e 300 nm.

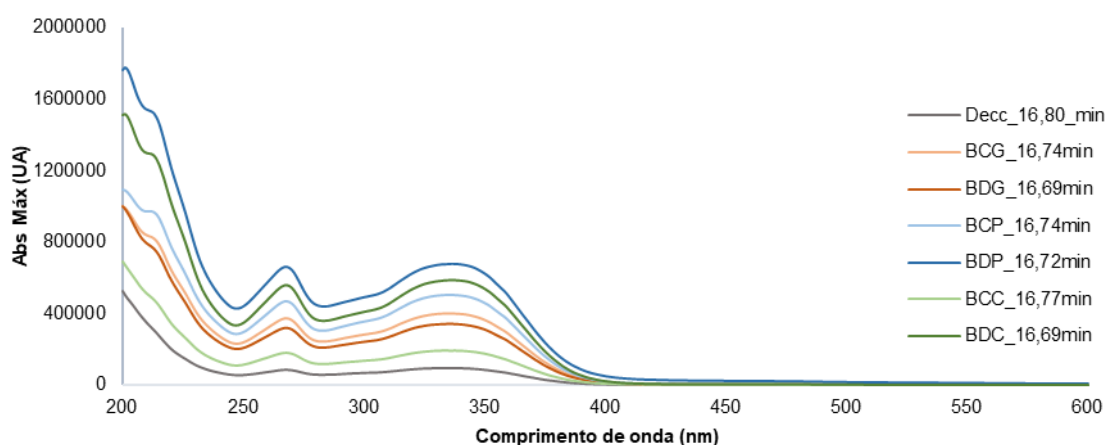


Figura 6.12. UV-Vis referente ao pico do composto 6 presentes nos extratos aquosos.

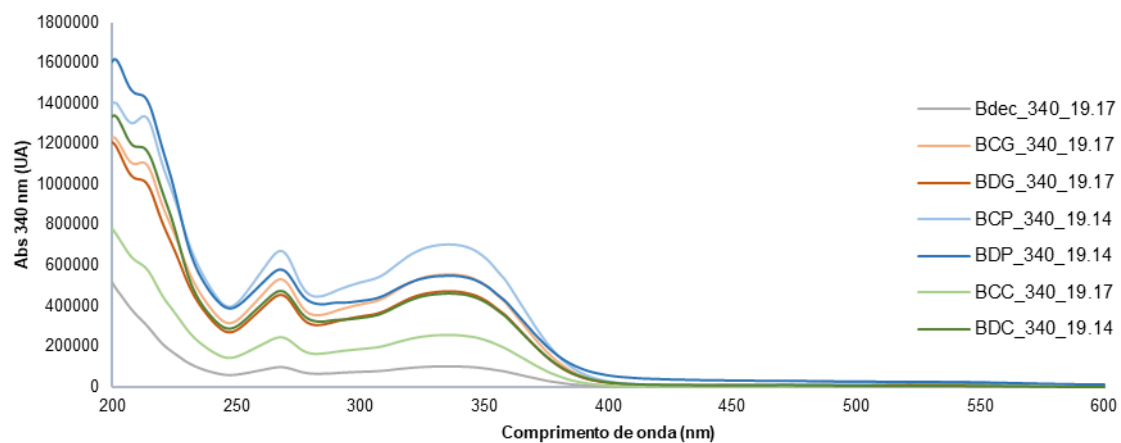


Figura 6.13. UV-Vis referente ao pico do composto 9 presentes nos extratos aquosos.

Anexo 2.3. Cromatogramas dos extratos aquosos das folhas e talos da beterraba e dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico

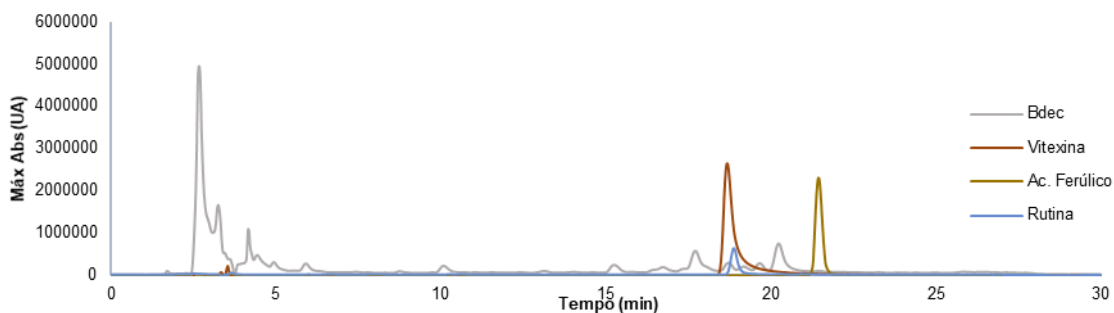


Figura 6.14. Cromatograma do extrato Bdec sobreposto com os cromatogramas dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico.

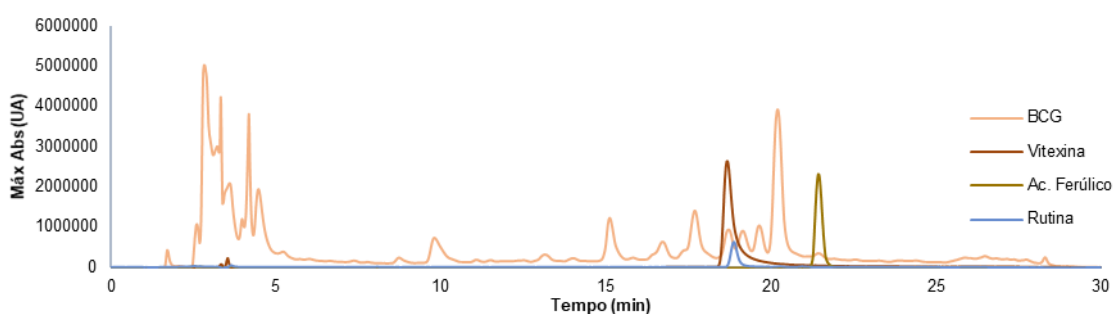


Figura 6.15. Cromatograma do extrato BCG sobreposto com os cromatogramas dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico.

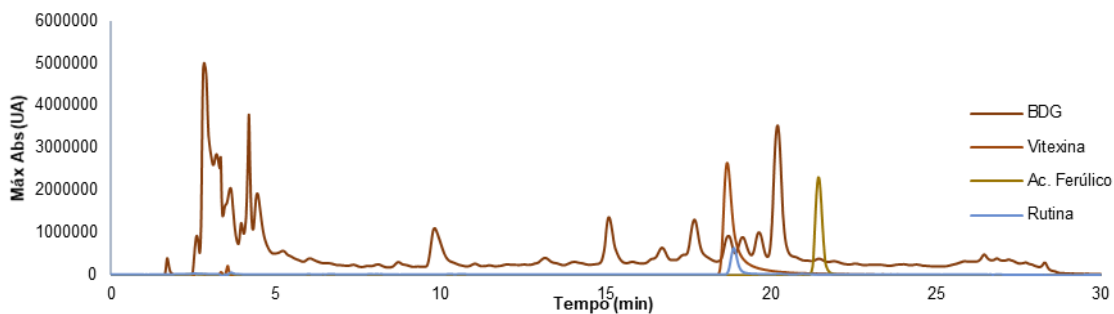


Figura 6.16. Cromatograma do extrato BDG sobreposto com os cromatogramas dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico.

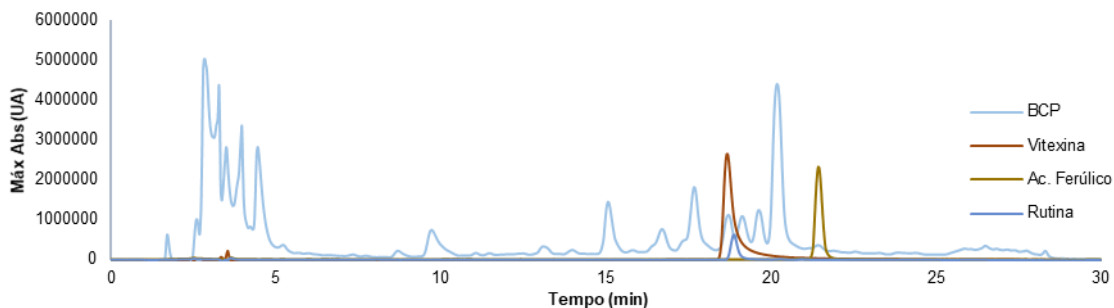


Figura 6.17. Cromatograma do extrato BCP sobreposto com os cromatogramas dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico.

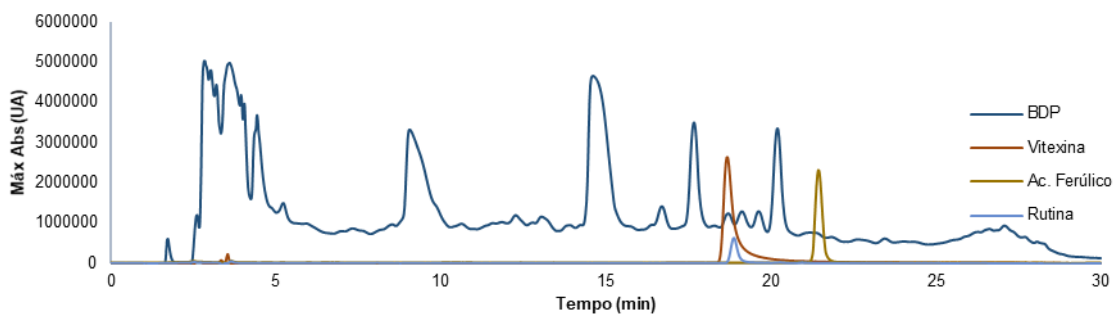


Figura 6.18. Cromatograma do extrato BDP sobreposto com os cromatogramas dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico.

