ISEL
INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA

Estudos em biomassa de macroalgas recorrendo a tecnologias de extração verdes

PATRÍCIA SOLANGE DA SILVA CASTRO

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica-Ramo Química)

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

Orientador:

Doutor José Augusto Paixão Coelho

Júri:

Presidente: Doutora Rita Dias Pacheco

Vogal (Arguente): Doutora Susana Filipa Silva

Vogal (Orientador): Doutor José Paixão Coelho

Lisboa, Dezembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar e essencial neste estudo, quero agradecer ao meu orientador, Dr. José Coelho, por toda a partilha de conhecimentos e experiências, por toda a paciência, por toda a motivação e sobretudo por toda a sua boa disposição, que foi fundamental nos momentos em que alguns dos resultados não eram os esperados.

Agradeço ao Instituto Politécnico de Leiria, à professora Ana Jorge e sua aluna Ana Augusto, pela matéria-prima e por todo o empenho e auxílio ao longo de todo este processo.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia e ao Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico, agradeço bastante a Bolsa de Iniciação Científica atribuída.

À Dra. Paula Robalo, agradeço a disponibilidade e ensinamentos acerca do micro-ondas, os seus conhecimentos e conselhos foram essenciais. Agradeço também a boa receção no laboratório de Química Inorgânica pela Dra. Catarina Sousa. Á Dra. Cecília Calado agradeço a sua disponibilidade e simpatia dada no laboratório de Biomédica, pelo uso do equipamento.

Agradeço a todos os meus amigos, mencionando alguns em especial, Ana Baptista, Carlos Bastos, Tânia Gonçalves, Gonçalo Queimado, Teresa Oliveira, Ana Sofia Almeida, Nicole Jesus, , Inês Almeida, Mágui Remédios, Rosana Guerreiro, Sara Brito, Ricardo Dionísio, Andreia Cardoso, Ivo Leal, Inês Miguel, Marta Catarino, Ester Abreu, Andreia Sousa, Fábio Basílio, Hugo Rodrigues, Ricardo Baixo, Bernardo Farinha, Hugo Rolão, Ruben Mascarenhas, Bernardo Barbosa, Ricardo Batalha, por aturarem o meu mau feitio, por toda a paciência prestada e por todos os bons momentos passados. Ao grupo Gaiteiros, um agradecimento por me fazerem sempre rir e aos restantes amigos que me acompanharam sempre.

Um especial agradecimento à equipa 3253 da ZARA, por aturarem a minha falta de paciência e mau feitio. Aos que sofreram comigo e acompanharam os meus dias, Manuel Verganista, Soraia Gil, Luis Correia, Teresa Rosa e Sofia Alves, obrigado por nunca me deixarem desistir, foram um apoio fundamental.

Por fim, tenho de agradecer às pessoas mais importantes da minha vida que fizeram com que tudo isto se tornasse possível, apoiando-me incondicionalmente, os meus pais, a minha avó, o meu irmão e a minha segunda família, Benedita, Lourenço, Vânia, Pedro, Artur e Fernanda. Ser-lhes-ei eternamente grata.

RESUMO

Neste trabalho procedeu-se ao estudo da macroalga *Codium tomentosum*, efetuando-se extrações por métodos convencionais e não convencionais. A extração em Soxhlet, foi realizada com três solventes distintos hexano, etanol e metanol, obtendo-se um rendimento superior utilizando o metanol, de 42,62 %. Dentro dos métodos não convencionais, foi realizada a extração supercrítica com CO_2 a 400 bar e 60ºC, obtendo-se um rendimento de 1,88 % e a 550 bar a 60ºC obtendo-se um rendimento de 0,62 %. Efetuou-se também dois ensaios similares aos anteriores, mas com uma adição de um co-solvente (etanol a 10 %), verificando-se que não existe diferença significativa no rendimento da extração supercrítica. A extração com líquido pressurizado, PLE, com etanol foi efetuada a 200 bar, 40ºC e com um caudal de 1L/min, obtendo-se um rendimento de 8,75 %. Extrações preliminares com micro-ondas, MAE, foram igualmente efetuados tendo-se obtido rendimentos superiores aos das outras técnicas não convencionais.

Avaliou-se a atividade antioxidante dos diversos extratos obtidos através de três métodos, DPPH, radical ABTS e poder de redução do ferro, verificando-se que os dois primeiros métodos não são reprodutíveis e incoerentes para as amostras em estudo. Determinou-se ainda, o teor de polifenóis e flavonoides dos diversos extratos, verificando-se que existe uma maior quantidade de polifenóis na extração supercrítica com etanol a 400 bar e 40ºC e uma maior quantidade de flavonoides na extração por PLE. O MAE apresentou valores, para estes dois últimos parâmetros, coerentes e reprodutíveis.

Após a análise destes resultados, optou-se pela técnica de extração por micro-ondas, aplicando-se um desenho experimental, utilizando uma Metodologia de Superfície de Resposta para sistematizar os estudos a efetuar a análise simultaneamente do rendimento e flavonoides obtidos em cada ensaio. Um delineamento fatorial fracionário, FFD, seguido por um delineamento composto central, CCD, permitiu determinar as melhores condições experimentais para o MAE, otimizando simultaneamente o maior rendimento e quantidade de flavonoides nas condições estudadas para a macroalga. Finalmente, extratos selecionados em diferentes condições de extração foram testados em maçãs para analisar a sua atividade, quanto à sua capacidade de inibir a oxidação das mesmas, nomeadamente através da medida do seu índice de escurecimento.

Palavras-chave: *Codium tomentosum*, macroalgas, extração por micro-ondas, polifenóis e flavonoides, metodologia de superfície de resposta, fluidos supercríticos.

ABSTRACT

In this work, we proceeded to the study of *Codium tomentosum* macroalgae, extracting by conventional and non-conventional methods. Soxhlet extraction was performed with three distinct solvents: hexane, ethanol and methanol, acquiring a higher yielding using 4,62 % methanol. Within non-conventional methods, supercritical fluid extraction with CO_2 were carried out at 400 bar and 60ºC and at 550 bar and 60ºC, being the yield obtained 1,88 and 0,62 %, respectively. Two similar tests were also performed, but with the addition of a co-solvent (10 % ethanol), and no significant difference was detected in the yield of supercritical extraction. Extraction with pressurized, PLE, liquid with ethanol was carried out at 200 bar, 40 °C and a flow rate of 1 L / min, yielding 8,75 %. Preliminary extractions with microwave, MAE, were also carried out and higher yields were obtained than other unconventional techniques. The antioxidant activity of the various extracts was evaluated, by three methods: DPPH, ABTS radical and iron reducing power. It was found the first two methods were not reproducible and inconsistent for the samples under study. It was also determined the polyphenols and flavonoids content of the various extracts, which led to the conclusion that there is a higher content of polyphenols in the supercritical ethanol extraction at 400 bar and 40ºC and a higher amount of flavonoids in PLE extraction. The MAE exhibit coherent and reproducible values for these last two parameters.

Analyzing these results, microwave extraction technique, was chosen to apply an experimental design. This design used a Response Surface Methodology to systematize the studies and perform a simultaneous analysis of yield and flavonoids obtained in each assay. A fractional factorial design, FFD, followed by a central composite design, CCD, allowed to determine the best experimental conditions for MAE, while optimizing the highest yield and content of flavonoids under studied conditions for the macroalgae.

Finally, extracts selected under different extraction conditions were tested on apples, for their ability to inhibit their oxidation, by measuring their browning index.

Key-words: *Codium tomentosum*, macroalgae, microwave extraction, polyphenols and flavonoids, response surface methodology, supercritical fluids.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfónico)
ANOVA	Análise de variância
CCD	Delineamento de compostos centrais
CO_2	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOE	Desenho Experimental
DX10	Design Expert 10
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC	Equivalentes de catequina
ESC	Extração Supercrítica
EtOH	Etanol
FFD	Delineamento fatorial fracionário
FSC	Fluido supercrítico
IC_{50}	Concentração que inibe 50%
LAIST	Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico
MAE	Extração assistida por micro-ondas
P_c	Pressão crítica
PLE	Extração líquida pressurizada
POD	Enzima polifenol peroxidase
PPO	Enzima polifenol oxidase
ROS	Espécies reativas de oxigénio
T_c	Temperatura crítica
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao trolox
Trolox	Ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano
VIF	Fator de inflação da variância

Índice

AGRADECIMENTOS i
RESUMO ii
ABSTRACT iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS iv
1. OBJETIVO 1
2. INTRODUÇÃO 2
2.1 Algas 2
2.2 *Codium tomentosum* 4
2.3 Métodos de extração 6
2.3.1 Extração em Soxhlet 6
2.3.2 Extração Supercrítica com CO_2 7
2.3.3 Extração Líquida Pressurizada 9
2.3.4 Extração por micro-ondas 10
2.4 Quantificação e caracterização dos extratos 11
2.4.1 Determinação das clorofilas *a* e *b* 12
2.4.2 Método do Radical Livre DPPH 13
2.4.3 Método radical Catião $ABTS^+$ 14
2.4.4 Método do Poder de Redução do ião Fe^{3+} 15
2.4.5 Determinação do teor em polifenóis 15
2.4.6 Determinação do teor em flavonoides 16
2.5 Escurecimento enzimático 16
2.6 Desenho Experimental (DOE) 17
3. PARTE EXPERIMENTAL 19
3.1 Amostra 19
3.1.1 Determinação do teor de humidade 19
3.1.2 Determinação das clorofilas *a* e *b* 19
3.2 Extração da Codium tomentosum 20
3.2.1 Extração em Soxhlet 20
3.2.2 Extração Supercrítica com CO_2 21
3.2.3 Extração Supercrítica com CO_2 e etanol 23
3.2.4 Extração líquida pressurizada (PLE) 23
3.2.5 Extração por micro-ondas 23
3.3 Quantificação e Caracterização dos extratos da *Codium tomentosum* 25
3.3.1 Método do Radical Livre DPPH 25
3.3.2 Método radical Catião $ABTS^+$ 25
3.3.3 Método do Poder de Redução do ião Fe^{3+} 26

3.3.4 Determinação do teor de polifenóis 27
3.3.5 Determinação do teor em flavonoides 27
3.3.6 Determinação do Índice de escurecimento 28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 29
4.1 Caracterização da amostra 29
4.2 Humidade da *Codium tomentosum* 29
4.3 Determinação das clorofilas *a* e *b* 30
4.4 Obtenção do extrato da Codium tomentosum através dos métodos convencionais 31
4.4.1 Extração em Soxhlet 31
4.5 Obtenção do extrato da Codium tomentosum através dos métodos não convencionais 32
4.5.1 Extração Supercrítica com CO_2 32
4.5.2 Extração liquida pressurizada (PLE) 34
4.5.3 Extração em micro-ondas 35
4.6 Quantificação e Caraterização da Codium tomentosum 36
4.6.1 Determinação do poder antioxidante pelo método do DPPH 36
4.6.2 Determinação do poder antioxidante pelo método do ABTS 39
4.6.3 Determinação do poder antioxidante pelo método a redução do Ferro .. 40
4.6.4 Determinação do teor de Polifenóis 40
4.6.5 Determinação do teor de Flavonoides 42
4.7 Desenho Experimental (DOE) 44
4.7.1 Delineamento fatorial fracionário (Fractional Factorial Design) – FFD ... 44
4.7.2 Delineamento dos compostos centrais (Central Composite Design) - CCD 53
4.7.3 Análise dos resultados globais dos fatores estudados 59
4.8 Determinação do índice de escurecimento 60
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS 63
6. BIBLIOGRAFIA 64
7. ANEXOS 72
ANEXO A – Resultados obtidos na obtenção do extrato supercrítico 72
ANEXO B – Resultados obtidos na obtenção do extrato em PLE 73
ANEXO C – Curvas de calibração e parâmetros da regressão linear, relativo aos diferentes métodos de caraterização dos extratos 74
ANEXO D – Índice de escurecimento 79
ANEXO E – Divulgação de trabalho realizado para a comunidade científica 80

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura química geral de uma galactana. 2
Figura 2 - Exemplo de uma *Codium tomentosum* [21]. 5
Figura 3 – Esquema geral da técnica de extração em Soxhlet [32]. 7
Figura 4 - Diagrama de fases do CO_2, para identificação do ponto crítico. [36] 9
Figura 5 – Estrutura química da clorofila a e da clorofila b [47]. 13
Figura 6 – Estrutura básica de um flavonoide [62]. 16
Figura 7 - Montagem laboratorial da extração em Soxhlet. 20
Figura 8 - Equipamento utilizado para extração supercrítica com CO_2. 21
Figura 9 - Esquema representativo do equipamento de Extração Supercrítica (Legenda: C – Compressor; P – Bomba; E – Extrator; S – Separador; BP – Regulador de Pressão; PT – Manómetro; TI – indicador de temperatura; MM – Válvula Micrométrica; MV – Caudalímetro; Tot – Totalizador) [71]. 21
Figura 10 - Micro-ondas utilizado para extração. 24
Figura 11 - Representação gráfica do teor de polifenóis dos extratos da Codium tomentosum, obtidos por Soxhlet e micro-ondas, a diferentes condições. 41
Figura 12 - Representação gráfica do teor de polifenóis dos extratos da Codium tomentosum, obtidos por Extração Supercrítica com CO_2, com CO_2/EtOH e PLE, a diferentes condições. 41
Figura 13 - Representação gráfica do teor de flavonoides dos extratos da Codium tomentosum, obtidos por Soxhlet e micro-ondas, a diferentes condições. 42
Figura 14 - Representação gráfica do teor de flavonoides dos extratos da *Codium tomentosum,* obtidos por Extração Supercrítica com CO_2, com CO_2/EtOH e PLE, a diferentes condições. 43
Figura 15 - Superfície resultante do erro padrão relativo em relação a dois fatores, B: razão solvente soluto e razão dos dois solutos utilizados, etanol/água, C: Razão EtOH/H_2O (%EtOH), para um valor constante de potência e tempo de 90 W e 4,5 min, respetivamente. 49
Figura 16 - Superfície resultante da aplicação da equação 10 ao fator de resposta do rendimento em relação a dois fatores, B: razão solvente soluto e razão dos dois solutos utilizados, etanol/água, para um valor constante de potência e tempo de 90 W e 4,5 min. 51

Figura 17 - Superfície resultante da aplicação da equação 11 ao fator de resposta dos flavonoides em relação a dois fatores, B: razão solvente/soluto e razão dos dois solventes utilizados, etanol/água, para um valor constante de potência e tempo de 90 W e 4,5 min. 53
Figura 18 - Superfície resultante da aplicação da equação 13 ao fator de resposta do rendimento em relação a dois fatores, A: razão etanol/água e B: solvente/soluto, para um valor constante de potência e tempo de 90 W e 4,5 min. 58
Figura 19 - Superfície resultante da aplicação da equação 14 ao fator de resposta dos flavonoides em relação a dois fatores, A: razão etanol/água e B: solvente/soluto, para um valor constante de potência e tempo de 90 W e 4,5 min. 58
Figura 20 - Alterações das maçãs revestidas com água (controlo) e com Codium Tomentosum (A, B, C, D), após 30 minutos. 62
Figura 21 - Curvas de calibração e regressão linear para o antioxidante Trolox referente ao método do DPPH. 74
Figura 22 - Curvas de calibração e regressão linear para o antioxidante Trolox referente ao método do ABTS. 75
Figura 23 - Curva de calibração e regressão linear para o antioxidante Trolox, para o método de redução do ião ferro. 76
Figura 24 - Curva de calibração e regressão linear para o Ácido Gálico, para o método do teor em polifenóis. 77
Figura 25 - Curva de calibração e regressão linear utilizando catequina, para o método do teor em flavonoides. 78

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Classificação taxonómica da Codium tomentosum [19]. 4
Tabela 2 – Caracterização da Codium tomentosum. 29
Tabela 3 - Percentagem de humidade da Codium tomentosum. 30
Tabela 4 - Resultados referentes aos ensaios para a clorofila a e b na matriz inicial. 30
Tabela 5 – Resultados obtidos da Extração em Soxhlet. 31
Tabela 6 –Resultados cumulativos obtidos na Extração Supercrítica com CO_2 a 400 bar e 60ºC. 32
Tabela 7 –Resultados cumulativos obtidos na Extração Supercrítica com CO_2, a 550 bar e 60ºC. 33
Tabela 8 –Resultados cumulativos obtidos na Extração Supercrítica com CO_2, a 400 bar, 40ºC e 10 % de etanol. 33
Tabela 9 - Resultados cumulativos obtidos na Extração Supercrítica com CO_2, a 400 bar, 40ºC e 10 % de etanol. 34
Tabela 10 - Medições e resultados cumulativos obtidos no PLE a 200 bar, 40ºC e 1L/min. 35
Tabela 11 - Massas e rendimentos obtidos na extração por micro-ondas. 35
Tabela 12 - Percentagem de inibição e equivalente de trolox obtidos para diferentes concentrações, referente à análise ao extrato A. 37
Tabela 13 - Percentagem de inibição e equivalente de trolox obtidos para diferentes concentrações, referente à análise ao extrato B. 37
Tabela 14 - Percentagem de inibição obtido para diferentes concentrações, para os diferentes métodos de extração utilizados. 38
Tabela 15 - Percentagem de inibição obtido para diferentes concentrações, referente à análise ao extrato A. 39
Tabela 16 - Poder de redução do ferro referente aos extratos obtidos em micro-ondas. 40
Tabela 17 - Delineamento fatorial fracionário (FFD), IV (2^{4-1}) utilizado na primeira fase do trabalho experimental em termos de fatores de codificação. 45
Tabela 18 - Delineamento fatorial fracionário (FFD), IV (2^{4-1}) utilizado na primeira fase do trabalho experimental em termos de fatores reais de trabalho. 46
Tabela 19 - Delineamento fatorial fracionário (FFD), IV (24-1) utilizado na primeira fase do trabalho experimental em termos dos 4 fatores reais de trabalho e dois fatores de resposta, rendimento e flavonoides. 47

Tabela 20 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliar os principais efeitos para o fator de resposta rendimento. 50
Tabela 21 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliar os principais efeitos para o fator de resposta flavonoides. 52
Tabela 22 - Delineamento composto central, CCD, com dois fatores de estudo e 2 fatores de resposta, rendimento e flavonoides. 55
Tabela 23 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliar os principais efeitos para o fator de resposta rendimento, no CCD. 56
Tabela 24 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliar os principais efeitos para o fator de resposta teor e flavonoides, no CCD. 57
Tabela 25 - Valores obtidos com base na FFD, de rendimento, flavonoides e polifenóis. 59
Tabela 26 - Valores finais obtidos na CCD, rendimento, flavonoides polifenóis totais e o poder de redução do ião ferro. 60
Tabela 27 - Valores determinados de ΔE, após 15 e 30 minutos. 61
Tabela 28 - Resultados obtidos na Extração Supercrítica com CO_2, a 400 bar e 60ºC. 72
Tabela 29 – Resultados obtidos na Extração Supercrítica com CO_2, a 550 bar e 60ºC. 72
Tabela 30 - Resultados obtidos na Extração Supercrítica com CO_2, a 400 bar, 40ºC e 10 % de etanol. 73
Tabela 31 – Resultados obtidos na Extração Supercrítica com CO_2, a 400 bar, 40ºC e 10 % de etanol. 73
Tabela 32 - Resultados obtidos no PLE a 200 bar, 40ºC e 1L/min. 73
Tabela 33 - Parâmetros referentes à regressão ANOVA para o antioxidante, Trolox pelo método de DPPH. 74
Tabela 34 - Parâmetros referentes à regressão ANOVA para o antioxidante, Trolox pelo método do ABTS. 75
Tabela 35 - Parâmetros referentes à regressão ANOVA para o antioxidante Trolox pelo método da redução do ião ferro. 76
Tabela 36 - Parâmetros referentes à regressão ANOVA para o Ácido Gálico, para determinação do teor em polifenóis. 77
Tabela 37 - Parâmetros referentes à regressão ANOVA para a catequina para determinação do teor em flavonoides. 78
Tabela 38 - Médias das leituras lidas e valores determinados do índice de escurecimento no instante inicial. 79

Tabela 39 - Médias das leituras lidas e valores determinados do índice de escurecimento após 15 minutos. 79
Tabela 40 - Médias das leituras lidas e valores determinados do índice de escurecimento após 30 minutos. 79

1. OBJETIVO

O presente trabalho, tem como objetivo valorizar os extratos da alga *Codium Tomentosum*, nomeadamente:

- Estudar métodos de extração, convencionais e não convencionais, no que se refere a tecnologias designadas mais verdes;
- Determinar o rendimento dos diversos tipos de extração;
- Caracterizar os extratos obtidos referente ao seu poder antioxidante, quantificação em polifenóis e flavonoides;
- Avaliar os diferentes parâmetros na extração em micro-ondas, recorrendo a uma ferramenta de desenho experimental.

2. INTRODUÇÃO

2.1 Algas

Mundialmente existe um crescimento de interesse no desenvolvimento e comercialização de produtos funcionais com base em algas, sendo que nos últimos anos a sua importância económica e nutricional tem vindo a aumentar de uma forma significativa. As algas marinhas, são um recurso natural renovável e hoje em dia são utilizadas para diversos fins, como por exemplo, diretamente na alimentação, cosmética, fertilizantes e extração de compostos com atividade antiviral [1], [2], [3].

Das fontes marinhas, as algas são espécies de enorme interesse e em desenvolvimento. São organismos fotossintéticos e podem ser caracterizadas de diferentes formas, organismos unicelulares microscópicos designados por microalgas e organismos multicelulares de grande dimensão designados por macroalgas. As macroalgas marinhas, são organismos semelhantes a plantas que geralmente se ligam a rochas ou outros substratos rígidos em áreas costeiras [4], [5].