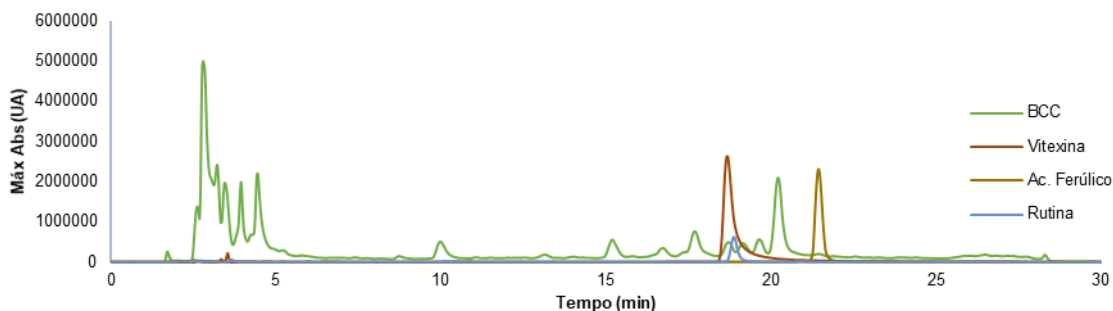


Figura 6.19. Cromatograma do extrato BCC sobreposto com os cromatogramas dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico.

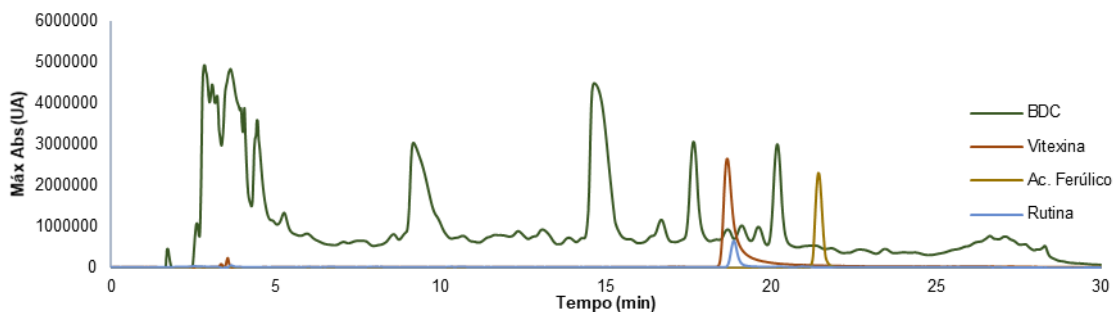


Figura 6.20. Cromatograma do extrato BDC sobreposto com os cromatogramas dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico.

Anexo 3. Valores registados experimentalmente e determinação do fluxo de permeação a 25°C (Jp)

Tabela 6.1. Valores registados experimentalmente para a massa de água recolhida, o tempo do ensaio, a temperatura da água, e determinação dos caudais mássicos (Q), do fluxo de permeação (Jp) e do fluxo a 25 °C para as membranas AC20, AC22; AC25, AC28 e AC35.

Membrana	ΔP (bar)	m (g)	Tempo (h)	Q (kg/h)	Jp (kg/h/m ²)	T (°C)	Jp 25°C (kg/h/m ²)
AC20	1	1.71	0.033	0.0513	1.735	17	2.095
	1.5	1.69	0.025	0.0676	2.286	17	2.762
	2	2.24	0.025	0.0896	3.030	17	3.660
	2.5	1.97	0.0167	0.1182	3.998	17.5	4.770
	3	2.36	0.0167	0.1416	4.789	18	5.646
AC22	1	2	0.033	0.06	2.029	15	2.574
	1.5	2.15	0.025	0.086	2.909	15	3.689
	2	2.97	0.025	0.1188	4.018	14.5	5.160
	2.5	2.39	0.0167	0.1434	4.850	15	6.152
	3	2.88	0.0167	0.1728	5.844	15	7.413
AC25	1	8.74	0.033	0.2622	8.868	14	11.529
	1.5	9.37	0.025	0.3748	12.676	15	16.078
	2	12.22	0.025	0.4888	16.531	14	21.493
	2.5	10.68	0.0167	0.6408	21.672	15	27.489
	3	12.24	0.0167	0.7344	24.838	14.5	31.895
AC28	1	19.74	0.033	0.5922	20.028	16	24.789
	1.5	22.37	0.025	0.8948	30.262	16	37.456
	2	27.9	0.025	1.116	37.743	17	45.590
	2.5	24.98	0.0167	1.4988	50.690	17	61.228
	3	29.26	0.0167	1.7556	59.375	18	70.005
AC35	1	45.03	0.033	1.3509	45.688	17	55.186
	1.5	51.23	0.025	2.0492	69.305	16	85.778
	2	45.72	0.0167	2.7432	92.776	16.5	113.435
	2.5	59.36	0.0167	3.5616	120.455	17	145.497
	3	68.69	0.0167	4.1214	139.3872	17	168.360

Anexo 4. Determinação do limite de exclusão molecular (MWCO)

Anexo 4.1. Retas de calibração dos solutos orgânicos

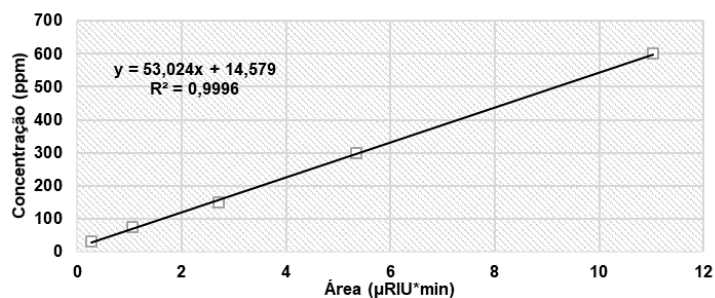


Figura 6.21. Representação da área do pico do detector HPLC-IR vs concentração do PEG 1500 g/mol.

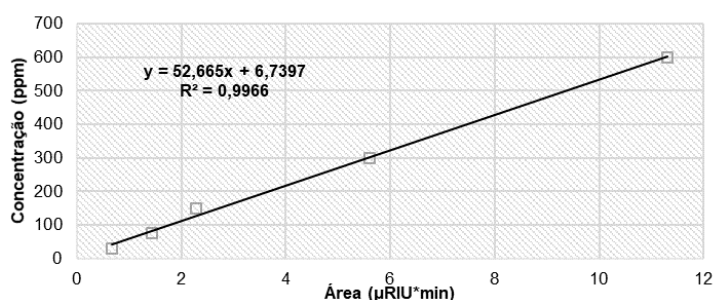


Figura 6.22. Representação da área do pico do detector HPLC-IR vs concentração do PEG 3000 g/mol.

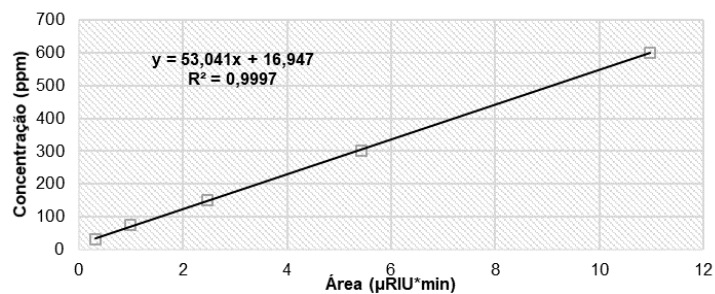


Figura 6.23. Representação da área do pico do detector HPLC-IR vs concentração do PEG 6000 g/mol.

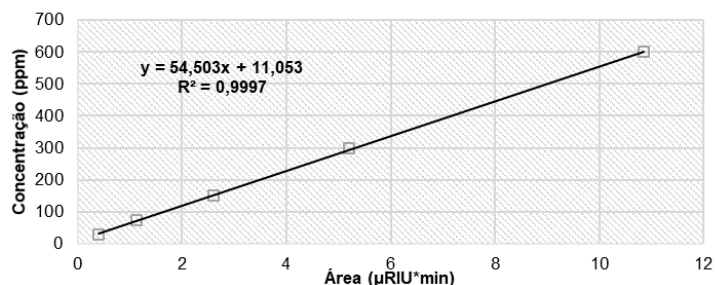


Figura 6.24. Representação da área do pico do detector HPLC-IR vs concentração do PEG 10000 g/mol.

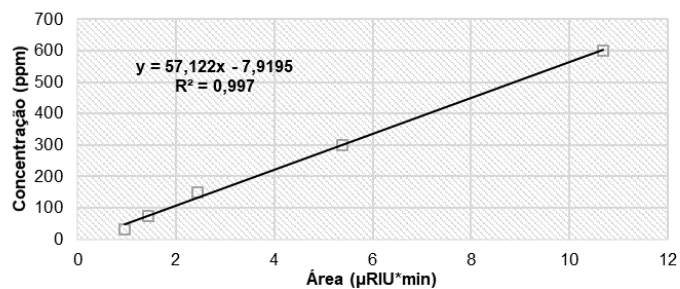


Figura 6.25. Representação da área do pico do detetor HPLC-IR vs concentração do PEG 20000 g/mol.

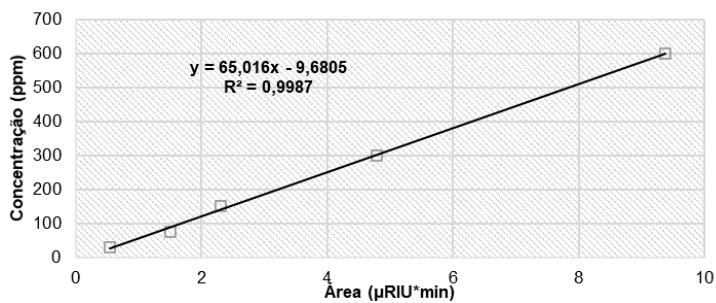


Figura 6.26. Representação da área do pico do detetor HPLC-IR vs concentração do DEX 40000 g/mol.

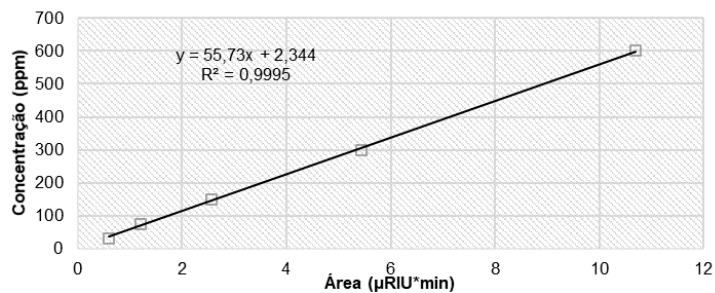


Figura 6.27. Representação da área do pico do detetor HPLC-IR vs concentração do DEX 70000 g/mol.

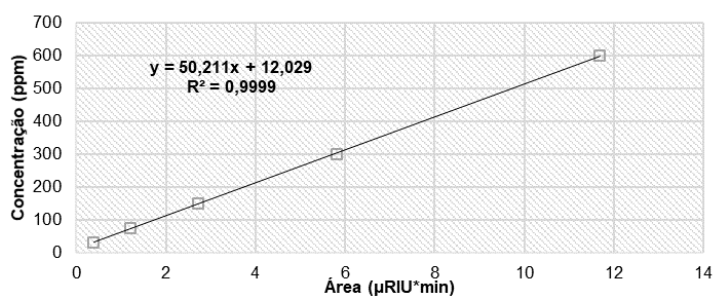


Figura 6.28. Representação da área do pico do detetor HPLC-IR vs concentração do DEX 100000 g/mol.

Anexo 4.2. Valores experimentais para a determinação do limite de exclusão molecular (MWCO)

Tabela 6.2. Valores experimentais de massa soluto, tempo de ensaio e temperatura, caudal mássico (Q), fluxo de permeação (Jp), fluxo a 25 °C para as membranas AC20, AC22; AC25, AC28 e AC35.

Membrana	Amostra	ΔP (bar)	m (g)	Tempo (h)	Q (kg/h)	Jp (kg/h/m ²)	T (°C)	Jp 25°C (kg/h/m ²)
AC20	PEG 1500	1	3.52	0.083	0.042	1.429	20	1.606
	PEG 3000	1	3.56	0.083	0.043	1.445	18	1.703
	PEG 6000	1	5.1	0.083	0.061	2.070	27	1.977
AC22	PEG 1500	1	6.29	0.083	0.075	2.553	21	2.802
	PEG 3000	1	6.6	0.083	0.079	2.679	21	2.940
	PEG 6000	1	6.44	0.092	0.070	2.376	24	2.431
AC25	PEG 3000	1	19.17	0.083	0.230	7.780	17	9.397
	PEG 6000	1	18.86	0.083	0.226	7.654	16	9.474
	PEG 10000	1	19.13	0.083	0.230	7.764	15	9.848
AC28	DEX 40000	1	46.38	0.083	0.557	18.823	19	21.666
	DEX 70000	1	46.08	0.083	0.553	18.701	19	21.526
	DEX 1000000	1	45.97	0.084	0.550	18.595	19	21.403
AC35	DEX 20000	1	76.69	0.050	1.534	51.874	20	58.300
	DEX 40000	1	70.19	0.050	1.404	47.477	20	53.359
	DEX 70000	1	70.07	0.050	1.401	47.396	20	53.267

Anexo 4.3. Valores experimentais relativos aos coeficientes de rejeição aparente aos solutos orgânicos obtidos relativos às áreas dos picos das alimentações e permeados e as suas respetivas concentrações.

Tabela 6.3. Áreas dos picos obtidos através do HPLC-IR e concentração obtida com a utilização das respetivas retas de calibrações dos padrões.

Membrana	Amostra PEG (Da)	Área média alim (μRIU*min)	Área média perm (μRIU*min)	Concentração Alimentação (ppm)	Concentração Permeado (ppm)	f	log (f/(1-f))
AC20	1500	11.511	3.716	612.988	202.445	66.97%	0.307
	3000	10.291	2.484	562.803	148.698	73.58%	0.445
	6000	11.103	0.233	616.219	23.771	96.14%	1.397
AC22	1500	8.716	2.708	476.757	158.168	66.82%	0.304
	3000	10.243	0.989	546.174	58.812	89.23%	0.918
	6000	11.347	0.003	618.801	17.122	97.23%	1.546
AC25	3000	11.729	4.505	624.463	243.993	61.59%	0.205
	6000	11.058	2.785	603.450	164.656	74.82%	0.473
	10000	10.647	0.530	591.361	39.936	95.02%	1.281
AC28	40000	10.928	0.747	700.832	38.856	93.17%	1.135
	70000	10.803	0.137	604.417	9.994	98.73%	1.890
	100000	11.314	0.048	580.101	14.417	99.58%	2.375
AC35	20000	10.429	6.877	587.800	384.926	34.06%	-0.287
	40000	10.696	1.355	685.740	78.423	87.33%	0.838
	70000	10.503	0.792	587.648	46.504	92.46%	1.088

Anexo 4.4. Determinação do limite de exclusão molecular (MWCO)

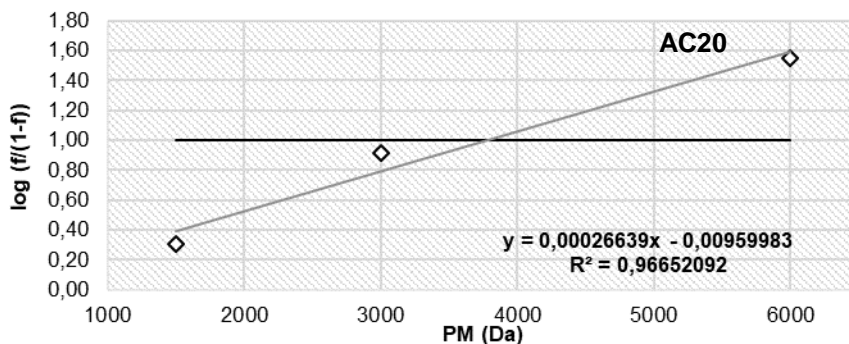


Figura 6.29. Representação gráfica do MWCO para a membrana AC20

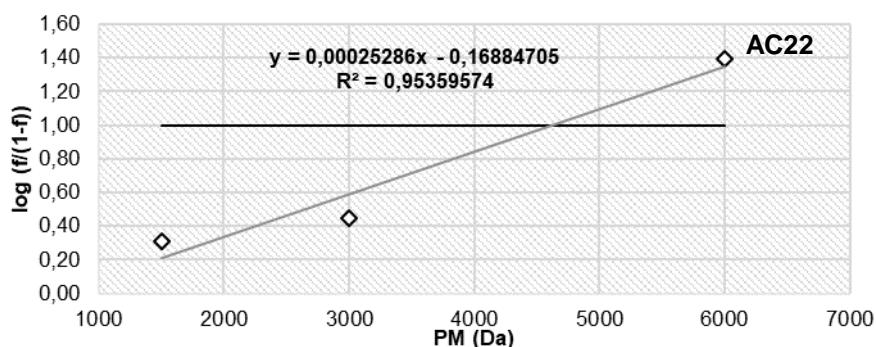


Figura 6.30. Representação gráfica do MWCO para a membrana AC22

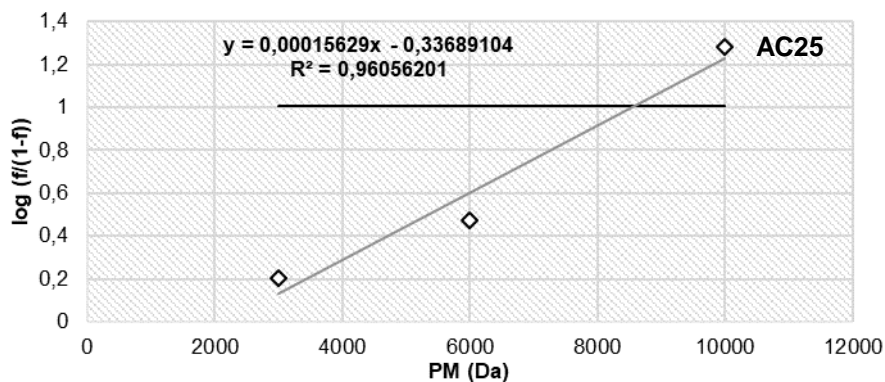


Figura 6.31. Representação gráfica do MWCO para a membrana AC25.

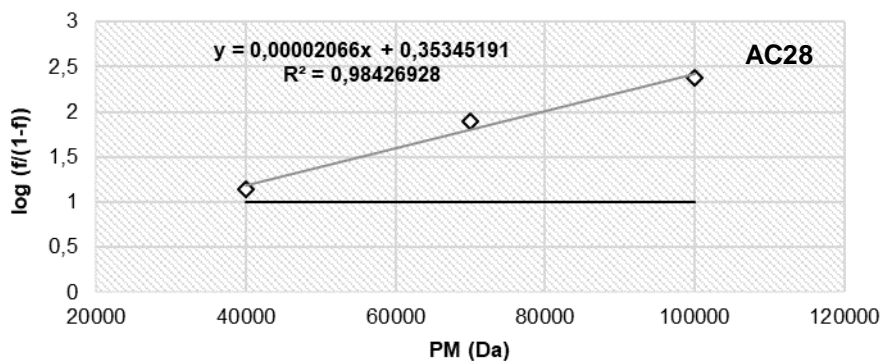


Figura 6.32. Representação gráfica do MWCO para a membrana AC28.

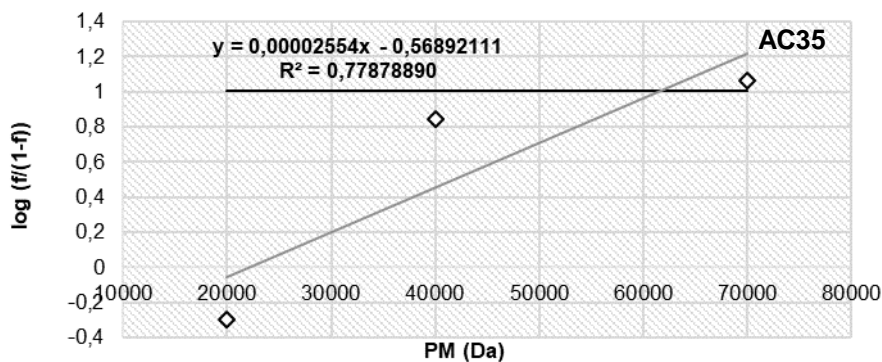


Figura 6.33. Representação gráfica do MWCO para a membrana AC35.

Anexo 5. Dados experimentais dos ensaios da permeação do extrato BDP

Tabela 6.4. Dados experimentais dos ensaios de fracionamento do extrato BDP utilizando as membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35, às PTMs 1, 2 e 3 bar, para a massa de permeado recolhido, tempo de recolha, temperatura, e a correspondente determinação de caudal mássico (Q) e fluxo de permeação (Jp).