As algas agrupam-se em três categorias, dois reinos e três filos sendo estes constituídos pelas algas vermelhas e verdes pertencentes ao reino Plantae e aos filos Chlorophyta e Rhodophyta respetivamente, e pelas algas castanhas pertencentes ao reino Plantae, ao filo Phaeophyta e à classe Phaeophyceae [6].

Em Portugal podem ser encontradas cerca de 250 espécies de algas vermelhas (Rhodophyta), 100 espécies de algas castanhas (Phaeophyta) e 60 espécies de algas verdes (Chlorophyta). Dependendo do tipo de alga, extraem-se compostos com diferentes propriedades, por exemplo, as algas vermelhas são ricas em galactanas (ex: estrutura de uma galactana na figura 1), como o ágar e carragenina. Nas algas castanhas são extraídos compostos como os polissacarídeos, que podem ser utilizados como antioxidantes na indústria alimentar [7], [8], [9].

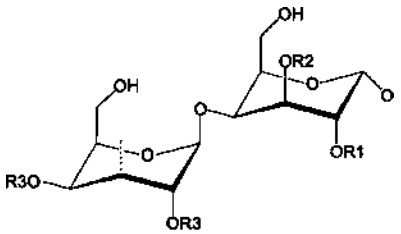

Figura 1 - Estrutura química geral de uma galactana.

As algas marinhas sobrevivem em ambientes bastante complexos e com níveis de salinidade elevados, em ambientes que sofram grandes variações de temperatura e em ambientes que tenham défice de nutrientes, pois as algas produzem uma grande variedade de metabolitos secundários, biologicamente ativos que não podem ser encontrados noutros organismos [4].

As algas marinhas quando se encontram em habitats de águas baixas podem ser expostas a uma combinação de luz ultravioleta e ar que conduz à formação de radicais livres e outras espécies reativas de oxigénio (ROS). Contudo, apesar das algas sofrerem de tal exposição, as algas saudáveis não sofrem danos oxidativos nos seus componentes estruturais e resistem à oxidação durante o seu armazenamento, que indicam a presença de sistemas protetores da defesa antioxidante presentes nas suas células. Ao ser doado um electrão os antioxidantes neutralizam os radicais livres e por consequência oxidam biomoléculas conduzindo à morte celular e danos nos tecidos celulares. Por tais razões a pesquisa de antioxidantes naturais das algas tem vindo a aumentar ao longo dos anos, tendo como objetivo encontrar compostos que possam neutralizar os processos de oxidação, induzidos por radicais livres e consequentemente,diminuindo a incidência de doenças humanas diretamente relacionadas a esses processos [10].

As algas contêm componentes tais como, fibras, proteínas, minerais, vitaminas, e ácidos gordos polinsaturados. Todas as algas, contêm também, uma elevada quantidade de macrominerais (Ca, Mg, Na, P e K) e elementos vestigiais (Zn, I, Mn). É de salientar que as algas marinhas são constituídas geralmente, por Na, K, Ca, Fe e Mg em quantidades significativas, até 15-25% do seu peco seco, sendo por isso uma das principais fontes de cálcio e fósforo. Uma das vantagens deste tipo de algas, é apresentarem uma razão Na/K baixa, o que faz com que ao ingerir-se como alimento, a hipertensão seja reduzida [11], [12].

Como já referido, as algas marinhas são uma fonte bastante rica e vantajosa a nível da saúde, mas não só, também oferecem uma vasta gama de sabores, fragância e texturas. A sua versatilidade como alimento permite o seu consumo de diversas formas, frescas, secas, em conserva, cozidas ou como um componente numa vasta variedade de outros produtos [8], [13].

As algas contêm na sua constituição carotenoides, apresentando estas funções bastante importantes, como suplementos alimentares, nutracêuticos, farmacêuticos e cosmética. A sua presença nas algas pode originar compostos voláteis resultantes, da clivagem oxidativa dos carotenoides, que podem significar o desenvolvimento das algas

e as suas funções como agentes antifúngicos. Os principais carotenoides presentes nas algas verdes são o β-caroteno, luteína, neoxantina, violaxantina e zeaxantina, nas vermelhas são α e β-caroteno, zeaxantina e luteína e nas algas castanhas, β-caroteno, fucoxantina e violaxantina [4], [14].

Contudo, como a maioria das floras, os seus teores de nutrientes são afetados por fatores externos, tais como a localização geográfica e ambiental, condições de amostragem, temperatura da água, salinidade, intensidade da luz, ou a combinação de todos estes fatores [11], [15].

O valor nutricional de cada alga é dependente de diversas caraterísticas, como a sua forma, toxicidade e tamanho [16].

2.2 *Codium tomentosum*

De todos os grupos de algas, as algas verdes encontram-se nas mais diversificadas existindo mais de 17000 espécies. Geralmente vivem em habitats de água doce, mas também surgem em outros habitats como, casca de árvores, neve fundida e, sobre outros organismos, como por exemplo no interior do pêlo dos ursos polares. Estas algas podem ser classificadas em unicelulares ou multicelulares, e as suas formas de maiores dimensões são marinhas, como o género da *Codium*, que pode atingir entre 25 a 30 cm de comprimento. A coloração verde destas algas, devem-se ao facto de apresentarem para além dos carotenoides, clorofilas *a* e *b* em proporções similares [17].

Um dos géneros mais comuns e difundidos de algas marinhas no mundo é o *Codium* Stackhouse (Chlorophyta, Bryopsidales, Codiaceae) existindo cerca de 100 espécies em habitats rochosos ou arenosos em águas temperadas. É de importância extrema, salientar que a espécie tipo (holótipo) deste género é a *Codium tomentosum*, onde a sua classificação taxonómica se encontra na tabela seguinte [17].

Tabela 1 – Classificação taxonómica da *Codium tomentosum* [19].

Reino	**Plantae**
Filo	Chlorophyta
Ordem	Bryopsidales
Família	Codiaceae
Género	*Codium*
Espécie	*Codium tomentosum*

A *Codium tomentosum* enquadra-se nas macroalgas marinhas verdes e é caracterizada por ser verde escura e possuir um talo ou fronde (parte ereta de uma macroalga) constituído por uma estrutura dicotómica muito ramificada, cujas ramificações são finas e cilíndricas com 8 a 10 milímetros de diâmetro. As suas frondas são sólidas e esponjosas cobertas com pelos incolores visíveis quando se encontram dentro de água. O talo desta espécie é constituído por células cenocíticas multinucleadas de dimensões consideráveis [18],[20].

Em Portugal, este género pode também ser conhecido por chorão do mar e pode ser confundido com o *Codium fragile*, sendo esta uma espécie invasora. No entanto estas diferem em alguns aspetos, tais como o facto dos utrículos da *Codium fragile* serem mucronados (terminam em ponta aguda e direita), enquanto, que os da *Codium tomentosum* apresenta uma fronde mais fina de pontas arredondadas [20].

Figura 2 - Exemplo de uma *Codium tomentosum* [21].

Fatores ambientais como, a temperatura, intensidade da luz e salinidade são fundamentais para o crescimento vegetativo e reprodução da *Codium tomentosum.* Por exemplo, com base na *Codium fragile ssp. tomentosoides*, conclui-se que o talo não cresce a temperaturas inferiores a 6ºC e não sobrevive a temperaturas superiores a 33ºC [22],[23].

A espécie em estudo possui um alto conteúdo das proteínas lectinas, conferindo alguns benefícios tal como a capacidade anti-inflamatória. É utilizada em medicina, farmacologia, alimentação humana e cosmética. Uma das razões desta alga ser utilizada em cosméticos, nomeadamente cremes hidratantes, esfoliantes, cremes anti-envelhecimento, é possuir uma quantidade significativa de ácido glucurónico, cuja

função é regular a distribuição de água na pele, protegendo-a dos efeitos adversos de um ambiente excessivamente seco [22],[25].

A *Codium tomentosum* é originária do nordeste do Oceano Atlântico e a sua distribuição geográfica vai desde as ilhas britânicas até ao sul dos Açores e Cabo Verde, encontrando-se também ao longo das costas de África. Em Portugal é comum encontrar esta espécie ao longo de todo o litoral. Relativamente ao habitat desta espécie, ela pode ser encontrada em locais abrigados ou expostos, no horizonte superior do patamar infralitoral e no horizonte inferior do patamar médio litoral. Anualmente são recolhidas cerca de 4 milhões de toneladas de alga a nível mundial, a fim de serem realizados diversos estudos envolvendo a espécie em estudo. As algas são renováveis mas finitas, portanto é de extrema relevância que o seu cultivo ou uma exploração ordenada seja realizada para as comunidades costeiras [26].

2.3 Métodos de extração

A obtenção dos extratos pode ser efetuada com recurso a várias tecnologias de extração. A obtenção das diferentes substâncias obtidas tais como um óleo essencial, óleo resina ou o mais comum designado como extrato, depende e são influenciados por diversos fatores, tais como, a tecnologia de extração, o tipo de solvente, matriz da planta, pressão, temperatura e tempo, entre outros [27],[30].

Os métodos de extração podem ser classificados em dois grupos, os métodos convencionais e não convencionais. Os convencionais têm como base o poder de extração solventes usados e na utilização de calor e agitação, como por exemplo a extração em Soxhlet, já os não convencionais são mais recentes e têm sido desenvolvidos nos últimos anos. Os métodos não convencionais têm diversas vantagens face aos outros, tais como, utilização reduzida de solventes orgânicos e por consequência são menos prejudiciais para o meio ambiente, menor tempo de operação e resultados comparáveis ao rendimento e qualidade do extrato. Exemplos destes métodos são a extração com fluidos supercríticos, extração supercrítica com CO_2 e extração por micro-ondas [30], [31].

2.3.1 Extração em Soxhlet

Este tipo de extração tem sido bastante utilizado para extrair compostos bioativos a partir de diversas fontes naturais e atualmente, é utilizada como técnica de referência

face a novas alternativas de extração. De uma forma genérica a técnica inicia-se colocando uma pequena quantidade de amostra seca num cartucho, sendo este posteriormente colocado num extrator de Soxhlet. Este, é conectado a um balão que contém o solvente a ser utilizado no processo. Após atingir um nível, obrigando a solução a transbordar, via sifão, a solução que se encontra dentro do cartucho volta ao balão de destilação, reiniciando todo o procedimento [27].

Uma vantagem bastante relevante da extração deste tipo, é ser um processo semi-contínuo, isto é, consoante a solução saturada em metabolitos solubilizados é descarregada no balão, o solvente é novamente condensado e efetua a extração do material de forma contínua. Como geralmente todos os métodos apresentam algumas desvantagens, este não é exceção, como o extrato é aquecido repetidamente até atingir o ponto de ebulição do solvente utilizado, isso pode danificar os compostos termolábeis e/ou originar a sua degradação [30].

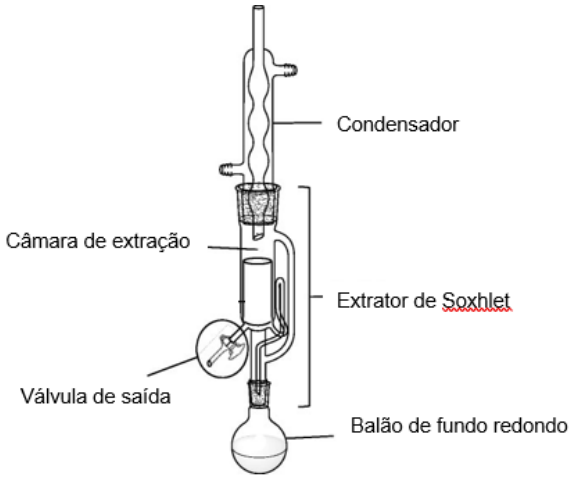

Figura 3 – Esquema geral da técnica de extração em Soxhlet [32].

2.3.2 Extração Supercrítica com CO_2

A extração supercrítica com CO_2 (ESC), tem como objetivo a separação de substâncias solúveis de uma matriz sólida, através do contato com um solvente que se encontra acima de um determinado valor de pressão e temperatura, designado por ponto crítico. O ponto crítico de qualquer substância pura define-se pelo valor de temperatura e pressão a partir do qual a substância deixa de existir em equilíbrio liquido-vapor. Acima do ponto crítico a substância não apresenta qualquer diferença entre o estado liquido e o gasoso, denominando-se assim como fluido homogéneo, também designado por fluído supercrítico [30].

Os fluidos supercríticos (FSC'S) apresentam a particularidade de se comportarem como um meio compressível perto do ponto crítico, o que conduz a que pequenas alterações na pressão originem significativas alterações na densidade. Estes fluidos possuem características tanto similares às de um gás como às de um líquido, tais como boa compressibilidade, alta difusividade, baixa viscosidade referente aos gases, e baixa tensão superficial e densidade comparável com as dos líquidos [27], [29].

As propriedades que caracterizam os FSC'S, fazem com que estes sejam considerados solventes eficientes e seletivos. Apresentam uma capacidade de dissolução equiparado a um solvente orgânico liquido e as propriedades de transporte de um gás, conduz a tempos de retenção menores e melhores rendimentos, favorecendo assim a extração [31]. Assim, a utilização dos FSC'S apresenta inúmeras vantagens, a sua maioria encontra-se com um bom grau de pureza e a baixo custo, não são tóxicos nem inflamáveis, são facilmente recuperados e apresentam uma boa seletividade no processo de extração [33].

Existem várias substâncias que podem ser utilizadas como FSC'S, nomeadamente etano, butano, propano, pentano, óxido nitroso, amoníaco, água e dióxido de carbono. A utilização do dióxido de carbono como fluido supercrítico tem vindo a aumentar nos últimos anos devido às suas vantagens, destacando-se o facto da extração supercrítica poder ocorrer a baixas temperaturas garantindo, a conservação térmica dos compostos [30], [33].

A maior utilização do CO_2 deve-se ao facto deste ser um solvente inerte, de baixo custo, não apresentar toxicidade nem inflamabilidade, facilmente disponível e reciclável para usos posteriores. Aliadas a essas vantagens, existe o facto dos seus valores de temperatura e pressão crítica serem relativamente baixos (T_c = 31,1ºC e P_c = 72,8 atm),

o que permite uma extração de compostos termolábeis com menor risco de degradação [34], [35].

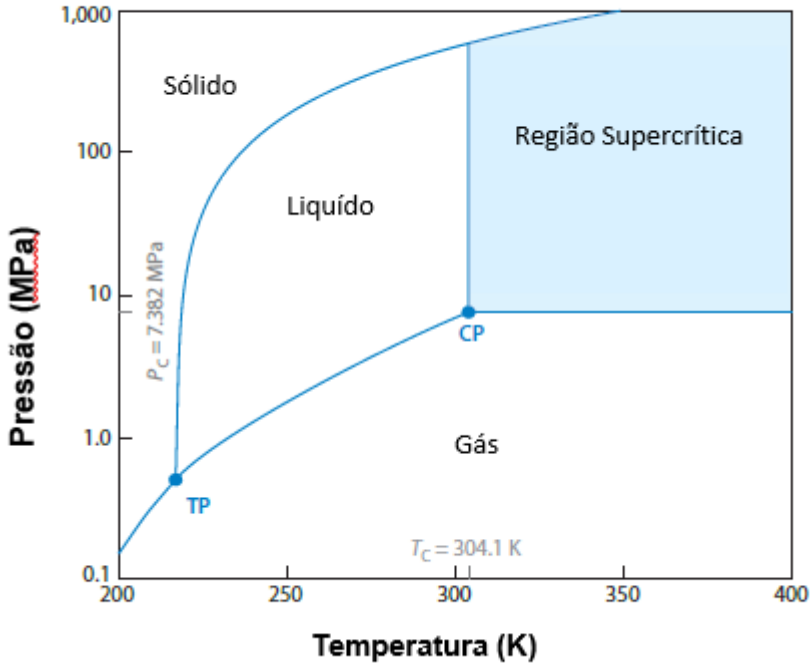

Figura 4 - Diagrama de fases do CO_2, para identificação do ponto crítico. [36]

Devido ao seu comportamento não polar, o CO_2 é o composto mais adequado para a extração de compostos lipofílicos e substâncias não polares. Apresenta baixa afinidade para com compostos polares, sendo possível contornar este valor mais baixo de solubilidade adicionando um co-solvente (tipicamente até 10%), nomeadamente água, etanol ou metanol, acetato de etilo e acetona [37].

A utilização de co-solventes tem como vantagens, melhorar a eficiência da extração, aumentando a produtividade e alterando a seletividade do processo. Estes, podem modificar determinadas características da mistura de solventes (CO_2 e co-solvente), como por exemplo, a polaridade [38].

2.3.3 Extração Líquida Pressurizada

A extração líquida pressurizada (PLE) tem como princípio, a utilização de solventes, de modo a possibilitar extrações a altas pressões e temperaturas, sempre abaixo dos seus pontos críticos, de forma, a que o estado líquido seja mantido durante

todo o processo de extração. Uma maior temperatura permite que a amostra seja mais solúvel e atinja uma taxa de difusão mais alta, enquanto que uma pressão elevada mantém o solvente abaixo do seu ponto de ebulição [39],[40].

O desenvolvimento deste método envolve a otimização de diferentes fatores que podem influenciar o processo de extração para cada amostra em particular. A temperatura é um dos fatores importantes, teoricamente temperaturas altas poderiam fornecer melhores resultados em termos de rendimentos. Contudo, ao ser realizada a compostos bioativos, este fator tem de ser analisado, uma vez que para compostos bioativos termolábeis, pode ter impacto negativo através da sua degradação [40].

O PLE é utilizado na extração de diversos compostos de matrizes vegetais como o seu óleo vegetal, utilizado ou ainda na extração de componentes minoritários nas matrizes, como por exemplo, fenóis, carotenoides, esteróis e fosfolípidos, devido a poderem ser extraídos a temperaturas mais elevadas [40].

Relativamente aos solventes os mais utilizados neste tipo de extração são etanol, água ou uma mistura de ambos. Outros mais prejudiciais sendo tóxicos e nocivos podem ser também utlizados, como por exemplo diclorometano [40].

Os métodos convencionais utilizam grandes quantidades de solventes orgânicos tóxicos, envolvem grandes tempos de extração e possuem baixas seletividades. Contrariamente, o PLE utiliza quantidades de solvente menores e é realizada em tempos mais curtos [40],[41].

Existem diversas vantagens na utilização deste método, tais como, o melhoramento do rendimento da extração, menor tempo de extração e por consequência menor consumo de solvente, facilidade na utilização de misturas de solvente proporcionando uma melhor qualidade de extração. Uma das desvantagens deste método é ser necessário obter pressões elevadas, o que faz com que seja essencial a utilização de equipamento adequado, como bombas de alta pressão para manusear o solvente, fazendo com que o processo fique mais dispendioso [40].

2.3.4 Extração por micro-ondas

Ao longo do tempo, diversos métodos de extração têm vindo a ser desenvolvidos, de modo a que se consiga extrair componentes bioativos de produtos, incluindo algumas técnicas inovadoras, como a extração assistida por micro-ondas (MAE), extração por ultrassom, entre outros [42].

A extração assistida por micro-ondas (MAE) é um método relativamente recente, que tem recebido atenção crescente como um método alternativo. O princípio do aquecimento durante a irradiação da micro-onda é baseado no efeito direto das micro-ondas em moléculas pela condução iónica e pela rotação do dipolo [43].

Este processo utiliza a energia de micro-ondas para aquecer a partir do interior da matriz vegetal e os solventes em contato de modo, a se extrair os componentes naturais da planta. Uma extração tipicamente assistida por micro-ondas é concluída em poucos minutos com maior rendimento e menor consumo de solvente [43].

A extração por micro-ondas, é um método mais verde e mais eficaz, comparativamente a outras técnicas recentes. Apresenta várias vantagens, tais como, redução do tempo de extração, melhor eficiência a nível de energia, o que por consequência melhora a extração e a natureza favorável ao meio ambiente e geralmente aumenta a pureza do extrato. Outras importantes vantagens deste método face à Hidrodestilação e Soxhlet, é o facto de provocar menores alterações químicas de componentes vegetais originais, como rearranjo, desidratação e isomerização e a utilização de menor quantidades de solvente [42], [43], [44].

O uso de solventes polares numa primeira etapa do processo pode ser uma desvantagem deste método, uma vez que os compostos de matriz polar são co-extraídos, o que poderá interferir durante as seguintes etapas analíticas. Ou seja, quando se pretende analisar compostos não polares por vezes é necessário, outra extração utilizando solventes apolares, permitindo um melhor fracionamento e separação de famílias de compostos. Além disso, os processos de arrefecimento e filtração que são necessários após a fase de extração em caso de processos em vasos fechados, tornando-os mais morosos. Outra das desvantagens deste método é o equipamento que se utiliza ser dispendioso, o que acaba por condicionar a escolha de utilização deste método [43], [44].

Na extração de compostos de uma matriz assistida por micro-ondas, a potência do equipamento, o tempo de extração, a natureza do solvente, a razão entre sólido e solvente e a condição da matriz vegetal são importantes fatores que influenciam a eficiência do processo [43].

2.4 Quantificação e caracterização dos extratos

A caraterização a nível dos seus constituintes elementares das matrizes é um fator a ser considerado que pode ser efetuado recorrendo à sua análise elementar, nomeadamente na composição total em termos de azoto, N, carbono,C, hidrogénio,H,

oxigénio, O, e enxofre, S. Simultaneamente, a quantidade de clorofilas é igualmente importante nas macroalgas marinhas verdes, sendo por isso um parâmetro a quantificar.

Por outro lado, as macroalgas não apresentam danos oxidativos na sua componente estrutural e apresentam grande estabilidade à oxidação durante o armazenamento, o que se pode dar devido ao facto das suas células apresentarem defesa antioxidante. [10] A atividade antioxidante abrange a capacidade de um composto em inibir, retardar e prevenir a oxidação de materiais oxidáveis através da eliminação de radicais livres, reduzindo assim o stress oxidativo. Este ocorre quando as espécies reativas de oxigénio (ROS) se encontram em excesso, podendo oxidar e danificar a membrana lipídica, proteínas e DNA, conduzindo à sua alteração, podendo inibir a sua função. Assim sendo, os antioxidantes podem proteger o corpo humano contra danos causados por ROS. [10], [45]

2.4.1 Determinação das clorofilas *a* e *b*

Existem três principais classes naturais de pigmentos, sendo as clorofilas a classe mais relevante, pois estas são o pigmento responsável pela fotossíntese, processo que converte energia luminosa em energia química [46].

Em 1818, Pelletier e Caventou propuseram o nome clorofila derivado das palavras gregas que significam verdes (chloros) e folha (phyllon). Os pigmentos fotossintéticos presentes e a sua existência em abundância variam de acordo com a espécie. As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas e ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais [47], [48].

Todas as plantas verdes apresentam na sua constituição, clorofila *a* e *b,* sendo que em plantas superiores a clorofila *a* é o principal pigmento, sendo utilizada para realizar o primeiro estágio do processo fotossintético e a clorofila *b* um pigmento acessório, presente em algas verdes e algumas bactérias. As diferenças apresentadas na cor do vegetal devem-se à presença e distribuição variável de outros pigmentos associados, como por exemplo os carotenoides, que acompanham sempre as clorofilas [46].

A clorofila *a* e *b* diferem em apenas um átomo de uma cadeia lateral no terceiro carbono, estando na clorofila o terceiro carbono ligado a um grupo metilo, enquanto que na clorofila *b* encontra-se ligado a um grupo aldeído, tal como se pode verificar na figura 5. [46], [47].

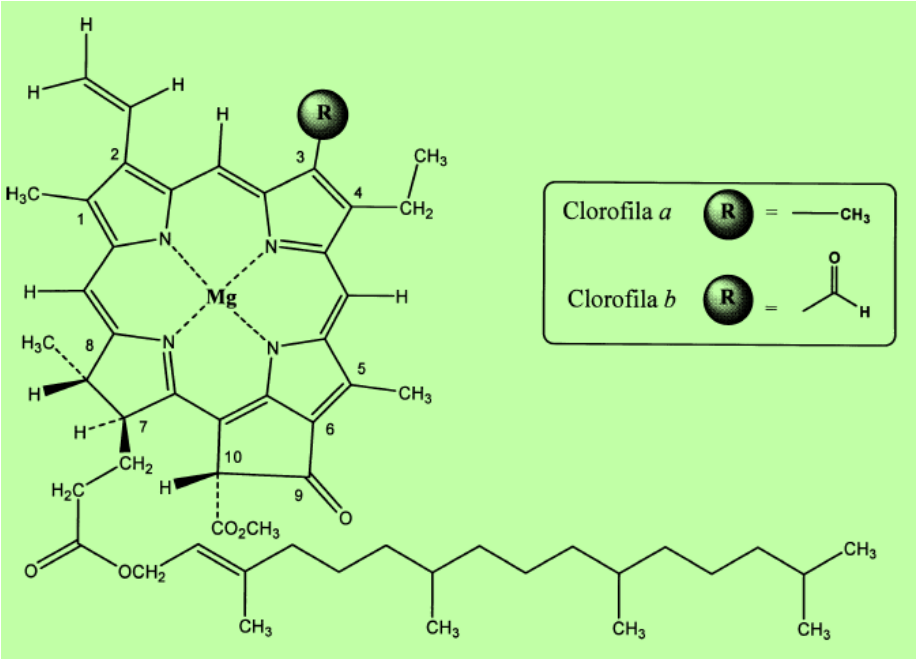

Figura 5 – Estrutura química da clorofila *a* e da clorofila *b* [47].

O caráter hidrofílico e hidrofóbico de uma substância influencia de maneira significativa a escolha de qual solvente a utilizar na extração. Os solventes polares mais eficazes para a extração das clorofilas são a acetona, o metanol, o etanol e o acetato de etilo. Já, os solventes apolares com menor eficácia, são o hexano e o éter de petróleo [47].

2.4.2 Método do Radical Livre DPPH

Este método consiste numa reação de doação de electrões ou hidrogénios de uma determinada amostra com potencial antioxidantes, na presença de um radical livre estável de DPPH•. Deste modo, o efeito dos antioxidantes presentes na amostra, possibilitam a neutralização do DPPH• para DPPH-H, ocorrendo uma alteração da cor inicial, violeta, para amarelo, o que acontece devido à diminuição do valor da absorvância ao longo do tempo, geralmente 40 minutos. Quanto maior for o decréscimo do valor de absorvância, maior o poder antioxidante da amostra [49].

Uma das formas da atividade antioxidante ser representada é a determinação do IC_{50}. Ou seja, determinar a concentração da quantidade necessária de antioxidante de modo a que se consiga inibir os radicais livres de DPPH em 50%. A percentagem de inibição é calculada através da expressão abaixo apresentada [50].

$$\%inibição = (\frac{A_{controlo} - A_{amostra}}{A_{controlo}}) \times 100$$ **Eq.1**

Onde,

$A_{controlo} = Absorvância\ medida\ do$ DPPH • em metanol

$A_{amostra} = Absorvância\ medida\ do$ DPPH • na amostra em estudo

A atividade antioxidante da amostra aumenta, quanto menor for o valor de IC_{50}, isto é, será necessária uma quantidade inferior da mesma, de modo a inibir 50% da concentração de radicais livres de DPPH• em solução [51].

Este método apresenta várias vantagens, como ser de fácil execução, a possibilidade de avaliar diversas amostras em simultâneo, diminuindo assim o tempo de ensaio e a possibilidade de realização de ensaios com baixas concentrações. Existem também algumas desvantagens, como as moléculas de DPPH• serem volumosas, dificultando o acesso ao radical [52].

2.4.3 Método radical Catião $ABTS^+$

Tal como já referido, o método do DPPH é o mais utilizado para a análise da atividade antioxidante de produtos naturais. No entanto, devido a alguns problemas na sua aplicação, utiliza-se um método alternativo baseado na eliminação do catião radical $ABTS^{\bullet+}$, um centro radical de azoto moderadamente estável [53].

Este método avalia a capacidade que os extratos, potencialmente antioxidantes, apresentam de modo a que, o catião radical $ABTS^+$ seja eliminado na fase aquosa [54].

Através da reação de oxidação do ABTS com persulfato de potássio, é formado o radical de $ABTS^{\bullet+}$ e este é reduzido na presença de antioxidantes que doam hidrogénios. Este composto pode ser encontrado ou na forma sólida ou como cristais, apresentando uma cor esverdeada [55].

A determinação do poder antioxidante e o IC_{50} através deste método é similar ao método do DPPH, onde se utiliza a mesma equação (equação 1) para a determinação do IC_{50} [55].

É um método mais versátil que o DPPH, pois permite analisar amostras polares e não polares, e para além disso, é possível monitorizar a atividade da amostra ao longo de um determinado período de tempo [53].

As condições de armazenamento, o pH, o tempo de conversão do $ABTS^{\bullet+}$, temperatura utilizada no ensaio e o agente oxidante utilizado, são diversos fatores que podem afetar de forma significativa o método mencionado [52].

2.4.4 Método do Poder de Redução do ião Fe^{3+}

O aumento da absorvância de uma determinada mistura reacional, influencia o aumento do poder de redução de um composto, devido à presença de determinados antioxidantes e redutores, como por exemplo, o ácido ascórbico [56].

Neste método os extratos atuam como doadores de electrões, em que o ião Fe^{3+} é reduzido a ião Fe^{2+}, transformando a solução amarelada do composto que continha o ião férrico, numa solução azul ou esverdeada, dependendo da capacidade de cada extrato [57].

Este método é simples, pouco dispendioso e apresenta boa precisão e reprodutibilidade [58].

2.4.5 Determinação do teor em polifenóis

Os polifenóis são uma das famílias principais de metabolitos secundários, presente nas plantas. Este tipo de família inclui diversos números de compostos, variando entre compostos de estrutura simples a compostos com estruturas altamente polimerizadas [59], [60].

Estes possuem um ou mais anéis aromáticos com grupos hidroxilo e estão associados ao crescimento e reprodução da planta. Os polifenóis também têm como função oferecer resistência a agentes patogénicos e parasitas, e proteger a planta da radiação Ultravioleta [35].

O método utilizado para determinação dos polifenóis, é o Folin-Ciocalteu, onde a reação forma um cromóforo azul constituído por um complexo de fósfomolibdénio, cuja absorção máxima dos cromóforos depende da solução alcalina e da concentração dos compostos fenólicos. Este reagente apresenta uma desvantagem, decompõe-se em

soluções alcalinas rapidamente, o que faz com que seja necessário utilizar um excesso de reagente de modo, a que se consiga obter uma reação completa [61].

2.4.6 Determinação do teor em flavonoides

Os flavonoides são compostos caraterizados pela sua estrutura C6-C3-C6 em que um anel heterocíclico pirânico (C) une dois anéis fenólicos (A e B), tal como se pode verificar na figura 6. As modificações estruturais do anel central C estão na origem das diferentes famílias de compostos. Os flavonoides pertencem ao grupo de polifenóis que inclui os flavonóis, as flavanonas, as flavonas, os flavanóis, as antocianinas e as isoflavonas [62].

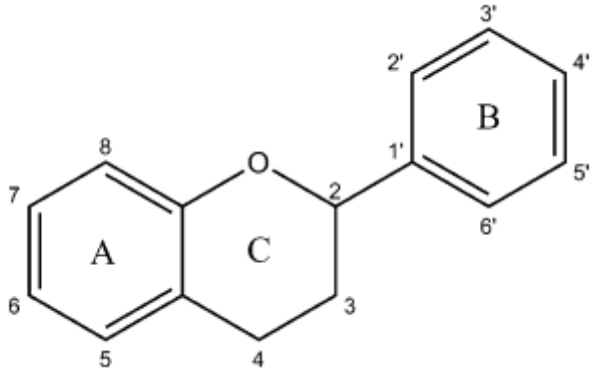

Figura 6 – Estrutura básica de um flavonoide [62].

Atualmente estão identificadas mais de 4000 variedades de flavonoides, em que a maioria é responsável pelas cores das flores, folhas e frutas. Estes apresentam para além de propriedades antioxidantes, outras propriedades a nível da saúde como, anti-inflamatórias, anticancerígenos e anti-hipertensivos [63].

2.5 Escurecimento enzimático

O escurecimento que ocorre geralmente em frutas, é resultado de oxidações enzimáticas. Na degradação oxidativa dos compostos fenólicos existem duas enzimas que são de extrema importância em termos de qualidade alimentar que conduzem à produção de produtos acastanhados, a polifenol oxidase (PPO) e a polifenol peroxidase (POD) [64], [65].

Os compostos fenólicos, amplamente distribuídos no reino *Plantae* são considerados como metabolitos secundários. Estruturalmente contêm um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilos, juntamente com outros substitutos. A composição fenólica de frutas e hortaliças varia de acordo com alguns fatores, tais como, a espécie, cultivo, grau de amadurecimento e condições ambientais de desenvolvimento e de armazenamento [66].

Métodos diversos têm sido estudados para inibir o escurecimento enzimático, um deles é a seleção de variedades que contenham baixas concentrações de substratos para essas reações, sendo esta medida demorada e dispendiosa. Ou seja, o controlo do escurecimento enzimático é limitado à inibição da enzima ou remoção de oxigénio [66].

O SO_2 é dos agentes químicos o mais eficiente no controlo do escurecimento enzimático, tendo como vantagem o facto de ser pouco dispendioso. Outro composto bastante utilizado é o ácido ascórbico, que é utilizado a temperaturas baixas, contudo, este acaba por ser destruído ao longo de todo o processo, mas é bastante útil em produtos minimamente processados que apresentem uma elevada taxa de escurecimento [67].

Vários compostos químicos têm sido estudados para utilização no combate ao escurecimento enzimático, mas na maioria têm como grande desvantagem o facto de serem tóxicos [66].

Outro fator bastante importante na inibição do escurecimento enzimático é a temperatura, ou seja, a realização de tratamentos térmicos é um método bastante utilizado. No entanto este método se for de uma natureza drástica apresenta como desvantagem, alterações da textura do produto, prejudicando assim a sua qualidade [64].

2.6 Desenho Experimental (DOE)

O desenho experimental (DOE) é uma técnica que possibilita estimar os efeitos das diversas condições operacionais, nomeadamente fatores, nos resultados do processo, nomeadamente respostas. Ou seja, para um determinado sistema, especificamente extração em micro-ondas é possível identificar os principais fatores do processo [68], [69].

O método designado convencional consegue identificar os efeitos de um determinado fator, mantendo os restantes constantes [69].

O DOE apresenta como vantagem significativa, o facto de existir a possibilidade de alteração simultânea de fatores distintos, reduzindo assim o número de ensaios experimentais necessários. Ou seja, o método convencional apesar de ser um método simplificado requer um vasto número de ensaios, desvantagem esta face ao desenho experimental [69].

O planeamento e análise de experiências devem seguir alguns passos, tais como: 1) identificar e definir o problema, escolher os fatores e níveis e selecionar a variável-resposta; 2) escolher o plano experimental; 3) realizar a experiência; 4) analisar estatisticamente os resultados; e 5) elaborar conclusões ou recomendações.

Os requisitos mais importantes para o planeamento duma experiência podem ser descritos como: evitar os erros sistemáticos ou enviesamentos; minimizar os erros aleatórios; ser possível estimar a extensão dos erros aleatórios; os resultados devem ser o mais preciso possível e deve-se utilizar a estrutura especial dos dados através do ajuste de fatores. Em suma, os três princípios básicos do desenho experimental são: a replicação (estimação do erro aleatório), a aleatorização (redução dos erros sistemáticos durante a experiência e para caucionar a relativa independência das observações e dos erros) e a utilização de blocos (técnica destinada a reduzir ou eliminar a variabilidade introduzida por fatores que podem influenciar a experiência mas que não interessam e/ou não foram explicitamente incluídos durante o planeamento).

Existe uma relação estreita entre o desenho experimental e a posterior análise dos resultados da experiência, uma vez que o seu objetivo é tornar a análise e interpretação dos resultados simples e clara. A técnica estatística associada a esta análise é designada por Análise de Variância (ANOVA).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Amostra

A amostra em estudo, *Codium tomentosum,* foi previamente recolhida nas praias da zona Oeste, mais concretamente na zona de Peniche. Após a sua recolha, foi seca, moída e congelada a -80ºC até ser utilizada. A sua análise elementar e caraterização foi efetuada no LAIST.

3.1.1 Determinação do teor de humidade

Foram realizados ensaios em três dias consecutivos, de forma a determinar a percentagem de humidade presente na amostra em estudo, considerando a importância deste parâmetro para os processos de extração, nomeadamente com fluidos supercríticos, como o dióxido de carbono. Os experimentos, foram realizados com base na balança térmica, Kern MRS I20-3, sendo o teor de humidade determinado no equipamento por diferença de pesagens no tempo estabelecido até massa constante final. Inicialmente pesou-se cerca de 2 gramas de amostra, observou-se o teor de humidade e colocou-se a secar na estufa de um dia para o outro, juntamente com a amostra armazenada em frascos. O procedimento repetiu-se, voltando-se a pesar cerca de 2 gramas de amostra, viu-se o teor de humidade e voltou-se a secar na estufa, com o intuito de secar o máximo possível a amostra, para futuras extrações.

3.1.2 Determinação das clorofilas *a* e *b*

A determinação das clorofilas *a* e *b*, foram realizadas com base no procedimento apresentado [5]:

1. Pesou-se 1 g de amostra;
2. Juntaram-se 50 mL de acetona com a amostra pesada, dentro de um *erlenmeyr*;
3. Colou-se o *erlenmeyr* sob maceração, durante 24 horas a 5,0 ± 0,5 ºC no escuro;
4. Centrifugou-se os extratos a 2000 rpm durante 5 minutos.

Leu-se o sobrenadante no espectrofotômetro (evolução Thermo de Nicolet, 300) em 662 nm para a clorofila *a* e 646 nm para a clorofila *b*.

3.2 Extração da Codium tomentosum

No decorrer deste trabalho utilizaram-se diversos métodos de extração, convencionais e não convencionais, para posterior caraterização.

3.2.1 Extração em Soxhlet

A obtenção do extrato da alga *Codium tomentosum* em Soxhlet, foi realizada, utilizando três solventes, nomeadamente, metanol (*Sigma Aldrich 99,8 %* - retificado), etanol (*Panreac* 99,5 %) e hexano (*Analar Normapur 99,3 %* - retificado).

Inicialmente, procedeu-se ao enchimento do cartucho de celulose com aproximadamente 8 g de amostra, utilizando 200 mL de solvente durante um período de 3 horas, na instalação apresentada na figura 7.

Após o procedimento inicial, o balão foi colocado num rota-vapor (BUCHI Rotavapor, R-205) e numa linha de vácuo, de forma a garantir a total evaporação do solvente, e posterior obtenção dos extratos, sendo que por diferença de massas é possível o cálculo dos rendimentos.

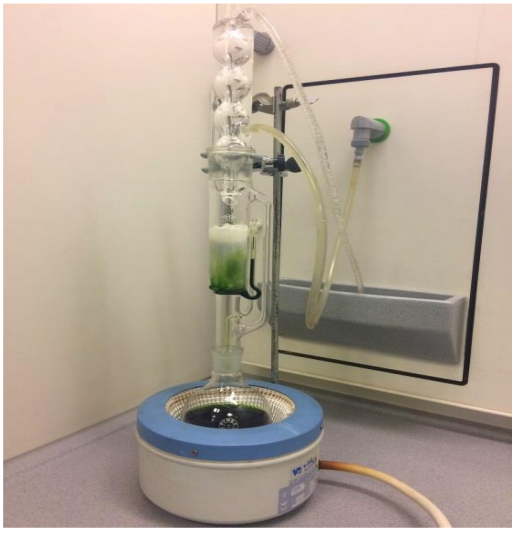

Figura 7 - Montagem laboratorial da extração em Soxhlet.

3.2.2 Extração Supercrítica com CO_2

Os ensaios de extração supercrítica foram realizados no equipamento, *Applied Separations Spe-ed SFE*, que se encontra representado através das figuras 8 e 9, abaixo apresentadas.

Figura 8 - Equipamento utilizado para extração supercrítica com CO_2.

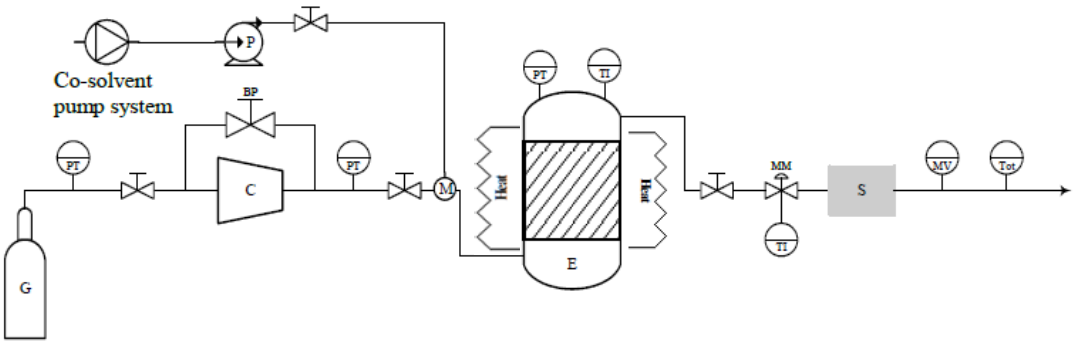

Figura 9 - Esquema representativo do equipamento de Extração Supercrítica (Legenda: C – Compressor; P – Bomba; E – Extrator; S – Separador; BP – Regulador de Pressão; PT – Manómetro; TI – indicador de temperatura; MM – Válvula Micrométrica; MV – Caudalímetro; Tot – Totalizador) [71].

Inicialmente foram ligados o equipamento e os compressores e foram impostas as condições de temperatura pretendidas.

O funcionamento do sistema ocorre em três fases distintas:

- 1ª Fase – Compressão do gás (CO_2)

Nesta fase inicial, existe compressão do CO_2, através de um compressor auxiliar (Jun-Air, modelo OF302), forçando um aumento de pressão até 7 bares, aumento este que ativa o compressor (C) da Applied Separations, modelo Spe-ed SFE. Este compressor só funciona com valores de pressão acima de 7 bar e tem como função, comprimir o gás até à pressão de funcionamento desejada.

- 2ª Fase – Aquecimento

O CO_2 comprimido anteriormente segue para o extrator (E) (Applied Separations, modelo Spe-ed SFE), de modo a ser aquecido até ao valor de temperatura pretendida. A amostra em estudo foi previamente introduzida na célula, que se encontra no interior do forno.

- 3ª Fase – Extração Supercrítica

Após a estabilização das condições críticas de funcionamento (pressão e temperatura), o CO_2 percorre a célula que contém a amostra, solubilizando-a, e sendo esta recolhida pela válvula micrométrica (MM). A saída e recolha da amostra é realizada através do separador (S), que atua como filtro (Applied Separations, modelo Spe-ed SFE phase extraction. Posteriormente o CO_2 é conduzido para o caudalímetro (MV) e para o medidor de gás (Alicat Scientific, modelo M-5SLPM-D), onde é realizada a medição do caudal instantâneo e volume total de CO_2.