Fração (10 mg/mL)	ΔP (bar)	m (g)	Tempo (h)	Q (kg/h)	Jp (kg/h.m ²)	T (°C)
AC20_1	1	10.98	0.667	0.016	0.557	16.0
AC20_2	2	6.77	0.183	0.037	1.249	16.0
AC20_3	3	15.47	0.250	0.062	2.093	17.0
AC22_1	1	11.28	0.333	0.034	1.144	17.0
AC22_2	2	5.80	0.083	0.070	2.354	16.0
AC22_3	3	16.39	0.168	0.098	3.298	16.0
AC25_1	1	32.84	0.167	0.197	6.664	15.0
AC25_2	2	27.17	0.067	0.408	13.783	15.0
AC25_3	3	37.23	0.067	0.558	18.887	15.0
AC28_1	1	37.97	0.083	0.456	15.410	15.0
AC28_2	2	26.18	0.033	0.785	26.563	16.0
AC28_3	3	41.02	0.042	0.984	33.295	17.0
AC35_1	1	45.17	0.050	0.903	30.553	17.0
AC35_2	2	29.61	0.025	1.184	40.057	18.0
AC35_3	3	44.23	0.033	1.327	44.876	19.0

Anexo 6. Cromatografia líquida de elevada performance (HPLC-DAD) das frações resultantes das permeações AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação

Anexo 6.1. Cromatogramas das frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.

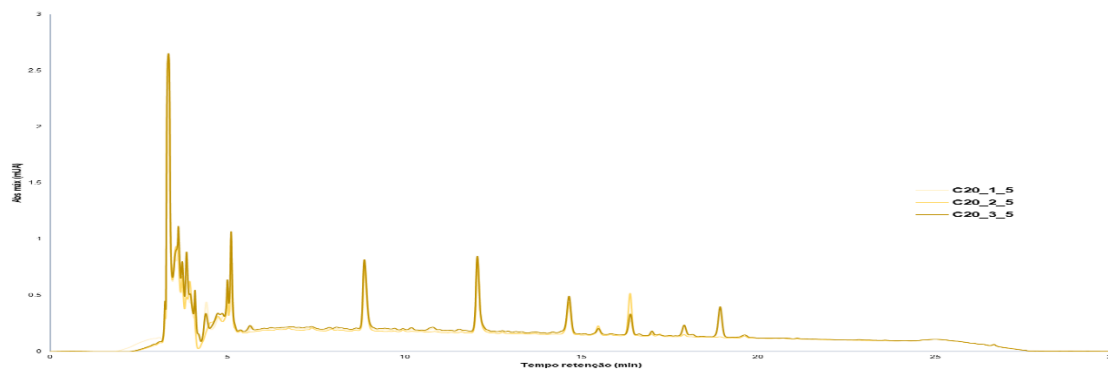


Figura 6.34. Cromatograma sobrepostos das frações AC20_1, AC20_2 e AC20_3 na concentração de 5 mg/mL.

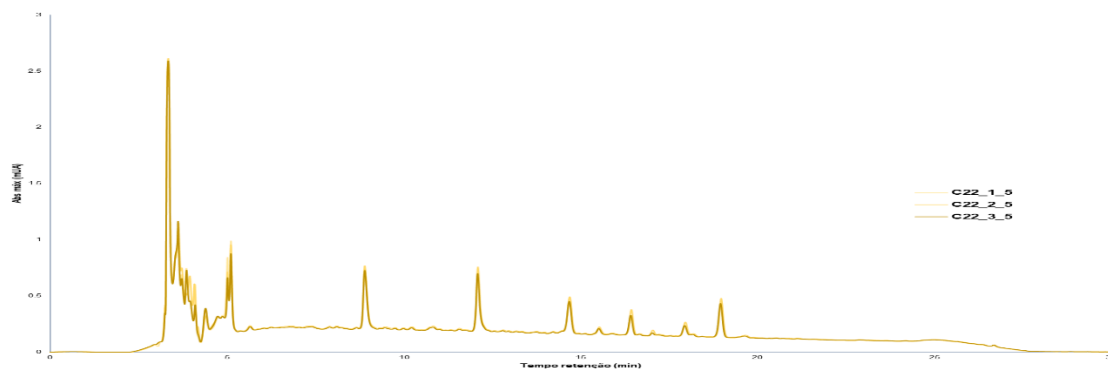


Figura 6.35. Cromatograma sobrepostos das frações AC22_1, AC22_2 e AC22_3 na concentração de 5 mg/mL.

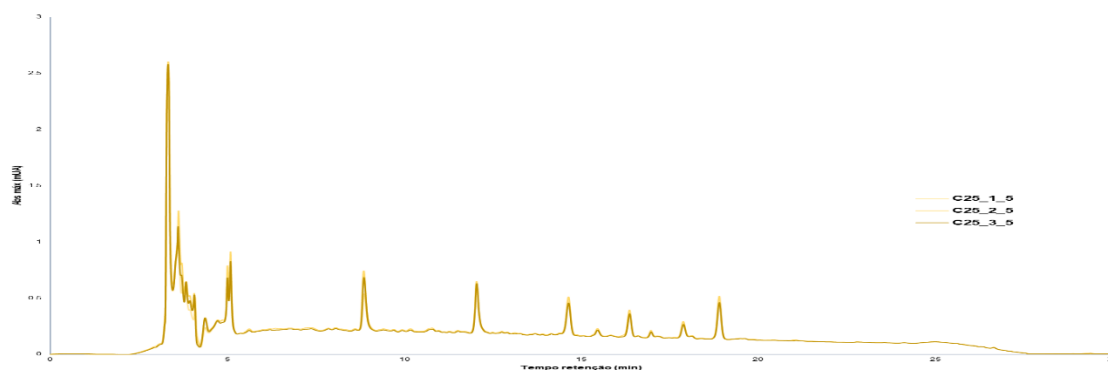


Figura 6.36. Cromatograma sobrepostos das frações AC25_1, AC25_2 e AC25_3 na concentração de 5 mg/mL.

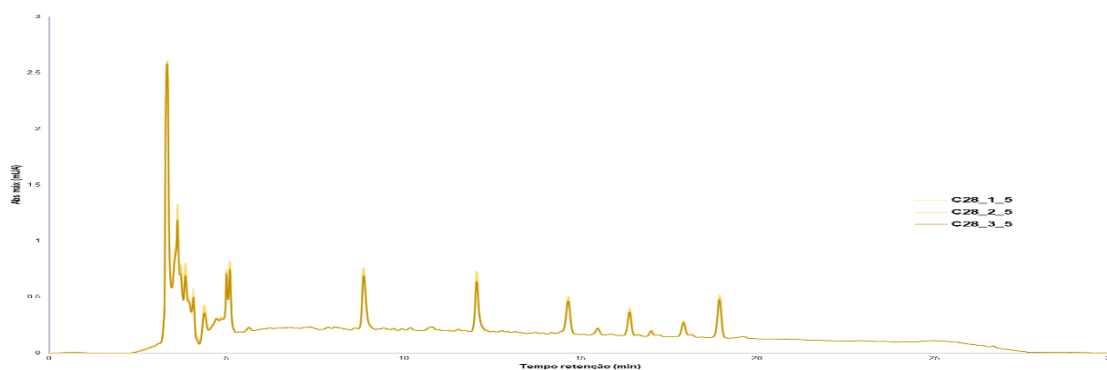


Figura 6.37. Cromatograma sobrepostos das frações AC28_1, AC28_2 e AC28_3 na concentração de 5 mg/mL.

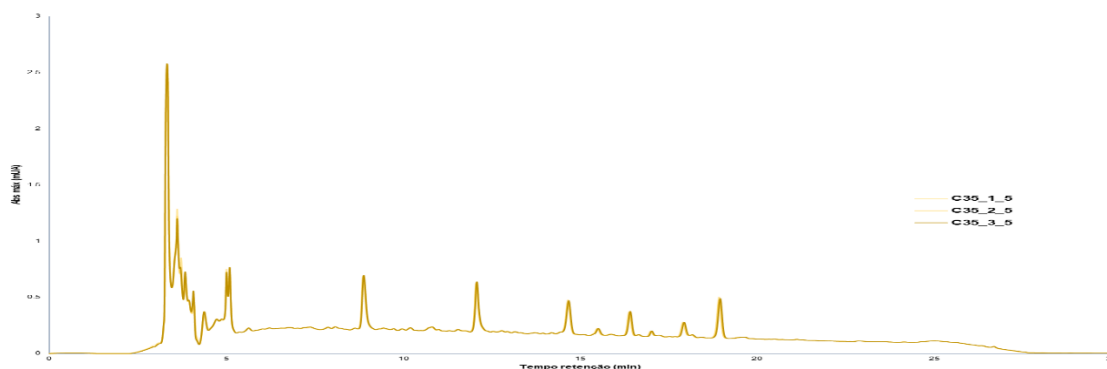


Figura 6.38. Cromatograma sobrepostos das frações AC35_1, AC35_2 e AC35_3 na concentração de 5 mg/mL.

Anexo 6.2. UV-Vis dos compostos identificados nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação

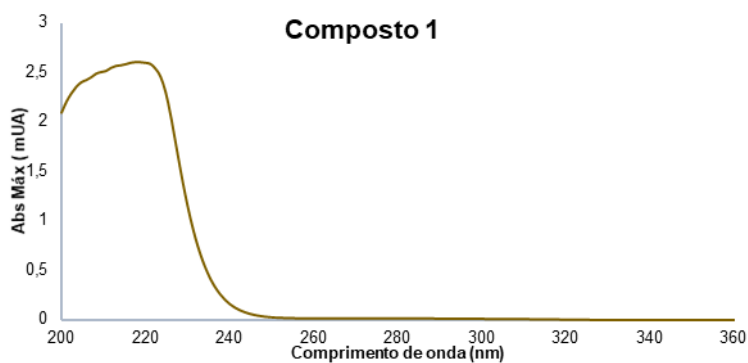


Figura 6.39. UV-Vis referente ao pico do composto 1 presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL.