Inicialmente colocou-se a lã de propileno numa das extremidades do vaso extrator, encheu-se o vaso com cerca de 8 gramas da amostra em estudo seca e de seguida colocou-se novamente lã de propileno na outra extremidade. A lã de propileno tem como função impedir o arrastamento de partículas sólidas para o sistema durante o ensaio e, por fim, o vaso foi introduzido no interior do forno.

Posteriormente, deixou-se estabilizar o sistema durante 30 minutos, de forma a garantir a estabilidade térmica do mesmo. Iniciou-se o ensaio com a abertura da válvula micrométrica (MM), variando o caudal de CO_2 e foram realizados distintos ensaios, onde se registou o volume total de CO_2, o tempo decorrido de cada ensaio e a massa recolhida. Os extratos foram recolhidos num tubo em U, à pressão atmosférica e a uma temperatura controlada através de um banho de gelo.

3.2.3 Extração Supercrítica com CO_2 e etanol

O procedimento deste método é similar ao método anteriormente descrito, mas para além do gás, utiliza-se também um solvente, nomeadamente etanol. Este, designado por co-solvente, é bombeado por uma bomba, P, tal como demonstra a figura 8, circulando o co-solvente da bomba para o extrator.

A recolha da amostra é feita através da passagem de um tubo em U, para um balão, sendo esta posteriormente seca num rota-vapor e numa linha de vácuo.

3.2.4 Extração líquida pressurizada (PLE)

Este método é considerado uma junção dos dois métodos descritos acima, sendo que neste, foi utilizado o equipamento do método de extração supercrítica, mas utilizando exclusivamente uma bomba, P, para introduzir uma quantidade de solvente pressurizado no sistema, tendo-se utilizado cerca de 4 gramas de amostra.

Assim, é utilizada a bomba de etanol, sendo nesta, onde se impõe as condições operatórias, neste caso, caudal e pressão, sendo a última controlada através da válvula milimétrica. Em cada ensaio, recolheu-se o volume de extrato num tubo em U, onde a temperatura é controlada através de um banho de gelo e, posteriormente este foi recolhido para um balão. De modo a ser obtido extrato seco, cada balão foi levado ao rota-vapor e linha de vácuo, para posterior caraterização dos extratos obtidos.

3.2.5 Extração por micro-ondas

Os estudos foram divididos em duas partes, considerando que após os primeiros ensaios com as diferentes técnicas se optou, pela tecnologia do MAE (figura 10) para aprofundar a influência da mesma, no rendimento dos extratos e sua caracterização.

Assim, na primeira parte realizou-se ensaios preliminares para comparar e avaliar a técnica com as outras anteriormente testadas. Posteriormente, e após a decisão de se utilizar o MAE como técnica experimental de preferência, utilizou-se a ferramenta de desenho experimental (DOE), Design Expert 10, para otimização do processo.

Na primeira parte dos ensaios, pesou-se aproximadamente entre 2 a 4 gramas da amostra em estudo. Utilizou-se solventes como, metanol, etanol e uma mistura etanol água, fazendo variar a razão etanol-água. Realizaram-se diversos ensaios preliminares,

com um volume de 20 mL de solvente, uma potência de 100 Watt, uma temperatura de 80ºC e um tempo de 3 minutos.

Após cada ensaio, fez-se uma filtração da mistura amostra-solvente saída do micro-ondas para um balão. Para finalizar o balão, foi seco num rota-vapor e posterior linha de vácuo, de modo a se obter extrato seco, para posterior caraterização e determinação do rendimento [72].

Na segunda parte de desenvolvimento do processo, utilizou-se a ferramenta de desenho experimental (DOE) designado Design Expert 10, em duas etapas de otimização. Estes ensaios e tabelas são descritos em detalhe no capítulo 4.7, de uma forma mais global.

Figura 10 - Micro-ondas utilizado para extração.

3.3 Quantificação e Caracterização dos extratos da *Codium tomentosum*

3.3.1 Método do Radical Livre DPPH

A determinação da atividade antioxidante, foi efetuada com base no descrito na literatura, após algumas alterações, recorrendo ao leitor de microplaca (BioTek Synergy 2) [73].

Preparou-se uma solução de DPPH (Sigma Aldrich) em 50 mL de metanol. Em seguida, pipetaram-se 30 µL de cada amostra, juntamente com 270 µL de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil, 4mM), para uma microplaca NUNC-96. O branco foi constituído por 300 µL de solvente, nomeadamente metanol e o controle negativo, constituído por 30 µL de cada amostra, juntamente com 270 µL de metanol. A mistura reacional foi incubada sem exposição à luz durante 40 min, 1 h e 2h, à temperatura ambiente, tendo sido lida a absorvância posteriormente a 515 nm.

Foi utilizada solução de trolox (Sigma Aldrich 98 %) para uma gama de concentrações entre 20 e 120 µg/mL, como antioxidante de referência para a realização da curva de calibração e análise de sensibilidade do método.

3.3.2 Método radical Catião $ABTS^+$

Preparou-se uma solução de persulfato de potássio ($K_2O_8S_2$, Acros Organics 99 %) 2,5 mM em 25 mL de água destilada. Posteriormente, a partir da solução preparada inicialmente, preparou-se uma nova solução de 10 mL de ABTS 2,2'-azino-bis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfónico) 7,4 mM. A solução preparada foi mantida à temperatura ambiente, sem exposição à luz, durante 16 horas, com intuito de obter o radical catião $ABTS^+$ e em seguida procedeu-se à análise do poder antioxidante sendo esta efetuada em microplaca. Após incubação da solução de ABTS, procederam-se a várias diluições em metanol, de forma a obter uma absorvância (lida a 734 nm) igual à unidade [53].

No ensaio, pipetaram-se 20 µL de cada amostra de diferentes concentrações, para cada poço. Posteriormente pipetaram-se 280 µL da solução de ABTS, cuja diluição anteriormente efetuada foi semelhante à unidade e procedeu-se à sua leitura, a 734 nm. É de salientar que foram também efetuadas medidas ao branco e ao controlo, sendo o

primeiro constituído por 300 µL de metanol, e o segundo por 280 µL de ABTS e 20 µL de metanol.

À semelhança do método de DPPH, foi utilizada uma solução de Trolox (para uma gama de concentrações de 15 a 180 µg/mL), como antioxidante de referência para a realização da curva de calibração e análise de sensibilidade deste método. A realização do método descrito permitiu a determinação do IC_{50}, que foi expresso em concentração (mg/mL).

3.3.3 Método do Poder de Redução do ião Fe^{3+}

O poder de redução do Ferro das amostras, foi determinado com base na literatura, após algumas alterações, em microplaca. As amostras com diversas concentrações foram dissolvidas em metanol e, recorreu-se ao seguinte procedimento: [74]

1. Pipetaram-se 110 µL de branco, constituído apenas por solvente, nomeadamente metanol;
2. Pipetaram-se 25 µL de cada amostra, efetuando-se quadruplicados de cada amostra;
3. Adicionaram-se 25 µL de tampão fosfato (200mM e pH=6,6);
4. Pipetaram-se 25 µL de ferrocianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$, Merck, 1 % (W/V);
5. Deixou-se em repouso na estufa a 50 ºC, durante 20 minutos;
6. Colocaram-se 25 µL de ácido tricloroacético 10 % (w/v);
7. Adicionaram-se 10 µL de solução de cloreto de ferro (III), 0,1 % (w/v);
8. Efetuou-se a leitura a 690 nm.

O solvente utilizado como branco, diversificava consoante o método de extração utilizado. Inicialmente utilizou-se metanol, posteriormente, etanol ou uma mistura etanol-água.

É de salientar, que foram efetuadas medidas ao controlo, que é constituído pelo solvente, metanol, e os restantes solventes mencionados anteriormente no decorrer do procedimento. Foi utilizada uma solução de trolox (para uma gama de concentrações de

20 a 200 µg/mL) para a realização da curva de calibração, desta forma, os resultados foram expressos em micromoles de TEAC por grama de extrato.

3.3.4 Determinação do teor de polifenóis

A determinação do teor de polifenóis foi feita através do método de Folin-Ciocalteu, após algumas alterações. É de salientar que previamente foi preparada uma solução de Folin 2N, diluída em água destilada, 1:10 v/v, e posteriormente recorreu-se ao seguinte procedimento [73], [75]:

1. Pipetaram-se 300 µL de branco, constituído apenas por metanol, ou etanol, ou etanol-água
2. Pipetaram-se 30 µL de cada amostra, efetuando-se quadruplicados de cada concentração de amostra;
3. Colocaram-se 150 µL de reagente Folin-Ciocalteu;
4. Deixou-se em repouso durante 4 minutos;
5. Adicionaram-se 120 µL de solução de carbonato de sódio (previamente preparado, 75 g/L);
6. Colocou-se na estufa a 40 ºC, durante 30 minutos;
7. Efetuou-se a leitura a 765 nm.

Utilizou-se uma solução de ácido gálico (Sigma Aldrich, 97,5-102,5%) para a realização da curva de calibração (entre 0 e 55 µg), desta forma, os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico.

3.3.5 Determinação do teor em flavonoides

Através do método de cloreto de alumínio, após este sofrer algumas alterações, determinou-se o teor de flavonoides, de acordo com o procedimento seguinte [75]:

1. Pipetaram-se 240 µL de branco, constituído apenas por solvente, nomeadamente metanol, etanol ou etanol-água;
2. Pipetaram-se 25 µL de cada amostra constituída por diferentes concentrações. Efetuou-se triplicados de cada concentração.
3. Colocaram-se 100 µL de água destilada;

4. Adicionaram-se 7,5 µL de uma solução de $NaNO_2$ (preparado previamente 5 % w/V);
5. Deixar em repouso durante 5 minutos à temperatura ambiente;
6. Colocaram-se 7,5 µL de solução de $AlCl_3$ (Merck-Schuchardt 97 %), 10 % em etanol (m/v).
7. Deixar em repouso durante 5 minutos à temperatura ambiente;
8. Adicionaram-se 100 µL de NaOH;
9. Deixar em repouso durante 10 minutos à temperatura ambiente;
10. Efetuar a leitura a 415 nm.

Utilizou-se uma solução de catequina, para uma gama de concentrações entre 0 e 300 µg/mL, para a realização da curva de calibração. Sendo assim, os resultados foram expressos em equivalentes de catequina.

3.3.6 Determinação do Índice de escurecimento

Triturou-se a maçã e colocou-se duas a três fatias da mesma em cada solução previamente preparada. Estas foram pulverizadas com as soluções preparadas relativas aos extratos da *Codium Tomentosum.* Foram registadas as alterações de cor com recurso a um colorímetro (Konica Minolta CR-400), efetuando-se 10 leituras para cada amostra, após 15 e 30 min. É de salientar que também se efetuou medidas ao controlo, referente às fatias de maçã mergulhadas em uma solução de água [76].

Para se conseguir avaliar todos os parâmetros colorimétricos das amostras, recorreu-se ao sistema CIELAB, sendo registados os valores de a*, b* e L*, valores estes utilizados posteriormente no cálculo do índice de escurecimento (BI), através das seguintes equações: [77], [78].

$$\mathrm{BI} = \frac{(x - 0{,}31)}{0{,}172} \times 100 \qquad \textbf{Eq. 2}$$

$$x = \frac{(a + 1{,}75 \times L)}{(5{,}645 \times L + a - 3{,}012 \times b)} \qquad \textbf{Eq. 3}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da amostra

Foi efetuada a caracterização da alga recorrendo à sua análise elementar, nomeadamente na composição em termos de azoto, N, carbono,C, hidrogénio,H, oxigénio, O, e enxofre, S.

Esta caracterização é apresentada na Tabela 2 e refere-se á amostra inicial analisada em duplicado, A e B, a um extrato obtido com etanol em micro-ondas, para se ter uma ideia em termos de composição elementar da variação dos mesmo na matriz antes de uma extração e após a mesma. Verifica-se, no resíduo (A_0), um decréscimo no azoto (15,4%), carbono (13%) e hidrogénio (11,5%) total da amostra após a extração indicando o tipo de compostos preferencialmente extraídos. Por outro lado, compostos oxigenados são menos extraídos pois no mesmo resíduo, existe um incremento de 6,1% em oxigénio. Finalmente, nos compostos contendo enxofre não se deteta variação significativa, encontrando-se, no entanto, os seus valores abaixo do limite de quantificação do método.

Tabela 2 – Caracterização da *Codium tomentosum*.

		Rendimento	**% (de M_{SCG}, R ou E)**				
Designação	**Amostras**	**% de M**	**N**	**C**	**H**	**O**	**S**
A	*Codium tomentosum*	100, 0	2,93	24,15	3,81	67,61	< 2
B	*Codium tomentosum*	100, 0	3, 0	24,82	3,90	66,78	< 2
A_0	Resíduo Etanol (micro-ondas)	86,99	2,48	21,30	3,41	71,31	< 2

4.2 Humidade da *Codium tomentosum*

O teor de humidade da amostra em estudo encontra-se na seguinte tabela, onde se verifica a massa de amostra pesada em três dias consecutivos e, o respetivo teor de humidade.

Tabela 3 - Percentagem de humidade da *Codium tomentosum.*

	1ºdia	2ºdia	3ºdia
$m_{inicial}$ (g)	2,13	2,20	2,29
m_{final} (g)	1,90	2,11	2,24
% humidade	10,99	4,23	2,31

Verifica-se que a percentagem de humidade reduziu significativamente, o que é importante para os métodos de extração a utilizar e para posterior as extrações não interferindo, no processo, devido ao fato de a amostra não ter sido corretamente seca.

4.3 Determinação das clorofilas *a* e *b*

As concentrações das clorofilas *a* e *b*, são determinadas através das seguintes expressões, onde as concentrações do pigmento são expressas em solução de extrato µg/mL [79].

$$C_a(\mu g/mL) = 11{,}24\ A_{661{,}6} - 2{,}04\ A_{644{,}8} \qquad \textbf{Eq. 4}$$

$$C_B(\mu g/mL) = 20{,}13\ A_{644{,}8} - 4{,}19\ A_{661{,}6} \qquad \textbf{Eq. 5}$$

Com base nas absorvâncias lidas e nas expressões supra indicadas, determinou-se as concentrações para cada clorofila e as suas respetivas médias, resultados estes apresentados na tabela seguinte.

Tabela 4 - Resultados referentes aos ensaios para a clorofila *a* e *b* na matriz inicial.

		λ (nm)	A (m^2mol^{-1})	C (µg/mL)	Média (µg/mg)
Clorofila a	**Ensaio 1**	662	0,823	8,381	
	Ensaio 2	662	0,856	8,712	426,9 ± 9,8
Clorofila b	**Ensaio 1**	646	0,426	5,127	
	Ensaio 2	646	0,446	5,391	262,7 ± 49,1

Verifica-se que existe uma presença maior de clorofila *a*, do que *b*. facto este o esperado, pois a clorofila *a*, existe em maior abundância do que a *b*, devido a ser o principal componente da fotossíntese.

Comparando os resultados obtidos, a um estudo também utilizando a *Codium Tomentosum*, mas aplicando 50 mL de acetona por cada grama, onde foram utilizadas equações semelhantes às supra indicadas, conclui-se que a quantidade de clorofila *b* é em geral, aproximadamente metade que a quantidade de clorofila *a* [80].

4.4 Obtenção do extrato da Codium tomentosum através dos métodos convencionais

4.4.1 Extração em Soxhlet

A obtenção dos extratos da amostra em estudo, foi realizada através do método de extração em Soxhlet, utilizando três diferentes solventes, hexano, etanol e metanol. Os rendimentos obtidos estão apresentados na tabela seguinte.

Tabela 5 – Resultados obtidos da Extração em Soxhlet.

Solventes	Massa Extraída (g)	Rendimento (%)
Hexano	0,088	1,10
Etanol	1,085	13,53
Metanol	3,425	42,62

Através da tabela 5, verifica-se que a extração é bastante mais eficiente utilizando o metanol como solvente, aspeto que também se verifica na extração realizada em micro-ondas quando se utiliza o metanol como solvente. Contudo, e atendendo ao objetivo do trabalho da procura de tecnologias mais verdes para a obtenção de extratos, este solvente foi só utilizado pontualmente, para comparação.

4.5 Obtenção do extrato da Codium tomentosum através dos métodos não convencionais

4.5.1 Extração Supercrítica com CO_2

Efetuaram-se diversos ensaios, medindo-se a quantidade de massa extraída e o volume de CO_2 gasto em cada ensaio, de modo a ser possível determinar-se o rendimento da extração. Este foi calculado através da razão percentual entre a massa de extrato obtida no final da extração e a massa de matriz que se encontrava inicialmente no vaso de extração utilizado, utilizando-se a seguinte fórmula,

$$\% = \frac{massa\ final}{massa\ inicial} \times 100 \qquad \textbf{Eq. 6}$$

Os valores cumulativos lidos, e determinados apresentam-se nas tabelas seguintes, sendo que os valores para cada ensaio estão apresentados no Apêndice A.

Tabela 6 –Resultados cumulativos obtidos na Extração Supercrítica com CO_2 a 400 bar e 60ºC.

Ensaios	Tempo (min)	Volume CO_2 (L)	Massa extraída (g)	Rendimento (%)
1	18,00	15,18	0,074	0,76
2	33,00	28,96	0,096	0,98
3	55,90	49,59	0,108	1,11
4	95,90	84,84	0,121	1,25
5	155,9	141,1	0,141	1,45
6	215,9	194,9	0,161	1,66
7	275,9	256,9	0,183	1,89

Tabela 7 –Resultados cumulativos obtidos na Extração Supercrítica com CO_2, a 550 bar e 60ºC.

Ensaios	Tempo (min)	Volume CO_2 (L)	Massa extraída (g)	Rendimento (%)
1	23,18	15,91	0,029	0,19
2	46,43	36,43	0,033	0,34
3	81,51	66,95	0,043	0,44
4	126,7	106,8	0,046	0,48
5	186,9	164,4	0,059	0,61
6	247,1	220,8	0,060	0,62

Os valores acumulados finais para uma pressão mais elevada são menores quando comparados com a pressão de 400 bar e mesma temperatura, o que em termos de aumento da densidade do CO_2 com a pressão, é usual ter um comportamento contrário. Os rendimentos obtidos da extração, foram reduzidos, quando comparados com os solventes orgânicos. Procedeu-se ainda a um tratamento prévio de uma amostra em estudo num micro-ondas, para posteriormente ser inserida na célula da extração, obtendo-se um rendimento igualmente baixo, de 0,4 %. Assim, que não há qualquer vantagem, neste tratamento prévio da matriz, pois, o rendimento final apresenta-se bastante similar ao da extração supercrítica com CO_2, sem pré-tratamento com o micro-ondas.

Foi também realizada duas extrações ambas com as mesmas condições, onde se utilizou um co-solvente, nomeadamente etanol.

Tabela 8 –Resultados cumulativos obtidos na Extração Supercrítica com CO_2, a 400 bar, 40ºC e 10 % de etanol.

Ensaios	Tempo (min)	Volume CO_2 (L)	Massa extraída (g)	Rendimento (%)
1	18,87	12,44	0,064	0,78
2	41,59	27,67	0,111	1,37
3	71,46	48,13	0,122	1,50
4	101,3	67,38	0,127	1,56

Tabela 9 - Resultados cumulativos obtidos na Extração Supercrítica com CO_2, a 400 bar, 40ºC e 10 % de etanol.

Ensaios	Tempo (min)	Volume CO_2 (L)	Massa extraída (g)	Rendimento (%)
1	22,88	3,462	0,013	0,17
2	42,96	10,55	0,032	0,40
3	64,26	17,81	0,047	0,61
4	88,21	26,20	0,082	1,05
5	114,6	34,39	0,102	1,31

Não existem diferenças significativas ao utilizar-se um co-solvente, apesar que em alguns estudos realizados, verifica-se que a adição de etanol ou metanol conduz a um aumento de polaridade do dióxido de carbono, que por sua vez possibilita uma melhor extração dos constituintes mais polares presentes na matriz da planta. [35]

Verifica-se que os rendimentos obtidos apresentam valores bastante reduzidos, pelo que o método com os fluidos supercríticos, foi abandonado uma vez que em termos de rendimento, não será o mais indicado para se obter quantidade de extratos significativo da macroalga *Codium Tomentosum.*

4.5.2 Extração liquida pressurizada (PLE)

Efetuou-se somente uma única vez esta técnica, onde foram realizados 5 ensaios consecutivos na mesma matriz, medindo-se o volume do solvente, nomeadamente etanol sendo a quantidade de massa extraída determinada após secagem no rota-vapor e na linha de vácuo. A tabela seguinte apresenta os valores cumulativos determinados do rendimento, através da razão percentual entre massa de extrato obtida no final da extração e a massa de matriz que se encontrava inicialmente no vaso de extração utilizado, tendo sido calculada através da expressão 6, supra indicada.

Tabela 10 - Medições e resultados cumulativos obtidos no PLE a 200 bar, 40ºC e 1L/min.

Ensaios	Volume solvente (mL)	Massa extraída (g)	Rendimento (%)
1	9,5	0,081	2,01
2	18	0,163	4,07
3	28	0,242	6,06
4	39	0,301	7,53
5	53	0,350	8,75

Esta tecnologia, apesar de se apresentar mais promissora que as duas anteriores, uma vez que apresenta rendimentos muito superiores à extração supercrítica com CO_2 e valores semelhantes que o Soxhlet, com menor quantidade de solvente, viria a ser preterida para os estudos com micro-ondas após os ensaios prévios realizados, utilizando o DOE aplicado ao MAE.

4.5.3 Extração em micro-ondas

Inicialmente realizaram-se vários ensaios em micro-ondas, a uma temperatura de 80ºC, um tempo de 3 minutos, uma potência de 100 Watt, variando a razão de etanol/água no solvente e a quantidade do mesmo, perfazendo um volume total de 20 mL.

Tabela 11 - Massas e rendimentos obtidos na extração por micro-ondas.

Amostra	Razão Solv/Sol(mL/g)	Razão etanol/água (%)	Massa Extraída (g)	Rendimento (%)
A	5	99	0,532	13,02
B	10	99	0,247	12,14
C	5	50	0,939	46,05
D	9	90	0,703	34,50
E	9	95	0,573	20,59
F	10	97	0,301	15,01

Foram efetuados dois ensaios utilizando etanol puro, (A e B) onde a massa extraída no primeiro foi de 0,532 g, pois este foi o único ensaio onde se utilizou 4 gramas inicialmente, tendo sido nos outros ensaios, sempre utilizadas aproximadamente 2 gramas.

Realizou-se outro ensaio, utilizando-se metanol como solvente, sendo a razão solvente/soluto de 10 mL/g, onde se extraiu 0,573 g correspondendo a um rendimento de 27,64 %.

Quando se utiliza um único solvente e de acordo como se verifica na extração em Soxhlet, o rendimento é superior com o metanol, apesar da extração em Soxhlet demorar entre 3-4 horas enquanto que a do MAE demora cerca de 3 minutos e a massa inicial de alga a ser utilizada ser muito superior no Soxhlet, o rendimento é bastante semelhante entre os dois métodos. Este fato pode dever-se à tecnologia do micro-ondas e sua atuação, nomeadamente a forma de calor transmitida que resulta da agitação interna das moléculas do composto que constituem a matriz, levando a um aquecimento interno de dentro da matriz para fora, sendo que as temperaturas finais se atinjam mais rapidamente.

4.6 Quantificação e Caraterização da Codium tomentosum

4.6.1 Determinação do poder antioxidante pelo método do DPPH

Realizou-se curvas de calibração com o trolox, de modo a ser possível, comparar-se os resultados obtidos com estes antioxidantes de referência. Curvas estas que se encontram no anexo C, juntamente com os parâmetros obtidos na realização das mesmas.

Dos extratos obtidos por micro-ondas foram preparadas soluções com o extrato e o solvente utilizado no método de DPPH, nomeadamente metanol. É de salientar que o extrato designado como A, é o ensaio em micro-ondas com uma massa inicial de amostra de 4 gramas, enquanto que o B, é referente ao ensaio em micro-ondas com uma massa inicial de 2 gramas, onde se utilizou 20 mL de solvente, nomeadamente etanol. Foram realizados vários ensaios, a diferentes concentrações, apresentados nas tabelas 12 e 13 para se conseguir obter resultados, de forma a existir uma coerência entre os mesmo e sequência de forma a encontrar-se o IC_{50} para as amostras, ou um

valor que se apresentasse na curva de calibração. Essas concentrações foram feitas com base no extrato

Tabela 12 - Percentagem de inibição e equivalente de trolox obtidos para diferentes concentrações, referente à análise ao extrato A.

Designação	Concentração (µg/mL)	Percentagem de inibição (%)	Equivalente de trolox (µg/mg $_{extrato}$)
A1	22,79	-15,28	0
A2	33,90	-10,38	0
A3	44,84	-15,43	0
A4	227,87	8,25	98,03 ± 4,75
A5	339,02	3,19	46,76 ± 0,35
A6	448,39	36,37	130,2 ± 29,07
A7	695	10,51	36,31 ± 4,37
A8	1390	-2,60	6,076 ± 0,438
A9	4612,5	-25,23	0
A10	6150	-15,75	0
A11	7380	-8,51	0,118 ± 0,002
A12	9225	-12,06	0
A13	12300	-8,37	0,085 ± 0,009
A14	14760	4,25	1,166 ± 0,044
A15	36900	-52,80	0

Tabela 13 - Percentagem de inibição e equivalente de trolox obtidos para diferentes concentrações, referente à análise ao extrato B.

Designação	Concentração (µg/mL)	Percentagem de inibição (%)	Equivalente de trolox (µg/mg $_{extrato}$)
B1	2512, 5	-7,90	0,656 ± 0,001
B2	3350	-8,66	0,201 ± 0,004
B3	4020	4,79	4,454 ± 0,146
B4	5025	8,64	1,719 ± 0,011
B5	6700	0,74	1,898 ± 0,064
B6	10050	26,53	4,553 ± 0,107
B7	20100	2,09	0,719 ± 0,021

Como se pode verificar nas tabelas anteriores, realizaram-se diversas soluções com diferentes concentrações, para se conseguir alcançar valores concordantes entre si, não tendo sido alcançado esse objetivo, No extrato A, verifica-se que para uma concentração de 448,39 µg/mL existe uma significativa percentagem de inibição, mas se aumentarmos ou diminuirmos de maneira pouco significativa a concentração a percentagem de inibição diminui, não se conseguindo chegar a um valor de concentração razoável para se conseguir caracterizar o extrato através deste método. Verifica-se o mesmo para o extrato B, a percentagem de inibição é positiva para uma concentração de 4020 µg/mL, contudo com o aumento da concentração, o valor da percentagem de inibição tanto aumenta como diminui, o que torna os valores não concordantes entre si.

Posteriormente realizaram-se mais ensaios para o método em questão, com extratos obtidos nos diversos métodos de extração em estudo e com diferentes concentrações, resultados estes apresentados na tabela seguinte:

Tabela 14 - Percentagem de inibição obtido para diferentes concentrações, para os diferentes métodos de extração utilizados.

Método	Concentração (µg/mL)	Percentagem de inibição (%)	Equivalente de trolox (µg/mg $_{extrato}$)
C - MAE (50% EtOH e 50% H_2O)	12700	-13,02	0
D - MAE (90% EtOH e 10% H_2O)	14900	-7,59	0,138 ± 0,013
E - MAE (95% EtOH e 5% H_2O)	12200	-4,41	0,502 ± 0,010
B - MAE (99% EtOH)	9700	-17,83	0
Soxhlet com metanol	10200	7,63	2,112 ± 0,021
Soxhlet com etanol	11100	8,73	2,068 ± 0,046
ESC_550:60	2001	-2,81	4,077 ± 0,070
ESC_550:60	2532	1,02	5,166 ± 0,071
ESC_550:60	11500	-1,97	0,804 ± 0,015
ESC_550:60	24100	11,49	1,099 ± 0,061
ESC_10% EtOH_400:40	980	1,69	14,22 ± 0,36
ESC_10% EtOH_400:40	1005	2,57	14,99 ± 0,37
ESC_10% EtOH_400:40	4900	-4,60	1,200 ± 0,037
ESC_10% EtOH_400:40	15000	-3,22	0,510 ± 0,021

É de salientar, que as absorvâncias para cada concentração, foram lidas ao fim de 40 min, 1h e 2h, sendo apresentados na primeira tabela os resultados ao fim de 2h, e na segunda, os resultados ao fim de 1h. Apesar das leituras a diferentes tempos, as absorvâncias não apresentaram diferenças significativas e, apesar da utilização de diferentes concentrações, não se consegue chegar a resultados concordantes entre si, ou mais importante com significado, concluindo-se que este método não é aplicável à amostra em estudo, não sendo possível obtendo valores coerentes.

4.6.2 Determinação do poder antioxidante pelo método do ABTS

Tal como o método anterior, o antioxidante de referência utilizado para este método, foi o trolox, onde a sua curva de calibração e parâmetros se encontram em anexo.

Determinou-se a percentagem de inibição com diferentes concentrações, dos extratos obtidos inicialmente em micro-ondas utilizando etanol como solvente e onde foram utilizadas inicialmente 4 gramas, designado extrato A e a partir deste preparou-se várias soluções a diferentes concentrações apresentados na tabela seguinte:

Tabela 15 - Percentagem de inibição obtido para diferentes concentrações, referente à análise ao extrato A.

Designação	Concentração (µg/mL)	Percentagem de inibição (%)	Equivalente de trolox (µg/mg $_{extrato}$)
A4	227,9	6,17	27,87 ± 0,44
A5	339,0	1,30	15,47 ± 0,32
A5	448,4	4,05	39,82 ± 0,76
A16	92,67	-0,35	27,87 ± 0,71
A17	139	1,19	15,47 ± 0,20

Como seria de esperar, pois este método é relativamente semelhante ao DPPH, os resultados obtidos não são concordantes entre si. Concluindo-se tal como o método anterior, que este método não é aplicável à amostra em estudo, para a sua caraterização.

4.6.3 Determinação do poder antioxidante pelo método a redução do Ferro

O poder antioxidante pelo método da redução do ferro, foi testado utilizando como antioxidante de referência, o trolox, tendo sido realizada uma curva de calibração, apresentada em anexo.

Determinou-se o poder de redução do ferro, nos extratos obtidos através da extração em micro-ondas, utilizando etanol como solvente, tendo sido obtidos, como já referi, o extrato A referente a uma massa inicial colocada no micro-ondas de 4 gramas e extrato B, com massa inicial de 2 gramas. Para tal, prepararam-se soluções a partir do extrato obtido, cujas concentrações e poder do ferro se encontram na tabela abaixo representada.

Tabela 16 - Poder de redução do ferro referente aos extratos obtidos em micro-ondas.

Designação	Concentração (µg/mL)	Equivalente de trolox (µmol/g $_{extrato}$)
A18	6950	1,224 ± 0,059
A19	5273, 8	2,540 ± 0,238

4.6.4 Determinação do teor de Polifenóis

O teor de polifenóis foi quantificado, utilizando um composto de referência, nomeadamente ácido gálico, e efetuou-se a sua curva de calibração, estando esta apresentada juntamente com os seus respetivos parâmetros, em anexo.

Inicialmente determinou-se o teor de polifenóis em diversos ensaios, em extratos provenientes da extração supercrítica com CO_2, da extração por micro-ondas, por Soxhlet e em PLE, sendo estes resultados apresentados expressos em equivalentes de ácido gálico.

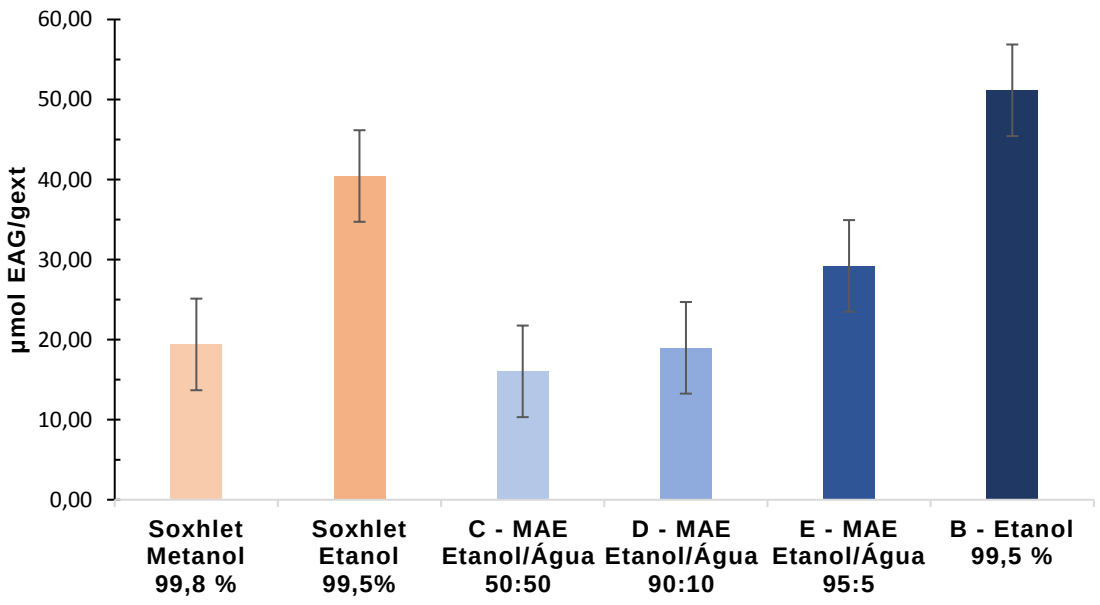

Figura 11 - Representação gráfica do teor de polifenóis dos extratos da *Codium tomentosum,* obtidos por Soxhlet e micro-ondas, a diferentes condições.

Relativamente à figura 11, conclui-se que a quantidade de polifenóis é maior quando se utiliza, no caso da extração por micro-ondas, etanol puro como solvente. Facto, que se assemelha à extração por Soxhlet, visto que se verifica uma maior quantidade de polifenóis, também quando é utilizado etanol como solvente.

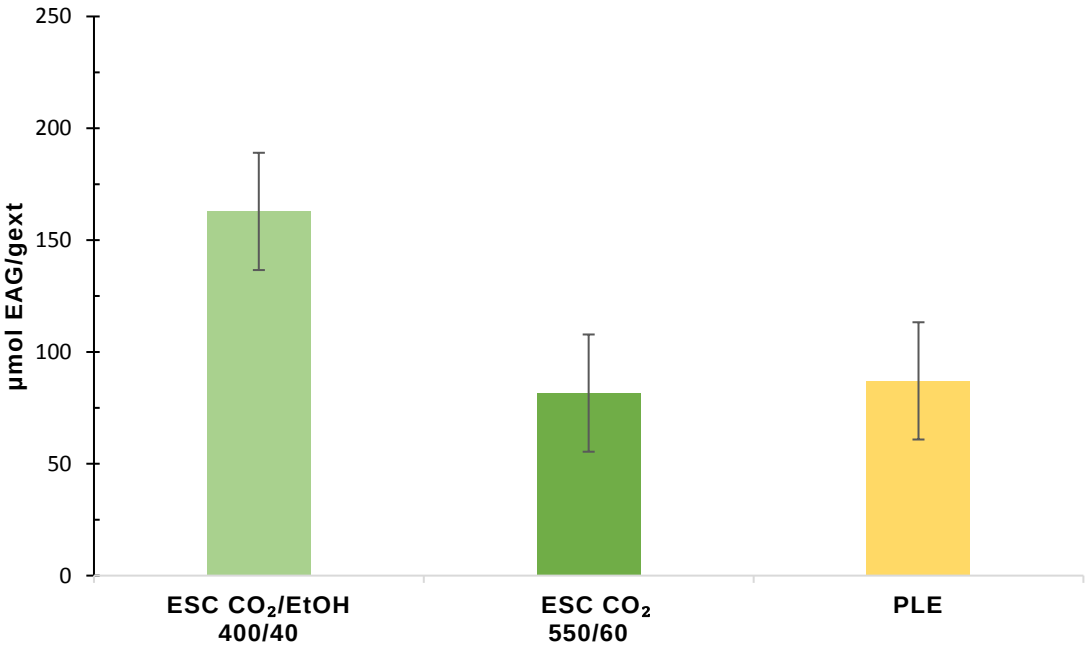

Figura 12 - Representação gráfica do teor de polifenóis dos extratos da *Codium tomentosum*, obtidos por Extração Supercrítica com CO_2, com CO_2/EtOH e PLE, a diferentes condições.

Na figura 12, verifica-se que para os extratos obtidos através da extração supercrítica com CO_2 e etanol, a 440 bar e 40ºC, apresentam uma maior quantidade de polifenóis, face aos extratos obtidos somente em extração supercrítica com CO_2 puro. Contudo, os rendimentos obtidos por esta técnica são bastante baixos, como se pode verificar nas Tabelas 6-9. Os extratos obtidos por PLE com etanol puro apresentam valores mais semelhantes aos do CO_2 supercrítico puro, sendo um pouco inferiores aos obtidos por MAE com etanol puro (Figura 11).

4.6.5 Determinação do teor de Flavonoides

Inicialmente efetuou-se a curva de calibração para a Catequina, sendo este o composto de referência, estando a curva e os respetivos parâmetros apresentada em anexo. Efetuaram-se vários ensaios preliminares, determinando-se o teor de flavonoides em vários extratos, provenientes dos diferentes métodos de extração, dando origem aos seguintes resultados, estando estes expressos em equivalentes de catequina.

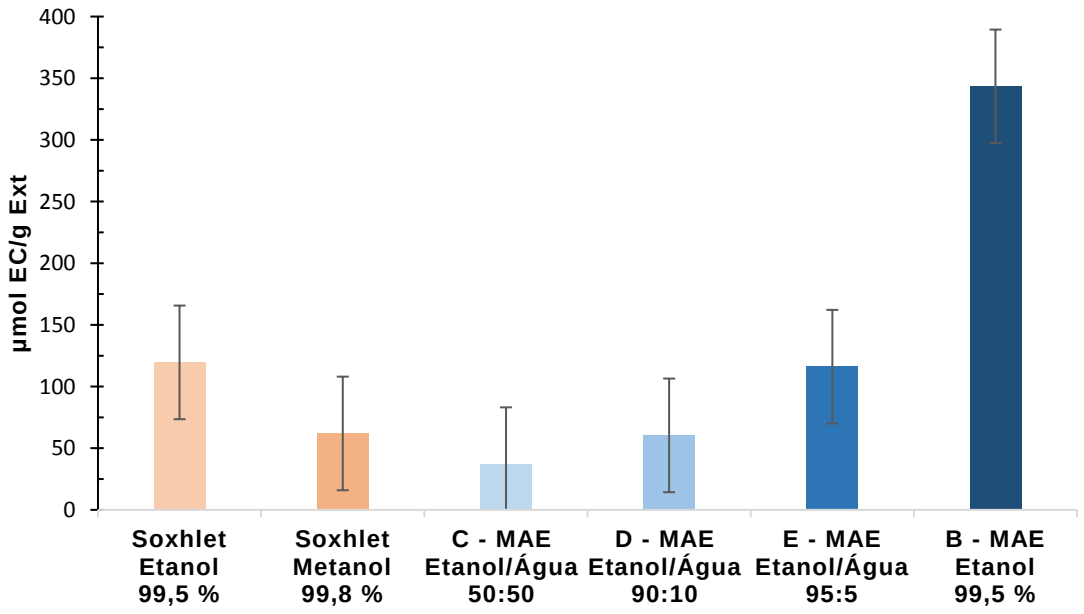

Figura 13 - Representação gráfica do teor de flavonoides dos extratos da *Codium tomentosum*, obtidos por Soxhlet e micro-ondas, a diferentes condições.

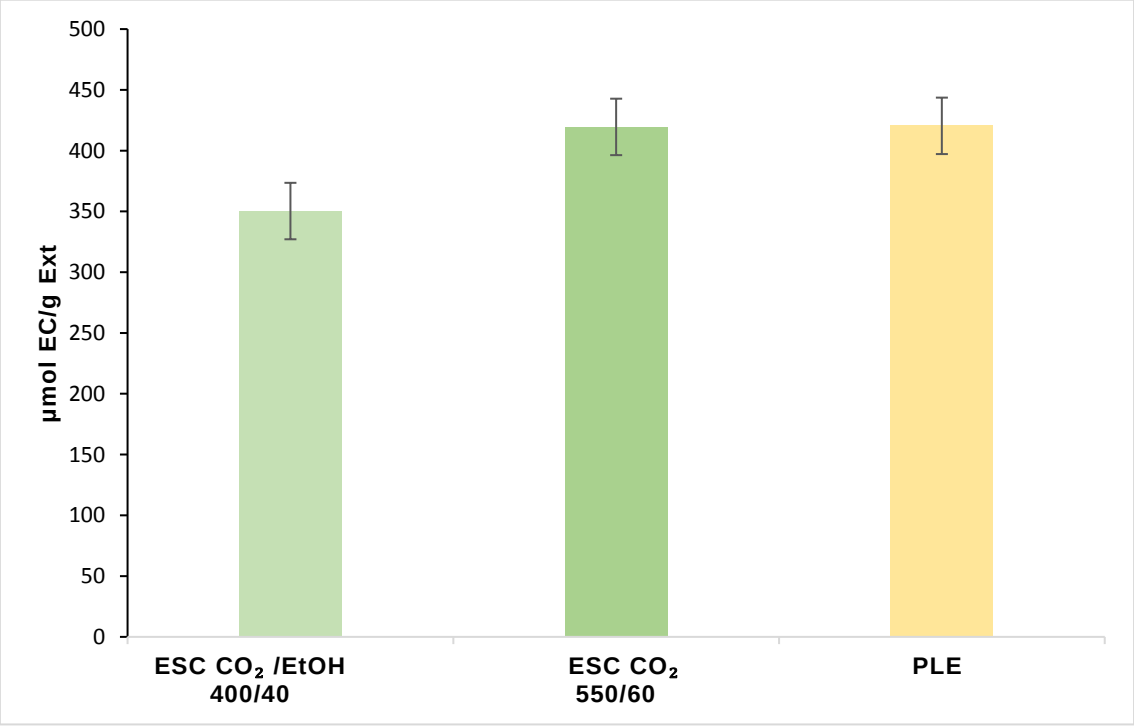

Figura 14 - Representação gráfica do teor de flavonoides dos extratos da *Codium tomentosum,* obtidos por Extração Supercrítica com CO_2, com CO_2/EtOH e PLE, a diferentes condições.

Através da figura 13 verifica-se uma maior quantidade de flavonoides, nos extratos obtidos em micro-ondas utilizando como solvente etanol puro, semelhante ao comportamento verificado na quantidade de polifenóis.

Também se observa uma elevada quantidade de flavonoides nos extratos obtidos em PLE, comportamento semelhante aos extratos obtidos em extração supercrítica com CO_2, face aos extratos obtidos por MAE com etanol puro.

4.7 Desenho Experimental (DOE)

Considerando o tempo de extração, rendimentos e quantidade de flavonoides optou-se por utilizar a extração por micro-ondas (MAE), combinada com o DOE de forma a sistematizar um estudo mais delineado e completo para uma das técnicas mais verdes previamente utilizada.