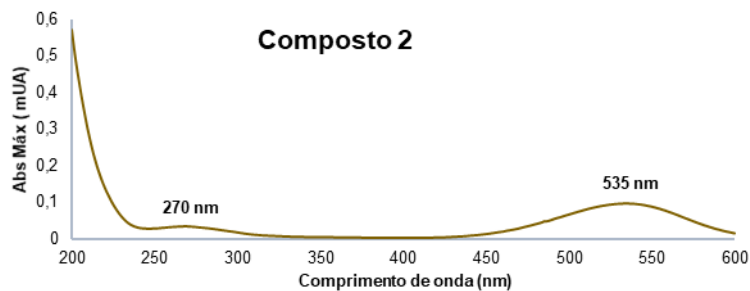


Figura 6.40. UV-Vis referente ao pico do composto 2 presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL.

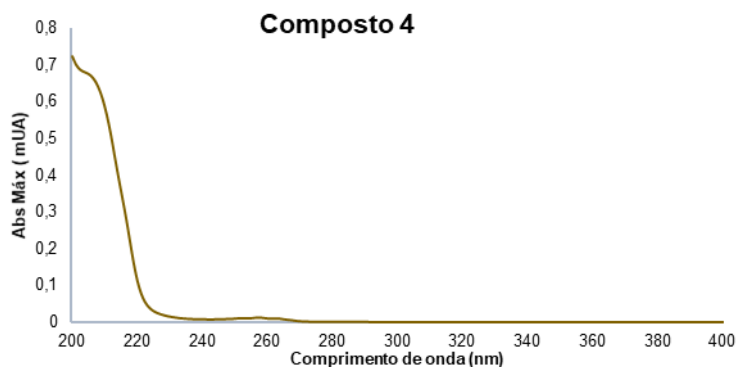


Figura 6.41. UV-Vis referente ao pico do composto 4 presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação, com ampliação do comprimento de onda 240 nm a 280 nm à concentração de 5 mg/mL.

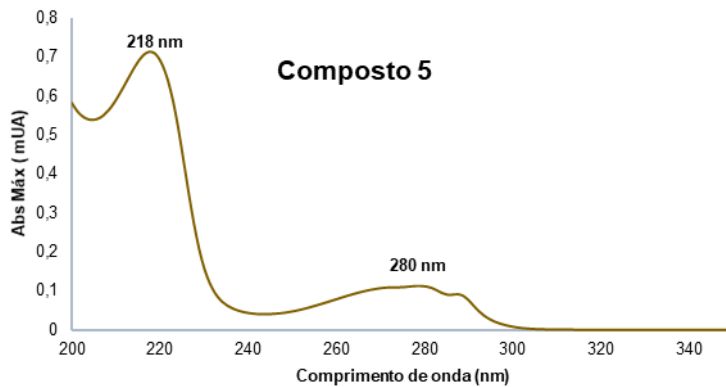


Figura 6.42. UV-Vis referente ao pico do composto 5 presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra alimentação à concentração de 5 mg/mL.

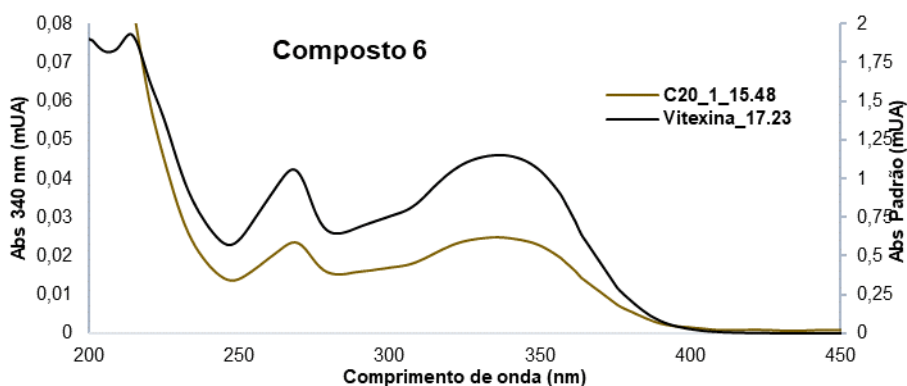


Figura 6.43. UV-Vis referente ao pico do composto 6 presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL e o padrão vitexina a 1mg/mL.

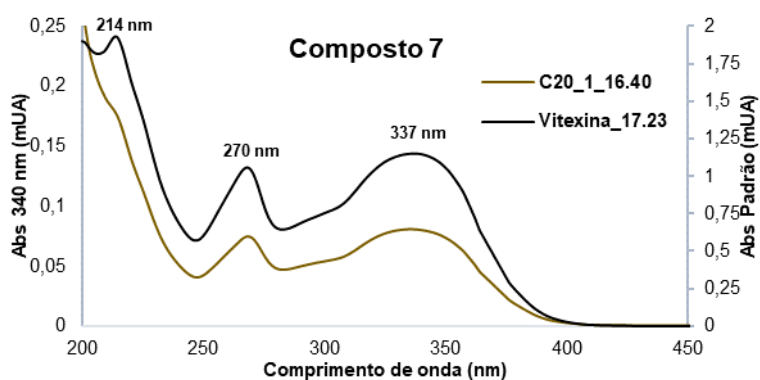


Figura 6.44. UV-Vis referente ao pico do composto 7 presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL e o padrão vitexina à concentração de 1 mg/mL.

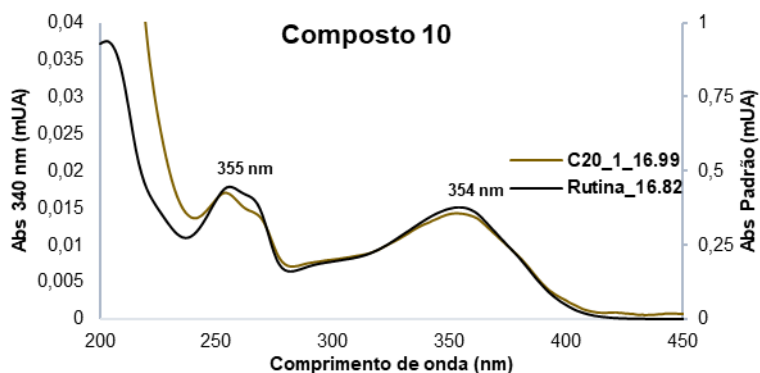


Figura 6.45. UV-Vis referente ao pico do composto 10 presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL e o padrão rutina à concentração de 1 mg/mL.

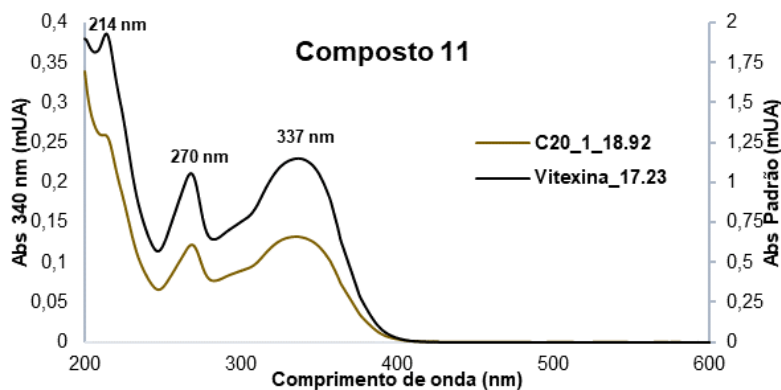


Figura 6.46. UV-Vis referente ao pico do composto 11 presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL e o padrão vitexina à concentração de 1 mg/mL.

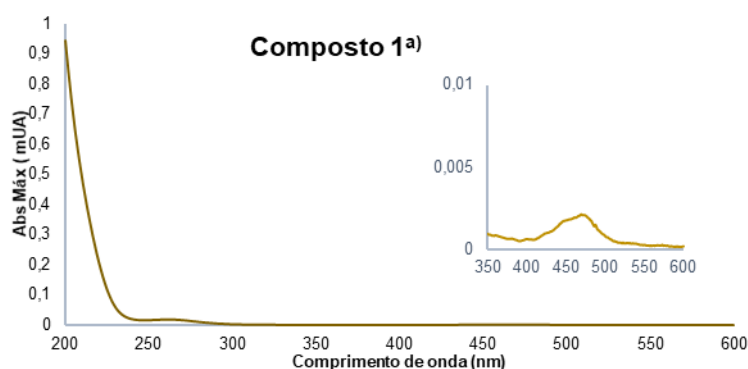


Figura 6.47. UV-Vis referente ao pico do composto 1^a) presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL.

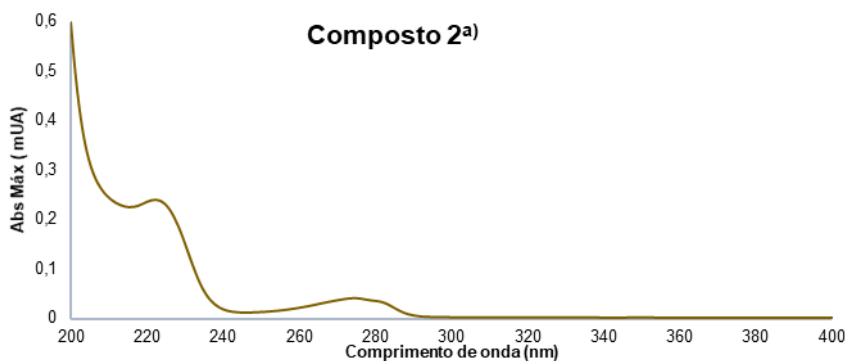


Figura 6.48. UV-Vis referente ao pico do composto 2^a) presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL.

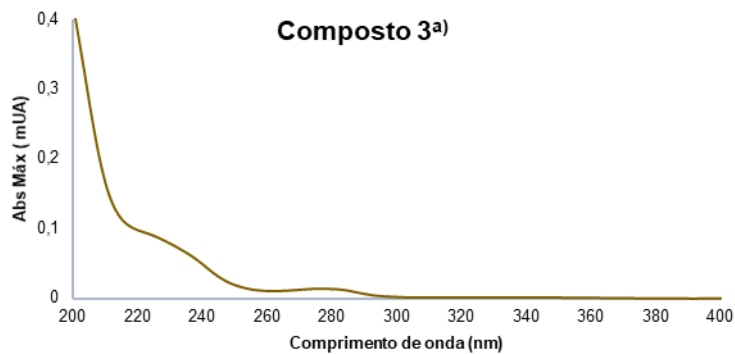


Figura 6.49. UV-Vis referente ao pico do composto 3^a) presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL.