4.7.1 Delineamento fatorial fracionário (Fractional Factorial Design) – FFD

A Metodologia de Superfície de Resposta (Response Surface Methodology) RSM, explora as relações entre várias variáveis explicativas e uma ou mais variáveis de resposta. É uma combinação de técnicas matemáticas e estatísticas utilizadas para delinear e analisar problemas nos quais a resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis, nos quais a resposta deva alcançar um valor ótimo, caracterizando-se como uma metodologia prática, económica e de fácil implementação [81], [82].

O delineamento fatorial fracionário (Fractional Factorial Design) (FFD), é utilizado como método de escolha para determinar os efeitos mais significativos num processo, pois permite obter o modelo com os efeitos principais com um número mínimo de experimentos. Esta técnica tem sido aplicada aos diferentes métodos na literatura que incluem a extração assistida por micro-ondas (MAE) [73], [84], [86].

Considerando o método e extração, MAE, e o equipamento utilizado, escolheu-se quatro fatores que influenciam os resultados experimentais: a potência do micro-ondas **A: Potência (Watt)**; a razão solvente soluto, **B:Razão Solv/sol (mL/g)**; a razão dos dois solutos utilizados, nomeadamente etanol/água, **C:Razão EtOH/H_2O (%EtOH)** e finalmente o tempo de extração **D: Tempo (min)**.

Um FFD IV (2^{4-1}) foi efetuado com o auxílio do software estatístico Design Expert 10 (DX10) nesta primeira fase do trabalho experimental, com o objetivo de determinar os fatores mais significativos para o sistema. Utilizando o desenho fatorial de dois níveis é possível obter uma matriz experimental de 2x8 ensaios, num total de 16 ensaios. Na tabela 17 são resumidos os experimentos a serem considerados nesta primeira etapa. Sinais de adição e subtração representam níveis de fator no valor máximo e mínimo e 0 é o nível de meio valor e o ensaio nessa condição foi realizado com 2 repetições, de modo que o desvio experimental entre os valores possa ser determinado, dando um suporte estatístico mais robusto aos dados.

Tabela 17 - Delineamento fatorial fracionário (FFD), IV (2^{4-1}) utilizado na primeira fase do trabalho experimental em termos de fatores de codificação.

Ensaio	A: Potência (Watt)	B: Razão solvente/soluto (mL/g)	C: Razão EtOH/H_2O (%EtOH)	D: Tempo (min)
1	1.000	-1.000	-1.000	1.000
2	-1.000	1.000	1.000	-1.000
3	1.000	1.000	1.000	1.000
4	1.000	-1.000	1.000	-1.000
5	-1.000	1.000	1.000	-1.000
6	-1.000	1.000	-1.000	1.000
7	-1.000	1.000	-1.000	1.000
8	1.000	-1.000	1.000	-1.000
9	1.000	-1.000	-1.000	1.000
10	-1.000	-1.000	1.000	1.000
11	-1.000	-1.000	1.000	1.000
12	1.000	1.000	-1.000	-1.000
13	1.000	1.000	-1.000	-1.000
14	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000
15	1.000	1.000	1.000	1.000
16	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000

Transferindo este desenho experimental e definindo os nossos máximos e mínimos, de acordo com o que se pretendia e em termos das variáveis reais a utilizar é possível construir a tabela 18. A potência do micro-ondas foi escolhida entre 60-120 W, de acordo com ensaios prévios; a razão solvente soluto para dois valores em que um seria o dobro do outro; a razão solvente soluto utilizou-se entre 100 % de etanol (99 %) e 50/50 etanol-água, não se aumentando a maior % de água por uma questão prática de posterior secagem do extrato ser mais fácil e finalmente o tempo de extração dois valores em que um seria o dobro do outro, com valores previamente testados e sua influência.

Tabela 18 - Delineamento fatorial fracionário (FFD), IV (2^{4-1}) utilizado na primeira fase do trabalho experimental em termos de fatores reais de trabalho.

		Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4
Padrão	**Ensaios**	**A: Potência (Watt)**	**B: Razão solvente/soluto (mL/g)**	**C: Razão EtOH/H_2O (% EtOH)**	**D: Tempo (min)**
4	1	120	5	50	6
14	2	60	10	99	3
15	3	120	10	99	6
11	4	120	5	99	3
13	5	60	10	99	3
5	6	60	10	50	6
6	7	60	10	50	6
12	8	120	5	99	3
3	9	120	5	50	6
10	10	60	5	99	6
9	11	60	5	99	6
7	12	120	10	50	3
8	13	120	10	50	3
2	14	60	5	50	3
16	15	120	10	99	6
1	16	60	5	50	3

Neste FFD, foi considerado dois fatores de resposta: 1. O rendimento sempre importante num processo de extração; 2. A quantidade total de flavonoides. A escolha do 2º fator de resposta, deveu-se essencialmente aos testes de antioxidantes (DPPH e ABTS) apresentarem-se difíceis e inconsistentes, como é visível nos resultados apresentados anteriormente e os polifenóis totais exibiam menor variação entre as diferentes condições de extração, embora de uma forma mais consistentes. Assim, após os ensaios experimentais e a análise dos resultados obtidos foi possível construir a tabela 19, para os dois fatores de resposta.

Tabela 19 - Delineamento fatorial fracionário (FFD), IV (24-1) utilizado na primeira fase do trabalho experimental em termos dos 4 fatores reais de trabalho e dois fatores de resposta, rendimento e flavonoides.

Ensaio	Potência (W)	Razão Solv/Sol (mL/g)	Razão etanol/água (%)	Tempo (min)	Rendimento (%)	Flavonoides (mg/g)
1	120	5	50	6	19,63	41,12 ± 2,27
9	120	5	50	6	16,28	39,80 ± 3,96
12	120	10	50	3	30,36	26,36 ± 1,15
13	120	10	50	3	32,46	24,55 ± 4,08
6	60	10	50	6	29,19	32,49 ± 4,70
7	60	10	50	6	27,99	30,67 ± 3,18
16	60	5	50	3	14,80	41,29 ± 3,98
14	60	5	50	3	17,07	32,12 ± 2,96
3	120	10	99	6	4,59	162,6 ± 29,21
15	120	10	99	6	4,62	131 9 ± 12,44
4	120	5	99	3	4,02	92,96 ± 2,81
8	120	5	99	3	3,38	143,40 ± 6,56
2	60	10	99	3	5,87	133,70 ± 13,88
5	60	10	99	3	3,36	133,30 ± 10,42
10	60	5	99	6	3,29	125,60 ± 17,55
11	60	5	99	6	5,29	124,20 ± 12,10

Com base nos resultados obtidos, verifica-se que para potências mais elevadas, com uma razão etanol/água de 50 % e para uma razão solvente/soluto de 10 mL/mg, obtêm-se valores de rendimentos maiores.

Usando as respostas obtidas pelo trabalho experimental, um modelo fatorial é então construído através de uma lista de coeficientes multiplicados por níveis de fatores associados. Este modelo está na forma de apresentado pela equação 7.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{12} AB + \beta_{13} AC + \cdots .. \qquad \textbf{Eq. 7}$$

Onde, β, é o coeficiente associado ao fator n, e as letras, a, B, C, D, representam os fatores no modelo. Combinações de fatores, como AB, representam uma interação entre os fatores individuais no termo. Testes ANOVA são então efetuados utilizando o programa Design-Expert 10.

A avaliação do modelo foi validada pelo grau de liberdade associado à matriz FFD que é suficiente para determinar a falta de ajuste do modelo (lack of fit). Para garantir esta validade é necessário um mínimo de 3 graus de liberdade para o lack of fit e de 4 graus de liberdade para o erro. No modelo obtido obteve-se 3 e 8 graus de liberdade, respetivamente. O valor do fator de inflação da variância (Variance Inflation Factors), VIF, apresentou um valor de 1.00, que é o valor ideal. Sendo este último valor 1, o coeficiente de correlação múltipla, Ri^2 é igual a zero, demonstrado a ortogonalidade do desenho experimental. Desta forma é possível a estimativa de cada efeito principal e interação de forma independente. Outro marco para a legitimação do modelo é a Eficiência G, que está relacionada inversamente com a máxima variância e tende a reduzir com as repetições. Para a avaliação do modelo a Eficiência G obtida foi de 100%.

No gráfico seguinte é apresentada a superfície resultante do erro padrão relativo em relação a dois fatores: razão solvente soluto, B: Razão Solv/sol (mL/g) e a razão dos dois solutos utilizados, etanol/água, C: Razão EtOH/H_2O (%EtOH), para um valor constante de potência e tempo de 90 W e 4,5 min, respetivamente. Para os outros dois fatores foram obtidos superfícies semelhantes.

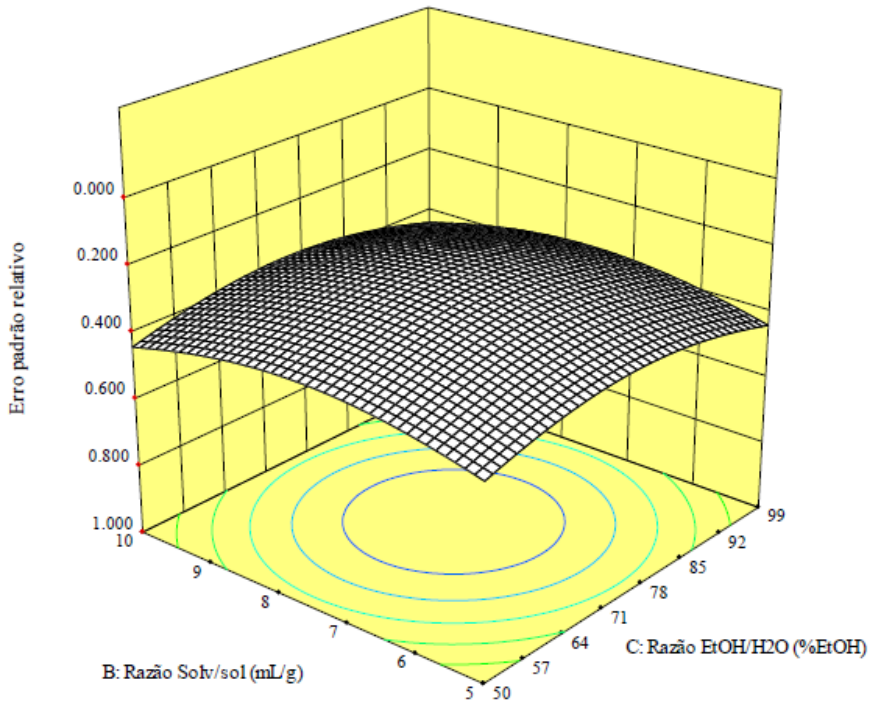

Figura 15 - Superfície resultante do erro padrão relativo em relação a dois fatores, B: razão solvente soluto e razão dos dois solutos utilizados, etanol/água, C: Razão EtOH/H_2O (%EtOH), para um valor constante de potência e tempo de 90 W e 4,5 min, respetivamente.

Após efetuada a avaliação do modelo é necessário realizar a análise de variância (ANOVA) ao(s) fator(es) de resposta da matriz FFD de forma a conseguir obter os principais fatores, que influenciam o processo.

A análise estatística é fundamental para se verificar os fatores em estudo mais significativos no processo, nomeadamente no rendimento. Utilizando o DX10 procedeu-se á análise deste fator de resposta sem aplicar qualquer transformação e seguindo a equação 7. Nesta fase inicial todos os parâmetros dados pelo DX10 foram considerados obtendo-se a seguinte tabela 20**.**

No modelo o valor de “F-valor” ser de 149,42 significa que o mesmo é relevante existindo só a probabilidade de 0,01% de este valor no modelo poder ser diferente. A partir da tabela, também é possível confirmar que os termos B, C, e AD são os mais significativos para o modelo, assim como a sua contribuição total, destacando-se a razão etanol/água com um valor de 79,88% nesta contribuição. O valor obtido para o R^2 é de 0,9868, que implica que 98,68 % da eficiência da extração do MAE é atribuída às

variáveis independentes e que só 1,34 % das eventuais variações não tem explicação pelo modelo proposto.

Tabela 20 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliar os principais efeitos para o fator de resposta rendimento.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade (df)	Média dos quadrados	% Contribuição	F-valor	P-valor
Modelo	1815,75	5	363,15		149,42	< 0,0001
A - Potência	4,48	1	4,48	0,24	1,84	0,2042
B - Razão Solv/Sol	186,80	1	186,80	10,15	76,86	< 0,0001
C - Razão etanol/água	1469,76	1	1469,76	79,88	604,73	< 0,0001
D - Tempo	0,012	1	0,012	6,28E-4	4,76E-3	0,9464
AD	154,69	1	154,69	8.41	63,65	< 0,0001
Erro	16,45	8	2,06			
Cor Total	1840,06	15				

Contudo, um valo e R^2 elevado não é por si só justificativo de uma boa correlação sendo necessário compará-lo com o valor ajustado do R^2 que apresenta um valor e 0,9662, não diferindo significativamente do anterior. O valor do “lack of fit” de 1,91 implica que o mesmo não é significativo ao erro (Pure error), $p > 0,05$, confirmando a validação do modelo. Finalmente, um coeficiente de variação (C.V.%) de 11.23 e uma precisão adequada (Adequate Precisior) de 28,401 sugerem que o modelo é confiável e reprodutível [86], [87].

A equação resultante da análise ANOVA é dada pela equação 8 em termos dos fatores codificados (tabela 17) ou pela equação 9, em termos dos fatores atuais:

$$Rendimento(\%) = 13{,}89 + 0{,}53 \times A + 3{,}43 \times B - 9{,}58 \times C - 0{,}0027 \times D - 3{,}11 \times AD \qquad \textbf{Eq. 8}$$

$$Rendimento\ (\%) = 3{,}28870 + 0{,}32858\ \times Potência + 1{,}36675 \times Razão\ Solv/Sol - 0{,}391208 \times Razão\ EtOH/H_2O + 6{,}20083 \times Tempo - 0{,}069097 \times (Potência\ \times Tempo) \qquad \textbf{Eq. 9}$$

O DX10 e o modelo ANOVA, consideram todos os fatores do planeamento experimental e as suas interações significativas. Contudo da tabela 20 verifica-se que os fatores mais contributivos e com p-valor < 0,0001, sendo por isso significativos são o B, C e a interação AD, resultado numa contribuição total de 98,44 % para a validação do modelo. Assim, com o objetivo de selecionar menos fatores para uma próxima etapa e otimização do modelo selecionou-se estes parâmetros e obteve-se então os valores finais para o fator de resposta do rendimento.

As principais alterações na validação do modelo resultaram na alteração do "F-valor" passar para 251,56; um decréscimo no valor de o R^2 para 0,9804 sendo o seu valor de 0,9722, consequentemente esta diferença ainda é menor que anterior, justificando uma boa correlação do modelo. A equação da análise ANOVA é dada pela equação 10 só em termos dos fatores codificados (Tabela 19), resultando a figura16.

$$Rendimento(\%) = 13{,}89 + 3{,}42 \times B - 9{,}58 \times C - 3{,}11 \times AD \qquad \textbf{Eq. 10}$$

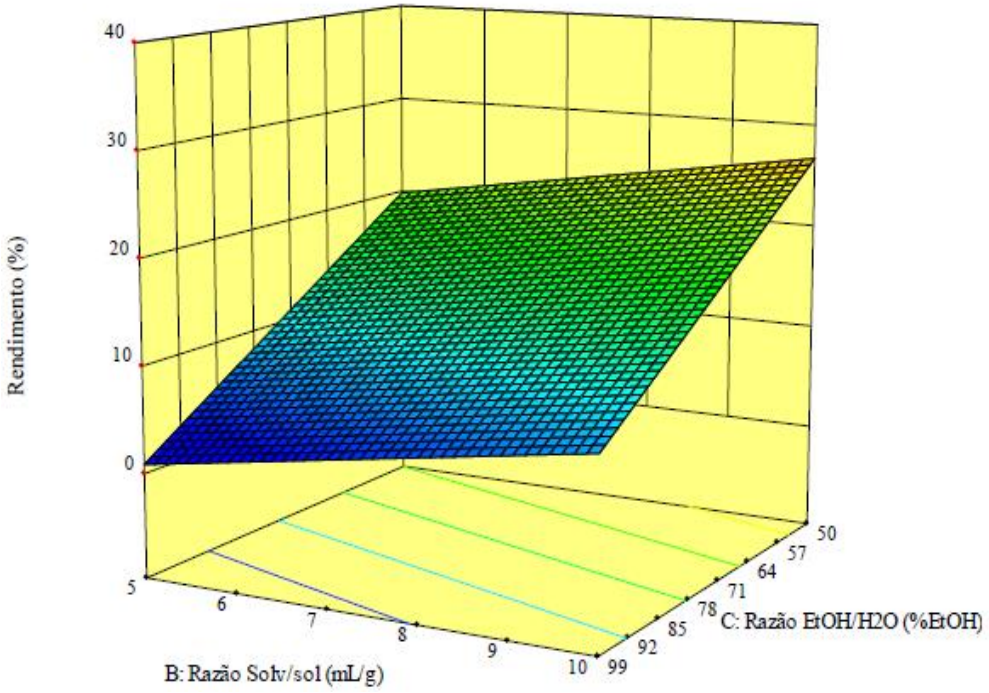

Figura 16 - Superfície resultante da aplicação da equação 10 ao fator de resposta do rendimento em relação a dois fatores, B: razão solvente soluto e razão dos dois solutos utilizados, etanol/água, para um valor constante de potência e tempo de 90 W e 4,5 min.

Da superfície, verifica-se que o maior rendimento resulta da combinação para um valor de 50 % de etanol/50% de água, combinada com uma maior razão de solvente em relação ao soluto.

Procedeu-se à análise para o outro fator de resposta, flavonoides, de igual modo como para o rendimento, tendo-se obtido a tabela 21.

Tabela 21 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliar os principais efeitos para o fator de resposta flavonoides.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade (df)	Média dos quadrados	% Contribuição	F-valor	P-valor
Modelo	37943,14	1	363,15		177,63	< 0,0001
C - Razão etanol/água	37943,14	1	37943,14	92,69	177,63	< 0,0001
Erro	179,41	8	223,93			
Cor Total	40933,65	15				

No modelo o valor de "F-valor" ser de 177,63 significa que o mesmo é significante existindo só a probabilidade de 0,01% de este valor no modelo poder ser diferente. A partir da tabela, também é possível confirmar que exclusivamente o fator C: Razão EtOH/H_2O é significativo. Os outros parâmetros discutidos no caso do rendimento apresentam valores igualmente bons que permitem a validação do modelo e resulta na equação 11.

$$Flavonoides\ (mg/g) = -65{,}83265 + 1{,}98765 \times Razão\ EtOH/H_20 \qquad \textbf{Eq. 11}$$

Por aplicação da equação é possível desenhar a superfície resultante na Figura 17. Verifica-se que existe um efeito contrário em relação ao rendimento, obtendo-se maior quantidade de flavonoides quando se utiliza etanol puro, sendo assim a quantidade de água praticamente zero

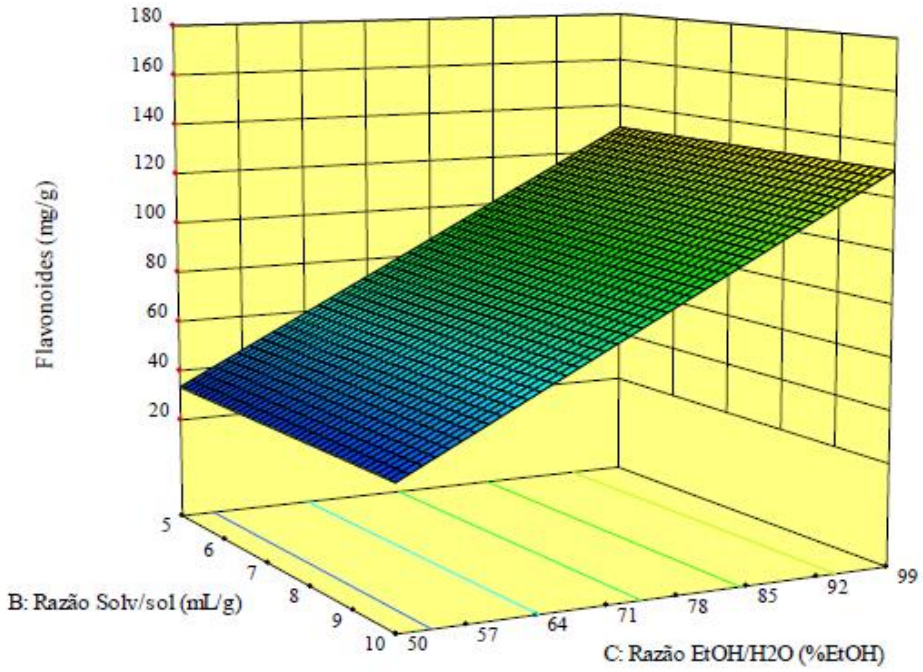

Figura 17 - Superfície resultante da aplicação da equação 11 ao fator de resposta dos flavonoides em relação a dois fatores, B: razão solvente/soluto e razão dos dois solventes utilizados, etanol/água, para um valor constante de potência e tempo de 90 W e 4,5 min.

Tendo em conta os resultados obtidos pela análise ANOVA fixaram-se dois fatores (potencia e tempo, 90 W e 4,5 min, respetivamente) para prosseguir a otimização do processo e aplicar o Delineamento compostos central (Central Composite Design) - CCD.

Para a valores da razão etanol/água fixou-se um mínimo de 74 e um máximo de 95 %, e para a razão solvente/soluto um mínimo de 7 e um máximo de 9 mL/g, com o objetivo de se ter por um lado um bom rendimento e por outro uma quantidade razoável de flavonoides, considerando que estes dois fatores de resposta variem em sentido contrário em anuência com o aumento da razão etanol/água.

4.7.2 Delineamento dos compostos centrais (Central Composite Design) - CCD

O delineamento compostos centrais são um método de superfície de resposta que permite maior número de níveis sem realizar experimentos em cada combinação de níveis de fator e cobrem o espaço do fator próximo ao centro, pontos de estrela, com mais pontos que na periferia. Assim, após determinado os fatores com importância mais elevada por FFD a aplicação do CCD pode ser aplicada para melhorar os processos.

Nesta etapa é gerada outra matriz de ensaios, os valores de resposta são introduzidos na matriz e os resultados da ANOVA preveem mais uma vez o novo modelo, por uma equação semelhante. Tendo um modelo significativo e bem ajustado é possível executar o projeto de espaço para encontrar a resposta que consideram ao nosso objetivo.

A resposta e representação para este tipo de delineamento experimental pode ser descrita por polinômio de segunda ordem de acordo com a equação 12 [88], [89].

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} x_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i<j} \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \qquad \textbf{Eq.12}$$

onde Y é a resposta pretendida, *k* o número de variáveis independentes, β os coeficientes estimados, *x* os parâmetros e ε o termo de erro associado. Pretende-se assim, determinar as circunstâncias ótimas práticas para o nosso sistema ou determinar a região da área na qual as melhores condições experimentais sejam satisfeitas. O CCD, é constituído por três grupos distintos de elementos experimentais: um fatorial completo ou um fatorial fracionário, um conjunto de pontos centrais e, adicionalmente, um grupo de níveis extras denominados *pontos axiais*.

De acordo com o descrito e discutido no procedimento para o FFD, a matriz CCD foi desenhada com dois fatores de estudo, razão EtOH/H_2O (% EtOH) e razão solvente/soluto (mL/g), com os dois fatores de resposta, rendimento e quantidade de flavonoides na amostra. O resumo dos fatores. No DX10 a razão EtOH/H_2O é colocada com um máximo de 95 % e um mínimo de 74 %, correspondendo aos códigos da matriz de 1.000 e -1.000, respetivamente. Os valores de razão solvente/soluto foram fixados entre um máximo de 7 e um mínimo de 9 mL/g, correspondendo aos códigos da matriz de 1.000 e -1.000, respetivamente. Como objetivo final maximizar o rendimento, simultaneamente com o maior teor de flavonoides possível na amostra.

Na tabela 22 é apresentado a matriz CCD obtida pelo Design Expert 10 e os resultados para os fatores de resposta mencionados, uma vez que o procedimento é em tudo semelhante ao FFD, anteriormente descrito.

Tabela 22 - Delineamento composto central, CCD, com dois fatores de estudo e 2 fatores de resposta, rendimento e flavonoides.

Ensaios	Razão etanol/água (%)	Razão Solv/Sol (mL/g)	Rendimento (%)	Flavonoides (mg/g)
1	84,5	7	10,98	52,56 ± 5,20
2	74	8	13,88	33,96 ± 13,17
3	95	7	8,00	62,80 ± 9,49
4	84,5	8	13,18	57,93 ± 6,92
5	84,5	9	12,68	41,55 ± 5,74
6	95	9	8,937	72,02 ± 9,91
7	74	9	16,83	52,13 ± 2,11
8	95	8	9,46	65,07 ± 6,09
9	84,5	8	13,70	44,90 ± 8,06
10	84,5	8	15,85	56,16 ± 5,15
11	74	7	16,62	33,30 ± 2,38
12	84,5	8	12,61	51,91 ± 11,82
13	84,5	8	14,20	61,61 ± 3,37

O modelo linear descrito por uma ordem polinomial foi validado pelo grau de liberdade de 2 para uma falta de ajuste do modelo (lack of fit) de 6 e 4 para o erro (recomendado para validar o modelo 3 e 4, respetivamente). O valor do fator de inflação da variância (Variance Inflation Factors), VIF, apresentou um valor de 1.00, que é o valor ideal. O modelo proposto foi o melhor dos testados apresentado uma Eficiência G de 56,2 %.

Com a avaliação do modelo efetuou-se a análise de variância (ANOVA) usando o teste de Student (p-valor) em 5 %, com um nível de probabilidade ($p<0,05$), para os fatores de resposta da matriz, rendimento e flavonoides, sendo que em ambos não foi utilizada qualquer transformação (sempre desejável) para ajustar de melhor forma o modelo.

Para o rendimento a análise ANOVA permitiu obter os valores da tabela 23.

Tabela 23 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliar os principais efeitos para o fator de resposta rendimento, no CCD.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade (df)	Média dos quadrados	% Contribuição	F-valor	P-valor
Modelo	74,36	2	37,18	16,68	0,0007	74,36
A - Razão etanol/água	73,01	1	73,01	32,76	0,0002	73,01
B - Razão Solv/Sol	1,35	1	1,35	0,61	0,4538	1,35
Erro	6,11	4	1,53			6,11
Cor Total	96,65	12				96,65

No modelo o valor de "F-valor" de 74,36 significa que é significativo existindo só a probabilidade de 0,07% de este valor no modelo poder ser diferente. A partir da tabela, também é possível confirmar que exclusivamente o fator B: Razão Solv/sol é muito menos significativo que o fator A (B é mesmo não significativo pelos valores de *F* e *P*). Os valores de R^2 não são tão elevados como o desejado, mas, no entanto, apresenta um valor inferior a 0,2 quando comparado com o valor ajustado do R^2 (0,7694 e 0,7233; respetivamente) que apresenta um valor e 0,9662, não diferindo significativamente do anterior, sendo boa indicação para a validação do modelo e resulta na equação 13.

$$Rendimento\ (\%) = 37{,}11355 - 0{,}33222 \times razão\ \mathrm{EtOH/H_2O} + 0{,}47500 \times razão\ \mathrm{Solv/Sol} \qquad \textbf{Eq.13}$$

Para a resposta dos flavonoides foi procedido á análise de igual modo, tendo-se obtido um modelo válido e no qual pelas razões discutidas acima, se verifica a maior influencia e significado para a razão $EtOH/H_2O$. Os resultados são apresentados na tabela 24.

Verifica-se que o valor de "F-valor" de 10,60 é significativo, passando a existir uma probabilidade de 0,34% de este valor no modelo poder ser diferente. Este ligeiro aumento resulta, na eventual determinação e técnica experimental, que é uma análise sobre um valor já obtido no rendimento. A equação resultante é dada por 14:

$$Flavonoides = -77{,}93069 + 1{,}2778 \times razão\ \mathrm{EtOH/H_2O} + 0{,}47500 \times razão\ \mathrm{Solv/Sol}$$ **Eq. 14**

Tabela 24 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para avaliar os principais efeitos para o fator de resposta teor e flavonoides, no CCD.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade (df)	Média dos quadrados	% Contribuição	F-valor	P-valor
Modelo	1128,44	2	564,22	10,60	0,0034	1128,44
A - Razão etanol/água	1080,04	1	1080,04	20,29	0,0011	1080,04
B - Razão Solv/Sol	48,39	1	48,39	0,91	0,3628	48,39
Erro	163,94	4	40,99			163,94
Cor Total	1660,63	12				1660,63

Os gráficos obtidos para os dois fatores de resposta encontram-se nas figuras 18 e 19.

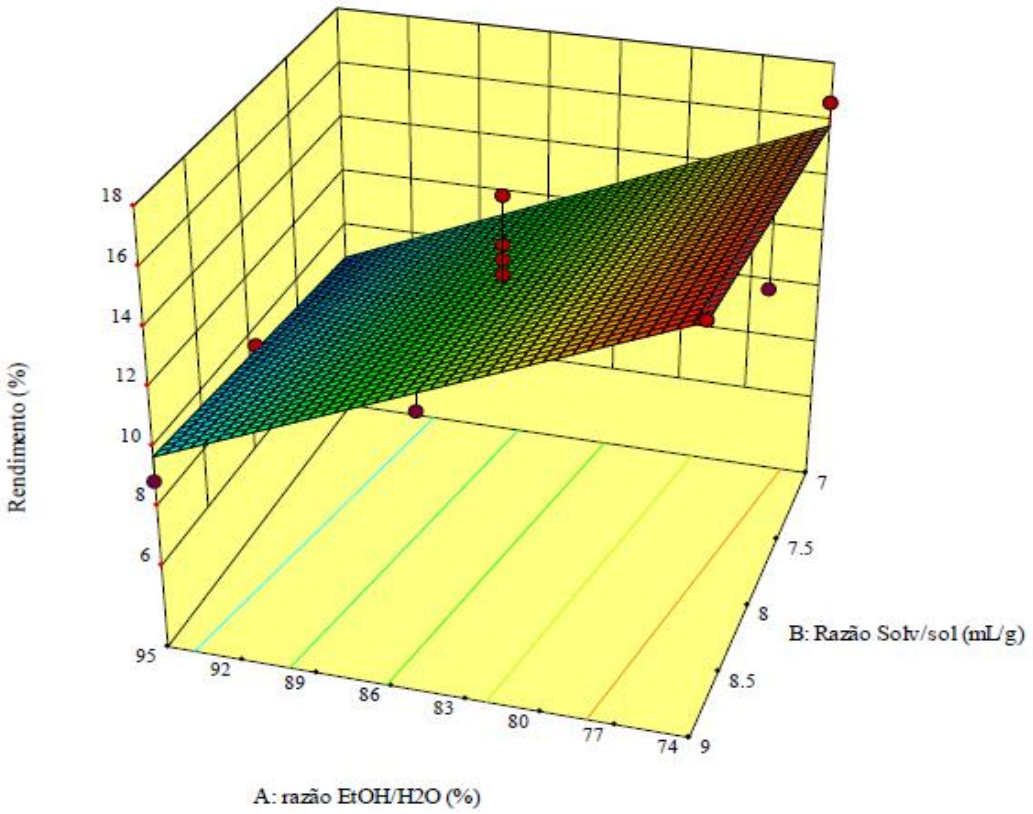

Figura 18 - Superfície resultante da aplicação da equação 13 ao fator de resposta do rendimento em relação a dois fatores, A: razão etanol/água e B: solvente/soluto, para um valor constante de potência e tempo de 90 W e 4,5 min.

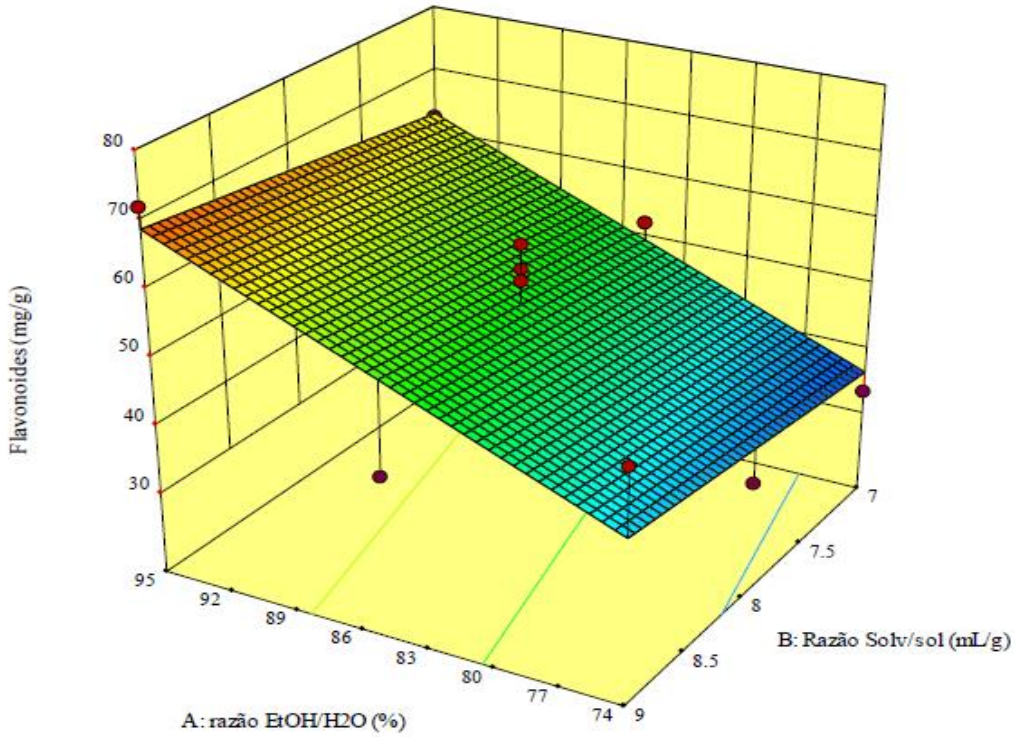

Figura 19 - Superfície resultante da aplicação da equação 14 ao fator de resposta dos flavonoides em relação a dois fatores, A: razão etanol/água e B: solvente/soluto, para um valor constante de potência e tempo de 90 W e 4,5 min.

Como se verifica dos gráficos as zonas laranjas e vermelhas são onde existe um maior rendimento ou quantidade de flavonoides no extrato, variando inversamente estes dois fatores e resposta com um fator experimental importante e com significado A-Razão etanol/água.

Dos resultados verifica-se que, para o ponto central inicialmente proposto pelo modelo (A: razão etanol/água = 84,5 e B: solvente/soluto = 8,0), para maximizar os dois fatores de resposta obtém-se pelo modelo os valores previstos de A:razão etanol/água igual a 88,50 e B:solvente/ soluto igual a 7,95, correspondendo aos fatores de resposta para o rendimento e quantidade de flavonoides, de 11,49 % e 57,72 mg/g, respetivamente.

4.7.3 Análise dos resultados globais dos fatores estudados

Na tabela seguinte estão apresentados valores para cada ensaio na matriz construída do FFD: rendimento, flavonoides e polifenóis.

Tabela 25 - Valores obtidos com base na FFD, de rendimento, flavonoides e polifenóis.

Ensaios	Rendimento (%)	Flavonoides (mg/g)	Polifenóis (mg/g)
1	19,63	41,12 ± 2,27	10,99 ± 1,64
2	5,87	133,69 ± 13,88	14,27 ± 1,28
3	4,59	162,64 ± 29,21	11,87 ± 0,74
4	4,02	92,96 ± 2,81	10,39 ± 1,92
5	3,36	133,30 ± 10,42	17,10 ± 1,51
6	29,19	32,49 ± 4,70	7,30 ± 0,74
7	27,99	30,67 ± 3,18	6,40 ± 0,77
8	3,38	143,36 ± 6,56	18,88 ± 1,86
9	16,28	39,80 ± 3,96	8,85 ± 1,43
10	3,29	125,60 ± 17,55	13,72 ± 2,01
11	5,29	124,16 ± 12,10	13,37 ± 0,51
12	30,36	26,36 ± 1,15	6,09 ± 1,68
13	32,46	24,55 ± 4,08	7,40 ± 2,11
14	17,07	32,12 ± 2,96	9,95 ± 0,93
15	4,62	131,85 ± 12,44	9,66 ± 0,51
16	14,80	41,29 ± 3,98	10,77 ± 0,48

Para além do discutido a quando da análise dos dados do FFD, verifica-se que a quanto menor o rendimento, maior a quantidade de flavonoides e de polifenóis. O etanol quando solvente puro permite obter maior quantidade de flavonoides e polifenóis embora o rendimento global da extração seja menor.

Na tabela seguinte estão apresentados valores para cada ensaio final na CCD e com os parâmetros de resposta apresentados em conjunto com os valores de polifenóis totais, tendo sido estudado igualmente nestas matrizes o poder redutor do ião ferro.

Tabela 26 - Valores finais obtidos na CCD, rendimento, flavonoides polifenóis totais e o poder de redução do ião ferro.

Ensaios	Rendimento (%)	Flavonoides (mg/g)	Polifenóis (mg/g)	Eq. de trolox (µmol/g extrato)
1	10,98	52,56 ± 5,20	9,22 ± 0,81	6,14 ± 0,85
2	13,88	33,96 ± 13,17	5,75 ± 1,46	5,56 ± 0,55
3	8,00	62,80 ± 9,49	13,88 ± 1,79	5,68 ± 0,81
4	13,18	57,93 ± 6,92	8,51 ± 0,31	5,01 ± 0,85
5	12,68	41,55 ± 5,74	9,19 ± 1,62	4,96 ± 0,79
6	8,94	72,02 ± 9,91	13,28 ± 1,38	5,14 ± 0,43
7	16,83	52,13 ± 2,11	13,28 ± 1,42	4,71 ± 0,57
8	9,46	65,07 ± 6,09	10,00 ± 0,58	5,92 ± 0,45
9	13,70	44,90 ± 8,06	9,19 ± 1,62	5,68 ± 0,67
10	15,85	56,16 ± 5,15	10,67 ± 0,78	5,23 ± 0,34
11	16,62	33,30 ± 2,38	7,24 ± 0,37	5,28 ± 0,12
12	12,61	51,91 ± 11,82	13,93 ± 0,22	5,44 ± 0,53
13	14,20	61,61 ± 3,37	8,60 ± 1,46	4,51 ± 0,48

Para além do verificado na matriz de FFD, no comportamento do rendimento, flavonoides e polifenóis verifica-se que o poder de redução do ião ferro obtido nos ensaios apresenta valores semelhante e dentro do erro experimental, não se verificando qualquer tendência com os outros parâmetros estudados.

.

4.8 Determinação do índice de escurecimento

Através dos resultados obtidos com auxílio do colorímetro, leu-se três parâmetros, para cada amostra, encontrando-se no anexo D a média dos parâmetros lidos. Com base nesses, determinou-se o índice de escurecimento (BI), resultados apresentados no anexo D e a diferença de cor (ΔE) após os tempos lidos (tabela 27).

Tabela 27 - Valores determinados de ΔE, após 15 e 30 minutos.

	Controlo	A	B	C	D
ΔE após 15 min	5,45	3,89	0,51	4,94	2,55
ΔE após 30 min	12,08	18,12	14,12	16,96	19,13

Controlo – Sem pulverização;

A – Pulverizado com os extratos obtidos em micro-ondas nas condições referentes à tabela 19 e aos ensaios 2,5,10 e 11, onde se obteve rendimentos baixos quantidades significativas de flavonoides;

B – Pulverizado com os extratos obtidos em micro-ondas nas condições referentes à tabela19 e aos ensaios 1,9,12 e 13, onde se obteve rendimentos maiores e valores menores para os flavonoides;

C – Pulverizado com os extratos obtidos em micro-ondas nas condições referentes à tabela 22 e aos ensaios 4,9,12 e 13, onde se obteve rendimentos maiores face aos outros ensaios e quantidades significativas de flavonoides;

D – Pulverizado com os extratos obtidos nos ensaios realizados em PLE.

Com base na tabela 27, conclui-se que após os primeiros 15 minutos de pulverização da maçã, o controlo é onde se apresenta maior alteração de cor. Já após 30 minutos, a alteração de cor é maior nos extratos do que no controlo, tal como se pode verificar na figura 21, encontrando-se mais oxidada todas as maçãs pulverizadas com os diferentes extratos, face ao controlo.

Como fator e proteção os extratos ensaiados B apresentam melhores propriedades, nos primeiros 15 minutos após a sua pulverização e mesmo ao fim de 30 minutos é o que apresenta menor variação de cor quando comparado com o controlo. A combinação de diferentes extratos para se obter a amostra B, são as que apresentam menores quantidade de flavonoides e polifenóis, pois correspondem exatamente aos que tiveram maior rendimento no FFD.

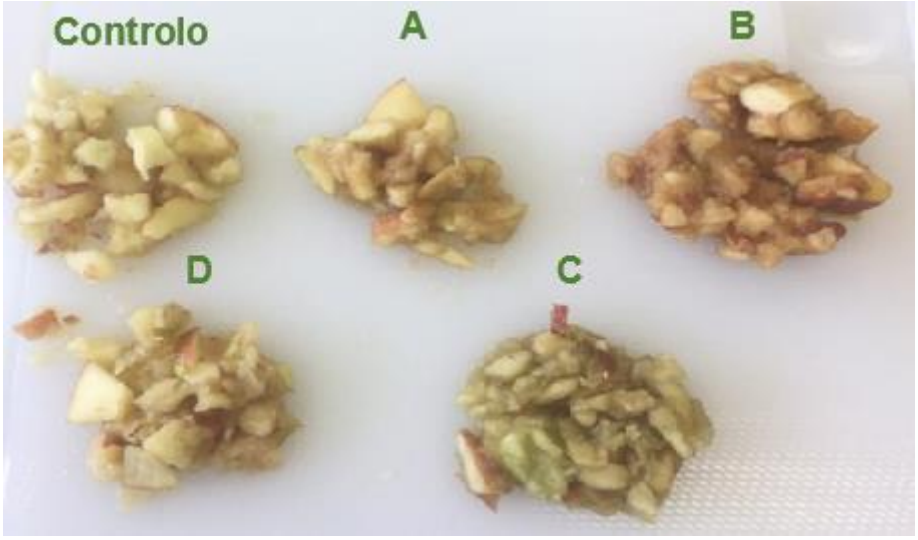

Figura 20 - Alterações das maçãs revestidas com água (controlo) e com *Codium Tomentosum* (A, B, C, D), após 30 minutos.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Das diferentes técnicas utilizadas, nomeadamente as consideradas mais verdes, foi possível escolher a MAE, considerando os valores de rendimento e quantidades de flavonoides.

Verificou-se a impossibilidade de quantificar os diferentes extratos obtidos em termos de atividade antioxidante, recorrendo a testes como o DPPH e ABTS, não se tendo obtido resultados coerentes ou concordantes.