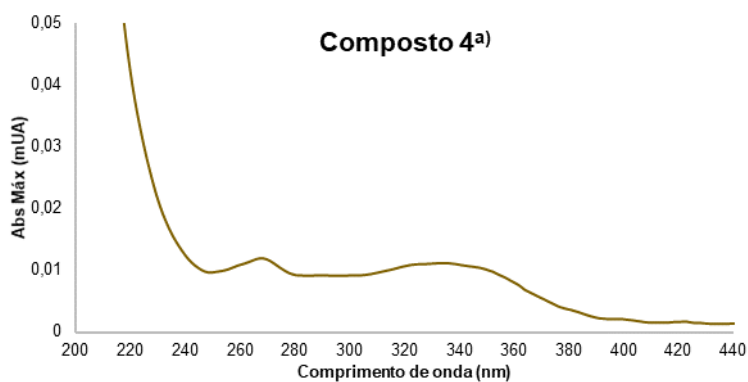


Figura 6. 50. UV-Vis referente ao pico do composto 4^a) presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL.

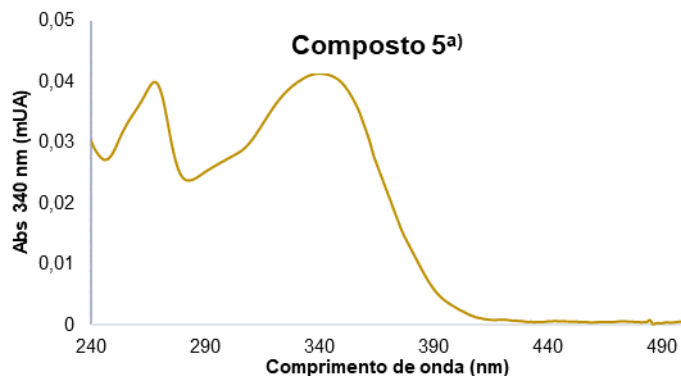


Figura 6.51. UV-Vis referente ao pico do composto 5^a) presentes nas frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 às PTMs de 1, 2 e 3 bar e da amostra da alimentação à concentração de 5 mg/mL.

Anexo 6.3. Cromatogramas da amostra da alimentação (extrato BDP) e dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico

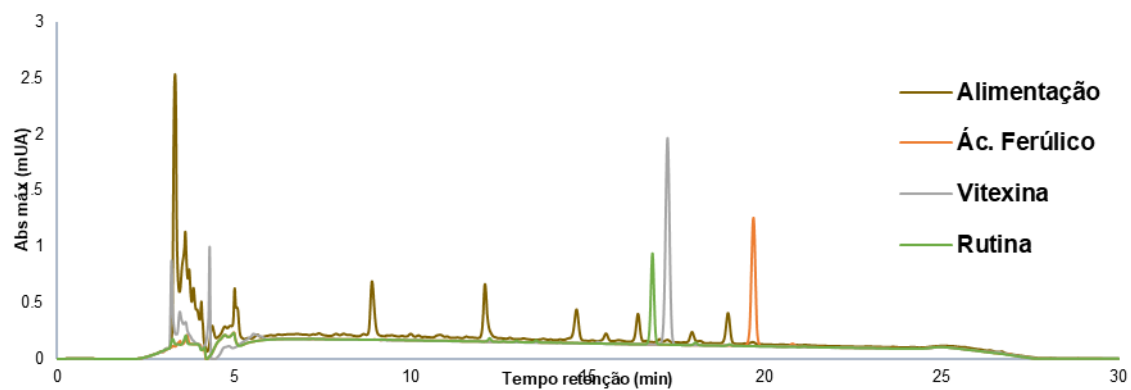


Figura 6.52. Cromatograma da amostra da alimentação (extrato BDP) sobreposto com os cromatogramas dos padrões vitexina, rutina e ácido ferúlico.

Anexo 7. Quantificação dos FT, proteínas e hidratos de carbono presentes nas frações das permeações das membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 e das amostras da alimentação

Tabela 6.5. Quantidade de FT, proteínas e hidratos carbono de presentes nas frações das permeações das membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 e das amostras da alimentação.

Frações (10 mg/ mL)	FT ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Proteínas (mg/ml)	Hidratos de Carbono (mg/mL)
AC20_1	0.080 \pm 0.006	0.381 \pm 0.047	1.700 \pm 0.0933
AC20_2	0.086 \pm 0.006	0.478 \pm 0.039	1.734 \pm 0.1524
AC20_3	0.091 \pm 0.004	0.518 \pm 0.031	1.755 \pm 0.0804
AC20_A	0.170 \pm 0.005	4.932 \pm 0.064	2.176 \pm 0.0966
AC22_1	0.082 \pm 0.005	0.406 \pm 0.037	1.725 \pm 0.1198
AC22_2	0.086 \pm 0.001	0.537 \pm 0.064	1.780 \pm 0.2052
AC22_3	0.090 \pm 0.003	0.603 \pm 0.128	1.795 \pm 0.1385
AC22_A	0.174 \pm 0.006	4.973 \pm 0.089	2.265 \pm 0.1268
AC25_1	0.092 \pm 0.001	0.488 \pm 0.022	1.762 \pm 0.2827
AC25_2	0.099 \pm 0.010	0.576 \pm 0.054	1.825 \pm 0.1237
AC25_3	0.106 \pm 0.002	0.633 \pm 0.050	1.849 \pm 0.1052
AC25_A	0.171 \pm 0.004	4.924 \pm 0.048	2.063 \pm 0.0616
AC28_1	0.099 \pm 0.001	0.567 \pm 0.018	1.768 \pm 0.1197
AC28_2	0.105 \pm 0.005	0.632 \pm 0.100	1.791 \pm 0.0883
AC28_3	0.113 \pm 0.007	0.644 \pm 0.022	1.818 \pm 0.1118
AC28_A	0.171 \pm 0.002	5.002 \pm 0.077	2.115 \pm 0.136
AC35_1	0.105 \pm 0.007	0.646 \pm 0.041	1.908 \pm 0.217
AC35_2	0.109 \pm 0.004	0.685 \pm 0.057	1.929 \pm 0.334
AC35_3	0.112 \pm 0.008	0.731 \pm 0.022	1.945 \pm 0.114
AC35_A	0.164 \pm 0.003	5.031 \pm 0.042	2.159 \pm 0.106
A_Final	0.171 \pm 0.008	5.004 \pm 0.066	1.900 \pm 0.031

Anexo 8. Atividades antioxidantes através do método de DPPH para as frações do permeados das membranas e das amostras da alimentação

Tabela 6.6. Quantificação da atividade antioxidante (método DPPH) para as frações dos permeados das membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 e das amostras da alimentação.

Frações (10 mg/mL)	Atividade antioxidante (%)
AC20_1	16.64 ± 0.766
AC20_2	17.62 ± 0.756
AC20_3	24.41 ± 1.025
AC20_A	28.84 ± 0.686
AC22_1	14.52 ± 0.819
AC22_2	18.61 ± 0.734
AC22_3	24.60 ± 0.699
AC22_A	27.82 ± 0.501
AC25_1	21.60 ± 0.350
AC25_2	23.09 ± 0.601
AC25_3	22.55 ± 0.891
AC25_A	27.58 ± 0.447
AC28_1	21.51 ± 0.935
AC28_2	21.92 ± 1.124
AC28_3	22.43 ± 0.936
AC28_A	26.08 ± 0.924
AC35_1	21.78 ± 1.154
AC35_2	23.77 ± 0.956
AC35_3	24.29 ± 1.520
AC35_A	26.16 ± 3.880
A_Final	28.13 ± 0.979

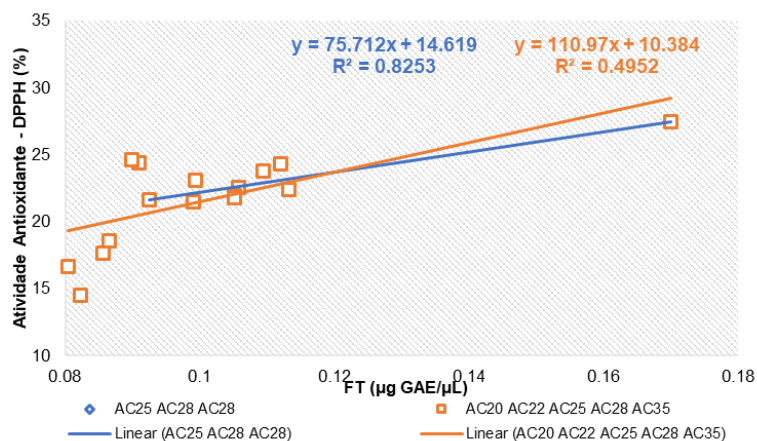


Figura 6.53. Relação entre FT presentes no permeados e na alimentação e a sua atividade antioxidante.

Tabela 6. 7. Quantificação da concentração em FT para 50% da atividade antioxidante (método DPPH) para as frações dos permeados das membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 e da alimentação.

Frações	IC 50 Atividade antioxidante ($\mu\text{g GAE/mL}$)
AC20_1	2.415
AC20_2	2.432
AC20_3	1.862
AC22_1	2.835
AC22_2	2.324
AC22_3	1.829
AC25_1	2.140
AC25_2	2.152
AC25_3	2.344
AC28_1	2.303
AC28_2	2.400
AC28_3	2.526
AC35_1	2.415
AC35_2	2.303
AC35_3	2.306
Alimentação	3.103

Anexo 9. Quantificação da atividade inibitória enzimática da acetilcolinesterase (AChE) nas frações dos permeados para a PTM de 3 bar e das amostras da alimentação.

Tabela 6.8. Quantificação da atividade inibitória enzimática da AChE e concentração em FT para 50% da atividade inibitória enzimática da AChE nas frações dos permeados das membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 para a PTM de 3 bar e da alimentação inicial e final.

Frações (10 mg/mL)	Atividade Inibitória da AChE (%)	IC 50 Atividade antioxidante (μg GAE/mL)
AC20_3	11.96 \pm 1.690	37.994
AC22_3	17.35 \pm 0.816	25.922
AC25_3	16.17 \pm 1.432	32.688
AC28_3	17.38 \pm 1.994	32.586
AC35_3	16.46 \pm 1.350	34.030
AC20_A	22.20 \pm 0.730	37.798
A_Final	30.69 \pm 1.863	28.734

Anexo 10. Determinação da hepatocitotoxicidade celular em células Hep-G2

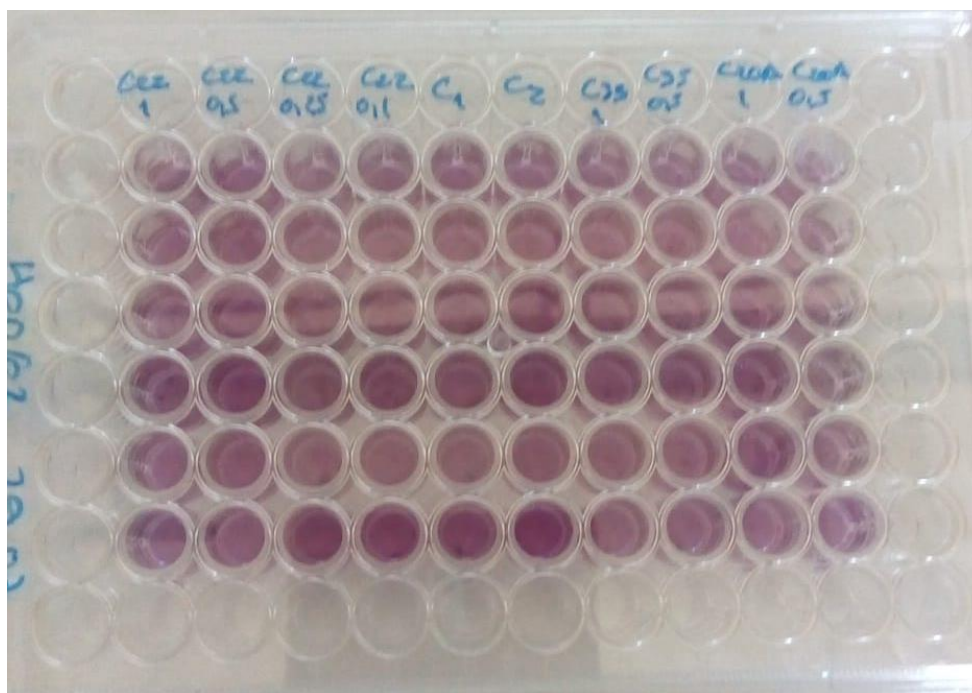


Figura 6.54. Microplaca em células Hep-G2, para determinação da citotoxicidade das frações AC22_3 a 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL e 0.1 mg/mL, AC35_3 a 1 mg/mL e 0.5 mg/mL, e a AC20_A a 1 mg/mL e 0.5 mg/mL.

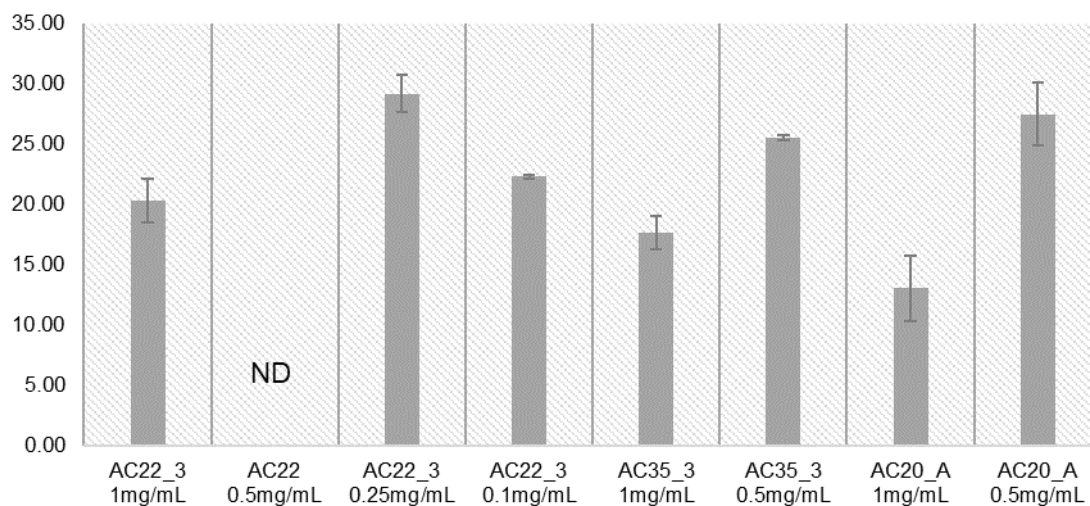


Figura 6.55. Citotoxicidade celular em células Hep-G2 nas frações AC22_3 a 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL e 0.1 mg/mL, AC35_3 a 1 mg/mL e 0.5 mg/mL, e a AC20_A a 1 mg/mL e 0.5 mg/mL.

Anexo 11. Cromatogramas de LC-MSⁿ nos modos de ionização negativo e positivos das frações resultantes das permeações pelas membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 à PTM de 3 bar e da alimentação, AC20_A (extrato BDP)

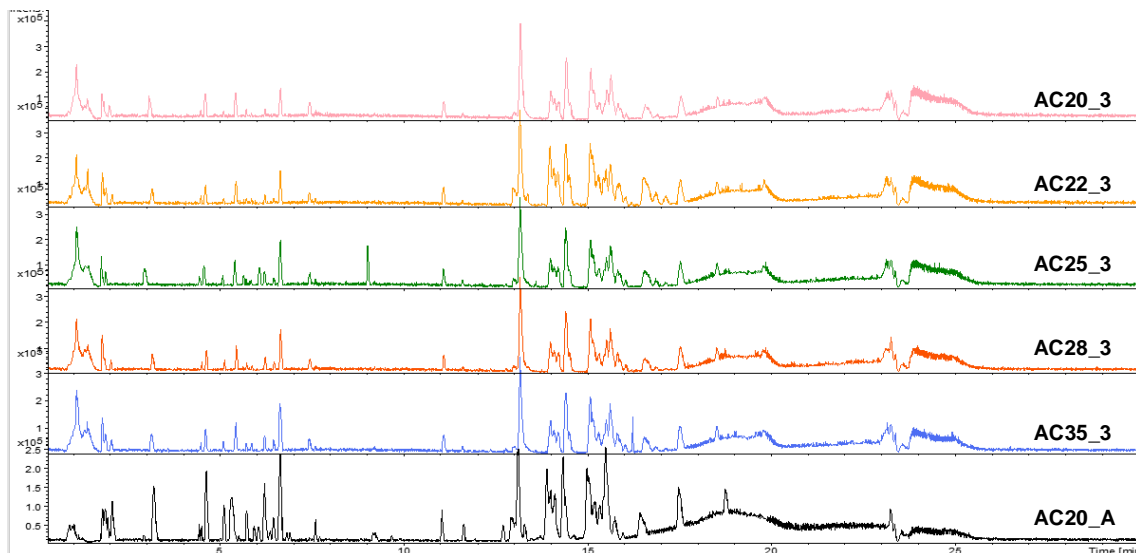


Figura 6.56. Cromatogramas do LC-MSⁿ em modo de ionização negativo das frações: **AC20_A** – linha preta; **AC35_3** – linha azul; **AC28_3** – linha vermelha; **AC25_3** – linha verde; **AC22_3** – linha amarela; **AC20_3** – linha rosa.

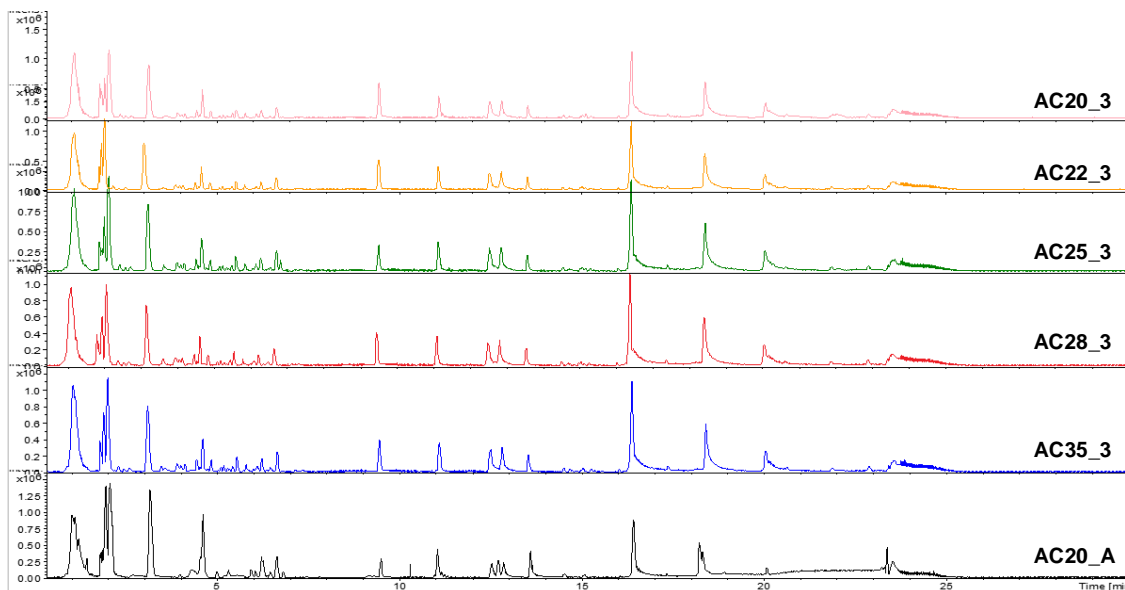


Figura 6.57. Cromatogramas do LC-MSⁿ em modo de ionização positivo das frações: **AC20_A** – linha preta; **AC35_3** – linha azul; **AC28_3** – linha vermelha; **AC25_3** – linha verde; **AC22_3** – linha amarela; **AC20_3** – linha rosa.

Anexo 12. Determinação dos coeficientes intrínsecos e coeficiente de transferência de massa das membranas AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35 para os FT, proteínas e hidratos de carbono.

Tabela 6.9. Dados experimentais referentes aos FT para a construção das retas de calibração para determinação dos coeficientes de rejeição intrínseco (f) e coeficiente de transferência de massa (k).

Frações (10 mg/mL)	f_{FT}	$\ln\left(\frac{1-f_{FT}}{f_{FT}}\right)$	$J_{p\ FT\ 25\ ^\circ C}$ (kg/h.m ²)	ρ (kg/m ³)	$\nu_{p\ FT}$ (m/s)
AC20_1	0.533	-0.131	0.689	998.99	1.549 x 10 ⁻⁷
AC20_2	0.502	-0.008	1.546	998.99	3.473 x 10 ⁻⁷
AC20_3	0.472	0.114	2.528	998.82	5.820 x 10 ⁻⁷
AC22_1	0.522	-0.086	1.382	998.82	3.183 x 10 ⁻⁷
AC22_2	0.497	0.010	2.913	998.99	6.545 x 10 ⁻⁷
AC22_3	0.477	0.091	4.082	998.99	9.172 x 10 ⁻⁷
AC25_1	0.459	0.166	8.453	999.14	1.853 x 10 ⁻⁶
AC25_2	0.418	0.330	17.483	999.14	3.832 x 10 ⁻⁶
AC25_3	0.381	0.485	23.957	999.14	5.251 x 10 ⁻⁶
AC28_1	0.409	0.370	19.546	999.14	4.284 x 10 ⁻⁶
AC28_2	0.372	0.524	32.876	998.99	7.386 x 10 ⁻⁶
AC28_3	0.324	0.737	40.218	998.82	9.260 x 10 ⁻⁶
AC35_1	0.371	0.527	36.905	998.82	8.497 x 10 ⁻⁶
AC35_2	0.346	0.638	47.228	998.64	1.114 x 10 ⁻⁵
AC35_3	0.331	0.706	51.654	998.45	1.248 x 10 ⁻⁵

Tabela 6.10. Dados experimentais referentes às proteínas (Pt) para a construção das retas de calibração para determinação dos coeficientes de rejeição intrínseco (f) e coeficiente de transferência de massa (k).

Frações (10 mg/mL)	f_{Pt}	$\ln\left(\frac{1-f_{Pt}}{f_{Pt}}\right)$	$J_{p\ Pt\ 25\ ^\circ C}$ (kg/h.m ²)	ρ (kg/m ³)	$\nu_{p\ Pt}$ (m/s)
AC20_1	0.923	-2.484	0.689	998.99	1.549 x 10 ⁻⁷
AC20_2	0.904	-2.237	1.546	998.99	3.473 x 10 ⁻⁷
AC20_3	0.895	-2.147	2.528	998.82	5.820 x 10 ⁻⁷
AC22_1	0.917	-2.407	1.382	998.82	3.183 x 10 ⁻⁷
AC22_2	0.892	-2.107	2.913	998.99	6.545 x 10 ⁻⁷
AC22_3	0.878	-1.975	4.082	998.99	9.17 x 10 ⁻⁷
AC25_1	0.902	-2.217	8.453	999.14	1.853 x 10 ⁻⁶
AC25_2	0.884	-2.031	17.483	999.14	3.832 x 10 ⁻⁶
AC25_3	0.873	-1.923	23.957	999.14	5.251 x 10 ⁻⁶
AC28_1	0.887	-2.059	19.546	999.14	4.284 x 10 ⁻⁶
AC28_2	0.874	-1.937	32.876	998.99	7.386 x 10 ⁻⁶
AC28_3	0.872	-1.915	40.218	998.82	9.260 x 10 ⁻⁶
AC35_1	0.871	-1.909	36.905	998.82	8.497 x 10 ⁻⁶
AC35_2	0.863	-1.841	47.228	998.64	1.114 x 10 ⁻⁵
AC35_3	0.854	-1.766	51.654	998.45	1.248 x 10 ⁻⁵

Tabela 6.11. Dados experimentais referentes aos hidratos de carbono (HC) para a construção das retas de calibração para determinação dos coeficientes de rejeição intrínseco (f) e coeficiente de transferência de massa (k).

Frações (10 mg/mL)	f_{HC}	$\ln\left(\frac{1-f_{HC}}{f_{HC}}\right)$	$J_{p\ HC\ 25\ ^\circ C}$ (kg/h.m ²)	ρ (kg/m ³)	$v_{p\ HC}$ (m/s)
AC20_1	0.234	1.186	0.689	998.99	1.549×10^{-7}
AC20_2	0.222	1.253	1.546	998.99	3.473×10^{-7}
AC20_3	0.208	1.336	2.528	998.82	5.820×10^{-7}
AC22_1	0.221	1.260	1.382	998.82	3.183×10^{-7}
AC22_2	0.197	1.406	2.913	998.99	6.545×10^{-7}
AC22_3	0.191	1.444	4.082	998.99	9.172×10^{-7}
AC25_1	0.208	1.339	8.453	999.14	1.853×10^{-6}
AC25_2	0.179	1.522	17.483	999.14	3.832×10^{-6}
AC25_3	0.170	1.588	23.957	999.14	5.251×10^{-6}
AC28_1	0.207	1.346	19.546	999.14	4.284×10^{-6}
AC28_2	0.196	1.410	32.876	998.99	7.386×10^{-6}
AC28_3	0.184	1.491	40.218	998.82	9.260×10^{-6}
AC35_1	0.147	1.757	36.905	998.82	8.497×10^{-6}
AC35_2	0.138	1.832	47.228	998.64	1.114×10^{-6}
AC35_3	0.131	1.894	51.654	998.45	1.248×10^{-6}

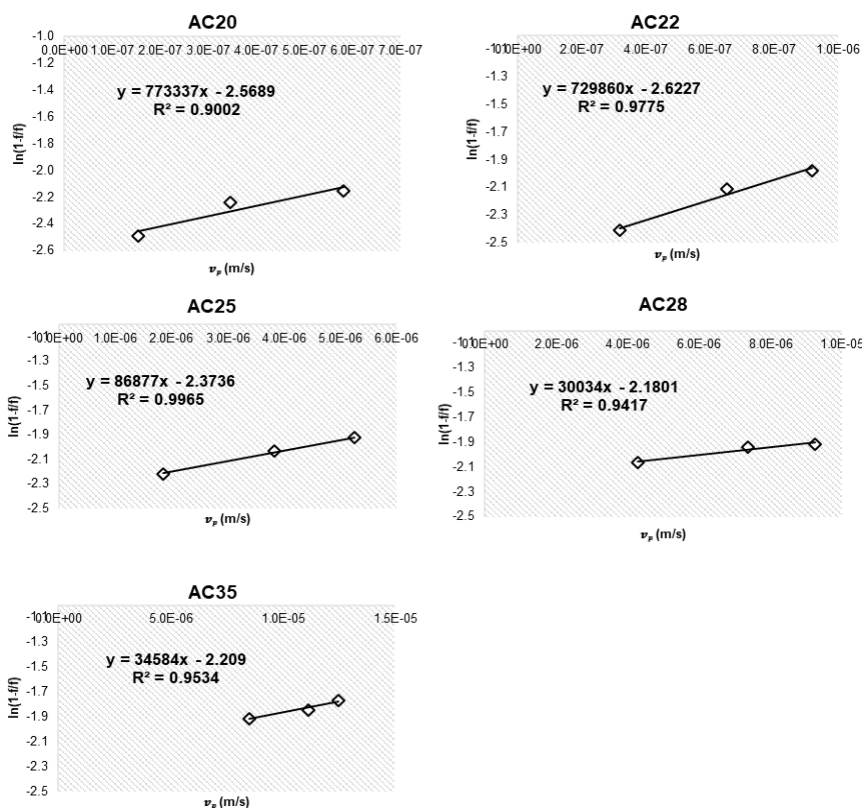


Figura 6.58. Representações gráficas de v_p com $\ln\left(\frac{1-f}{f}\right)$ para as proteínas (Pt) nas membranas: AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.

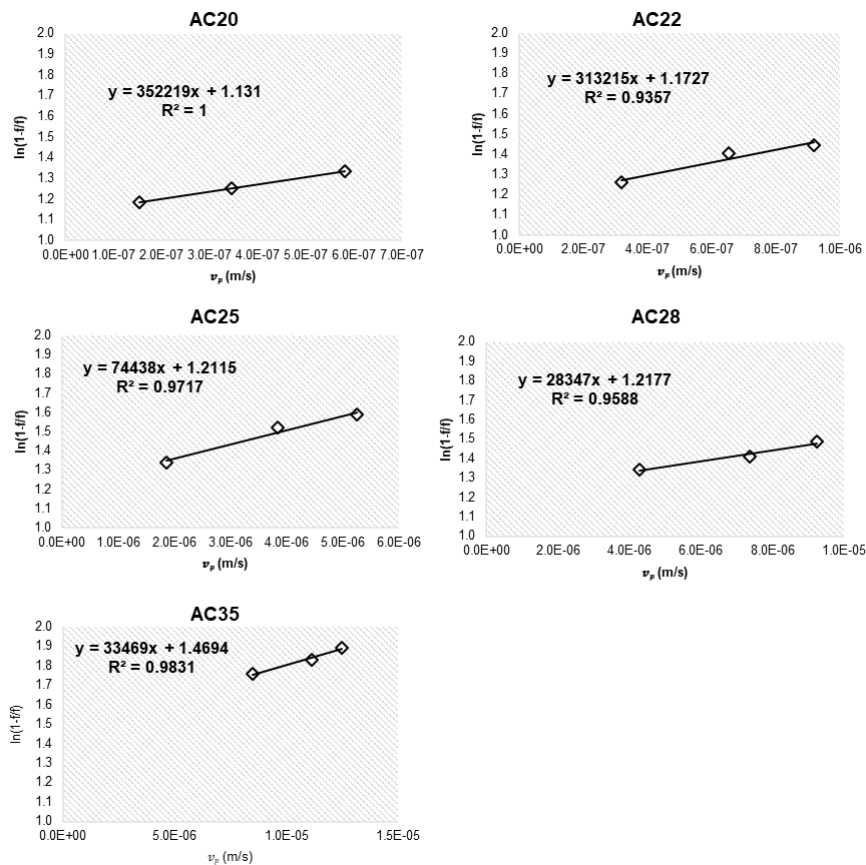


Figura 6.59. Representações gráficas de v_p com $\ln\left(\frac{1-f}{f}\right)$ para os hidratos de carbono (HC) nas membranas: AC20, AC22, AC25, AC28 e AC35.