Utilizando a ferramenta DX10, foi possível otimizar as melhores condições para um compromisso entre o maior rendimento possível e a maior quantidade de flavonoides, considerando que variam em sentidos opostos com o aumento da razão etanol/água.

Observa-se que a quantidade de flavonoides e polifenóis é menor nos extratos obtidos com etanol puro, mas o rendimento é maior quando comparados com a utilização de razões etanol/água até 50 %.

Dos testes realizados para o índice de escurecimento em maçãs não foi possível obter uma conclusão definitiva em relação à capacidade dos extratos em inibirem a capacidade enzimática do escurecimento das mesmas, embora os extratos com maior rendimento tenham apresentado melhores resultados, quando comparados com outros.

Futuramente, será necessário realizar mais testes sobre a capacidade destes extratos de atuarem na atividade enzimática e consequente índice de escurecimento das maçãs, de modo a conseguir-se resultados mais conclusivos.

Sugere-se também a realização de mais ensaios com outras frações de etanol/água, baixando a quantidade de etanol até próximo de zero.

Recomenda-se também, a procura de outras formas de quantificar os compostos extraídos a nível de metabolitos secundários recorrendo a outras técnicas como por exemplo, ao HPLC.

6. BIBLIOGRAFIA

[1] J. T. Hafting, A. T. Critchley, M. L. Cornish, S. A. Hubley, and A. F. Archibald, “On-land cultivation of functional seaweed products for human usage,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 24, no. 3, pp. 385–392, 2012.

[2] J. Ortiz, E. Uquiche, P. Robert, N. Romero, V. Quitral, and C. Llantén, “Functional and nutritional value of the Chilean seaweeds Codium fragile, Gracilaria chilensis and Macrocystis pyrifera,” *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 111, no. 4, pp. 320–327, 2009.

[3] L. Pereira, “As Algas Marinhas e Respectivas Utilidades,” *Monografias*, vol. 913, pp. 1–19, 2008.

[4] E. Ibañez and A. Cifuentes, “Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 93, no. 4, pp. 703–709, 2013.

[5] B. Kılınç, S. Cirik, and G. Turan, “Seaweeds for Food and Industrial Applications,” *Seaweeds food Ind. Appl.*, pp. 735–748, 2013.

[6] A. L. C. Lima, “Identificação e caraterização da flora algal e avaliação do estado ecológico de praias do concelho de Peniche,” Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, 2013.

[7] L. PEREIRA, “Extracção, Caracterização e Utilização das Carragenanas,” *Anais/Aeccom 2002*, 2002.

[8] P. B. Andrade *et al.*, “Valuable compounds in macroalgae extracts,” *Food Chem.*, vol. 138, no. 2–3, pp. 1819–1828, Jun. 2013.

[9] E. Gómez-Ordóñez, A. Jiménez-Escrig, and P. Rupérez, “Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast,” *Food Res. Int.*, vol. 43, no. 9, pp. 2289–2294, 2010.

[10] D. Kelman, E. K. Posner, K. J. McDermid, N. K. Tabandera, P. R. Wright, and A. D. Wright, “Antioxidant activity of Hawaiian marine algae,” *Mar. Drugs*, vol. 10, no. 2, pp. 403–416, 2012.

[11] S. Mohamed, S. N. Hashim, and H. A. Rahman, “Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 23, no. 2, pp. 83–96, 2012.

[12] M. A. Rizvi and M. Shameel, “Pharmaceutical biology of seaweeds from the Karachi coast of Pakistan,” *Pharm. Biol.*, vol. 43, no. 2, pp. 97–107, 2005.

[13] L. Pereira, “A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds,” in *Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medicinal Uses*, V. H. Pomin, Ed. Nova Science Publishers, Inc., 2011, pp. 15–49.

[14] P. Valentão, P. Trindade, D. Gomes, P. Guedes de Pinho, T. Mouga, and P. B. Andrade, “Codium tomentosum and Plocamium cartilagineum: Chemistry and antioxidant potential,” *Food Chem.*, vol. 119, no. 4, pp. 1359–1368, 2010.

[15] W. A. Stirk, D. L. Reinecke, and J. Van Staden, “Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 19, no. 3, pp. 271–276, 2007.

[16] K. H. M. Cardozo *et al.*, “Metabolites from algae with economical impact,” *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 146, no. 1-2 SPEC. ISS., pp. 60–78, 2007.

[17] “Filo Cholorophyta.” [Online]. Available: http://simbiotica.org/clorofita.htm. [Accessed: 27-Aug-2019].

[18] A. González and B. Santelices, “A dichotomous species of Codium (Bryopsidales, Chlorophyta) is colonizing northern Chile,” *Rev. Chil. Hist. Nat.*, vol. 77, no. 2, pp. 293–304, 2004.

[19] ‘“Estrutura Taxonómica Codium Tomentosum.’” [Online]. Available: http://skaphandrus.com/pt/animais-marinhos/espécie/Codium-tomentosum. [Accessed: 27-Aug-2019] .

[20] “Codium tomentosum Stackhouse.” [Online]. Available: http://skaphandrus.com/pt/animais-marinhos/espécie/Codium-tomentosum. [Accessed: 27-Aug-2019].

[21] M. A. A. Zaid Najah, Khaled M. Elsherif*, “Phytochemical Profile and Heavy Metals Contents of Codium Tomentosum And Sargassum Hornschuchi,” *J. Appl. Chem.*, pp. 1821–1827, 2015.

[22] Christopher S. Lobban Paul J. Harrison, *In Reply: BEHAVIOUR THERAPY*, vol. 112, no. 483. 1966.

[23] M. D. Hanisak, “Growth patterns of Codium fragile ssp. tomentosoides in response to temperature, irradiance, salinity, and nitrogen source,” *Mar. Biol.*, vol. 50, no. 4, pp. 319–332, 1979.

[24] Y. H. Kang, J. R. Hwang, I. K. Chung, and S. R. Park, “Development of a seaweed species-selection index for successful culture in a seaweed-based integrated aquaculture system,” *J. Ocean Univ. China*, vol. 12, no. 1, pp. 125–133, 2013.

[25] M. D. Guiry *et al.*, “AlgaeBase: An On-line Resource for Algae,” *Cryptogam. Algol.*, vol. 35, no. 2, pp. 105–115, 2014.

[26] C. Henrique, J. A. Lourenço, M. Cesar, J. M. Penafort, and M. A. Igarashi, “Aspectos Do Cultivo De Algas Marinhas Com Vistas a Sustentabilidade Da Atividade,” pp. 1–17, 2001.

[27] J. Azmir *et al.*, “Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials : A review,” *J. Food Eng.*, vol. 117, no. 4, pp. 426–436, Aug. 2013.

[28] K. M. Sharif *et al.*, “Experimental design of supercritical fluid extraction – A review,” *J. Food Eng.*, vol. 124, pp. 105–116, Mar. 2014.

[29] A. M. F. Palavra *et al.*, “Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from microalgae and volatile oils from aromatic plants,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 60, pp. 21–27, 2011.

[30] J. P. Coelho and A. F. Palavra, “Supercritical Fluid Extraction of Compounds from Spices and Herbs,” in *High Pressure Fluid Technology for Green Food Processing*, Springer., T. Fornari and R. P. Stateva, Eds. Cham Heidelberg New York Dordrecht London, 2015, pp. 357–396.

[31] J. Azmir *et al.*, “Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials : A review,” *J. Food Eng.*, vol. 117, pp. 426–436, 2013.

[32] M. D. Luque de Castro and F. Priego-Capote, “Soxhlet extraction: Past and present panacea,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 16, pp. 2383–2389, 2010.

[33] A. R. Fontana, A. Antoniolli, and R. Bottini, “Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 38, pp. 8987–9003, 2013.

[34] R. L. Mendes, B. P. Nobre, M. T. Cardoso, A. P. Pereira, and A. F. Palavra, “Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae,” *Inorganica Chim. Acta*, vol. 356, pp. 328–334, 2003.

[35] C. M. Ajila, S. K. Brar, M. Verma, R. D. Tyagi, S. Godbout, and J. R. Valéro, “Extraction and Analysis of Polyphenols : Recent trends,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 31, no. 3, pp. 227–249, 2011.

[36] Ž. Knez, M. Knez Hrnčič, and M. Škerget, “Particle Formation and Product Formulation Using Supercritical Fluids,” *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, vol. 6, no. 1, pp. 379–407, 2015.

[37] M. M. Cowan, “Plant products as antimicrobial agents,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol.

12, no. 4, pp. 564–582, 1999.

[38] I. Dalmolin, M. A. Mazutti, E. A. C. Batista, M. A. A. Meireles, and J. V. Oliveira, “Chemical characterization and phase behaviour of grape seed oil in compressed carbon dioxide and ethanol as co-solvent,” *J. Chem. Thermodyn.*, vol. 42, no. 6, pp. 797–801, 2010.

[39] P. Raut *et al.*, “Emerging pressurized liquid extraction (PLE) techniques as an innovative green technologies for the effective extraction of the active phytopharmaceuticals,” *Res. J. Pharm. Technol.*, vol. 8, no. 6, pp. 800–810, 2015.

[40] J. A. Mendiola, M. Herrero, A. Cifuentes, and E. Ibañez, “Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1152, no. 1–2, pp. 234–246, 2007.

[41] S. U. Kadam, B. K. Tiwari, and C. P. O’Donnell, “Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 20, pp. 4667–4675, 2013.

[42] P. Compounds and Y. Li, “Microwave-Assisted Extraction of Natural Antioxidants from the Exotic Gordonia axillaris Fruit : Optimization and Identification of.”

[43] P. Taylor, M. Desai, J. Parikh, and P. A. Parikh, “Separation & Purification Reviews Extraction of Natural Products Using Microwaves as a Heat Source,” no. June 2014, pp. 37–41, 2010.

[44] R. V. Kapoore, T. O. Butler, J. Pandhal, and S. Vaidyanathan, “Microwave-Assisted Extraction for Microalgae : From Biofuels to Biorefinery,” *Biology (Basel).*, vol. 7, no. 18, pp. 1–25, 2018.

[45] I. Wijesekara, R. Pangestuti, and S. Kim, “Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 84, no. 1, pp. 14–21, 2011.

[46] J. Gross, *Pigments In Vegetables - Chlorophylls And Carotenoids*. 1991.

[47] T. Chlorophylls, N. M. Streit, and L. P. Canterle, “The Chlorophylls,” in *The Chlorophylls*, 1966, pp. 748–755.

[48] Majdah Zawawi1 and Noriah Ramli, “Determinação de pigmentos fotossintéticos em alimentos por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC-DAD) e espectrofotometria,” 2016.

[49] P. Molyneux, “The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity,” *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, vol. 26, no. December 2003, pp. 211–219, 2004.

[50] S. Heo, S. Cha, K. Lee, S. K. Cho, and Y. Jeon, “Antioxidant Activities of Chlorophyta and Phaeophyta from Jeju Island,” *Algae*, 2005.

[51] K. Thaipong, U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos, and D. Hawkins Byrne, “Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 19, no. 6–7, pp. 669–675, Sep. 2006.

[52] R. Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, K. M. Schaich, M. Özyürek, and K. Güçlü, “Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report),” *Pure Appl. Chem*, vol. 85, no. 5, pp. 957–998, 2013.

[53] K. Dastmalchi, H. J. Damien Dorman, P. P. Oinonen, Y. Darwis, I. Laakso, and R. Hiltunen, “Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (Melissa officinalis L.) extract,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 41, no. 3, pp. 391–400, 2008.

[54] M. Wang *et al.*, “Antioxidative phenolic glycosides from sage (Salvia officinalis),” *J. Nat. Prod.*, vol. 62, no. 3, pp. 454–456, 1999.

[55] A. Activity, A. An, I. Abts, and C. D. Assay, “ABTS Assay,” vol. 26, no. 98, pp. 1–7, 1999.

[56] D. B. De Alencar *et al.*, “Antioxidant potential and cytotoxic activity of two red seaweed species, amansia multifida and meristiella echinocarpa, from the coast of Northeastern Brazil,” *An. Acad. Bras. Cienc.*, vol. 86, no. 1, pp. 251–263, 2014.

[57] H. Arbaayah and Y. Umi Kalsom, “Antioxidant properties in the oyster mushrooms (Pleurotus spp.) and split gill mushroom (Schizophyllum commune) ethanolic extracts,” *Mycosphere*, vol. 4, no. 4, pp. 661–673, 2013.

[58] I. F. F. Benzie and Y. T. Szeto, “Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 47, no. 2, pp. 633–636, 1999.

[59] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez, “Polyphenols: Food sources and bioavailability,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 79, no. 5, pp. 727–747, 2004.

[60] K. B. Pandey and S. I. Rizvi, “Omcl0205_0270,” vol. 2, no. 5, pp. 270–278, 2009.

[61] A. Blainski, G. C. Lopes, and J. C. P. De Mello, “Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from limonium brasiliense L.,” *Molecules*, vol. 18, no. 6, pp. 6852–6865, 2013.

[62] J. Valls, S. Millán, M. P. Martí, E. Borràs, and L. Arola, “Advanced separation

methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols," *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 43, pp. 7143–7172, 2009.

[63] L. A. Figueroa, L. B. Navarro, M. P. Vera, and V. L. Petricevich, "Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents, and cytotoxicity evaluation of Bougainvillea xbuttiana," *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 6, no. 5, pp. 497–502, 2014.

[64] J. N. NOGUEIRA, "Influência de alguns métodos de controle do escurecimento enzimático nas propriedades organoléticas da maçã Bruckner do Brasil conservada por congelação e liofilização," *An. da Esc. Super. Agric. Luiz Queiroz*, vol. 30, pp. 375–386, 1973.

[65] F. A. Tomás-Barberán and J. C. Espín, "Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 81, no. 9, pp. 853–876, 2001.

[66] V. Santos, W. Araújo, R. Teixeira, J. Nascimento, and C. Bittencourt, "Escurecimento Enzimático em Frutas," *VII Congr. Norte Nord. Pesqui. e Inovação*, p. 5, 2012.

[67] Y. Probst, "A review of the nutrient composition of selected rubus berries," *Nutr. Food Sci.*, vol. 45, no. 2, pp. 242–254, 2015.

[68] A. Tenorio, M. D. Gordillo, C. M. Pereyra, and E. J. Martı, "Relative Importance of the Operating Conditions Involved in the Formation of Nanoparticles of Ampicillin by Supercritical Antisolvent Precipitation," pp. 114–123, 2007.

[69] P. Subra and P. Jestin, "Screening Design of Experiment (DOE) Applied to Supercritical Antisolvent Process," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 39, pp. 4178–4184, 2000.

[70] S. Raymundo, P. Horta, and R. Fett, "Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil," *Rev. Bras. Ciências Farm.*, vol. 40, no. 1998, pp. 495–503, 2004.

[71] S. S. Georgieva, J. A. P. Coelho, F. C. Campos, M. P. Robalo, and R. P. Stateva, "Green extraction of high added value substances from spent coffee grounds: Preliminary results," *J. Chem. Technol. Metall.*, vol. 53, no. 4, pp. 640–646, 2018.

[72] F. Dahmoune, B. Nayak, K. Moussi, H. Remini, and K. Madani, "Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from Myrtus communis L. leaves," *Food Chem.*, vol. 166, pp. 585–595, 2015.

[73] G. Bobo-García *et al.*, "Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison

with conventional spectrophotometric methods," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 95, no. 1, pp. 204–209, 2015.

[74] P. N. Marinhos and B. Marinha, "Antioxidant potential and cytotoxic activity of two red seaweed species , Amansia multifida and Meristiella echinocarpa , from the coast of Northeastern Brazil," vol. 86, pp. 251–263, 2014.

[75] F. S. Reis, E. Pereira, L. Barros, M. J. Sousa, A. Martins, and I. C. F. R. Ferreira, "Biomolecule profiles in inedible wild mushrooms with antioxidant value," *Molecules*, vol. 16, no. 6, pp. 4328–4338, 2011.

[76] A. Augusto, J. Dias, M. Campos, N. Alves, R. Pedrosa, and S. Silva, "Influence of Codium tomentosum Extract in the Properties of Alginate and Chitosan Edible Films," *Foods*, vol. 7, no. 4, p. 53, 2018.

[77] M. B. Perez-Gago, M. Serra, M. Alonso, M. Mateos, and M. A. Del Río, "Effect of whey protein- and hydroxypropyl methylcellulose-based edible composite coatings on color change of fresh-cut apples," *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 36, no. 1, pp. 77–85, 2005.

[78] A. Augusto, T. Simões, R. Pedrosa, and S. F. J. Silva, "Evaluation of seaweed extracts functionality as post-harvest treatment for minimally processed Fuji apples," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 33, pp. 589–595, 2016.

[79] C. B. Hartmut K. Lichtenthaler, H. K. Lichtenthaler, and C. Buschmann, "Chlorophylls and Carotenoids : Measurement and Characterization by UV-VIS," *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.*, pp. 1–8, 2001.

[80] Ş. Dere, "Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A , B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents," vol. 22, pp. 13–17, 1998.

[81] D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, 8th ed. Arizona: Wiley, 2013.

[82] F. F. Amaral, F. A. de Almeida, S. C. Costa, R. C. Leme, and A. P. de Paiva, "Aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta para Otimização do Processo de Solda a Ponto no Aço Galvanizado AISI 1006," *Soldag. Inspeção*, vol. 23, no. 2, pp. 129–142, 2018.

[83] F. Dahmoune, G. Spigno, K. Moussi, H. Remini, A. Cherbal, and K. Madani, "Pistacia lentiscus leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction," *Ind. Crops Prod.*, vol. 61, pp. 31–40, 2014.

[84] K. M. Ara, M. Karami, and F. Raofie, “Application of response surface methodology for the optimization of supercritical carbon dioxide extraction and ultrasound-assisted extraction of Capparis spinosa seed oil,” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 85, pp. 173–182, 2014.

[85] G. Khalili, A. Mazloomifar, K. Larijani, and M. Saber, “Solvent-free microwave extraction of essential oils from Thymus vulgaris L . and Melissa o ffi cinalis L .,” *Ind. Crop. Prod.*, vol. 119, no. September 2017, pp. 214–217, 2018.

[86] H. Karazhiyan, S. M. A. Razavi, and G. O. Phillips, “Extraction optimization of a hydrocolloid extract from cress seed (Lepidium sativum) using response surface methodology,” *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 5, pp. 915–920, 2011.

[87] W. Chen, W. P. Wang, H. S. Zhang, and Q. Huang, “Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from Boletus edulis mycelia using response surface methodology,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 87, no. 1, pp. 614–619, 2012.

[88] F. A. de Almeida *et al.*, “A weighted mean square error approach to the robust optimization of the surface roughness in an AISI 12L14 free-machining steel-turning process,” *J. Mech. Eng.*, vol. 64, no. 3, pp. 147–156, 2018.

[89] J. H. Daroz Gaudêncio, F. A. de Almeida, J. B. Turrioni, R. da Costa Quinino, P. P. Balestrassi, and A. P. de Paiva, “A multiobjective optimization model for machining quality in the AISI 12L14 steel turning process using fuzzy multivariate mean square error,” *Precis. Eng.*, vol. 56, no. January, pp. 303–320, 2019.

7. ANEXOS

ANEXO A – Resultados obtidos na obtenção do extrato supercrítico

Tabela 28 - Resultados obtidos na Extração Supercrítica com CO_2, a 400 bar e 60ºC.

Ensaios	Tempo (min)	Volume CO_2 (L)	Massa extraída (g)	Rendimento (%)
1	18,00	15,18	0,074	0,755
2	15,00	13,78	0,022	0,225
3	22,90	20,63	0,012	0,126
4	40,00	35,25	0,013	0,138
5	60,00	56,30	0,011	0,202
6	60,00	53,74	0,020	0,209
7	60,00	62,05	0,022	0,227

Tabela 29 – Resultados obtidos na Extração Supercrítica com CO_2, a 550 bar e 60ºC.

Ensaios	Tempo (min)	Volume CO_2 (L)	Massa extraída (g)	Rendimento (%)
1	23,18	15,90	0,018	0,185
2	23,25	20,52	0,015	0,159
3	35,08	30,52	0,001	0,099
4	45,17	39,89	0,004	0,039
5	60,25	57,55	0,013	0,132
6	60,17	56,40	0,001	0,006

Tabela 30 - Resultados obtidos na Extração Supercrítica com CO_2, a 400 bar, 40ºC e 10 % de etanol.

Ensaios	Tempo (min)	Volume CO_2 (L)	Massa extraída (g)	Rendimento (%)
1	18,87	12,44	0,064	0,784
2	22,72	15,23	0,048	0,588
3	29,87	20,45	0,011	0,132
4	29,87	19,25	0,005	0,057

Tabela 31 – Resultados obtidos na Extração Supercrítica com CO_2, a 400 bar, 40ºC e 10 % de etanol.

Ensaios	Tempo (min)	Volume CO_2 (L)	Massa extraída (g)	Rendimento (%)
1	22,88	3,457	0,013	0,171
2	20,08	7,093	0,018	0,235
3	21,30	7,263	0,016	0,199
4	23,95	8,383	0,035	0,442
5	26,35	8,189	0,020	0,260

ANEXO B – Resultados obtidos na obtenção do extrato em PLE

Tabela 32 - Resultados obtidos no PLE a 200 bar, 40ºC e 1L/min.

Ensaios	Volume (mL)	Massa extraído (g)	Rendimento (%)
1	9,5	0,081	2,012
2	8,5	0,082	2,057
3	10,0	0,080	1,990
4	11	0,059	1,472
5	14	0,049	1,220

ANEXO C – Curvas de calibração e parâmetros da regressão linear, relativo aos diferentes métodos de caraterização dos extratos

- **DPPH**

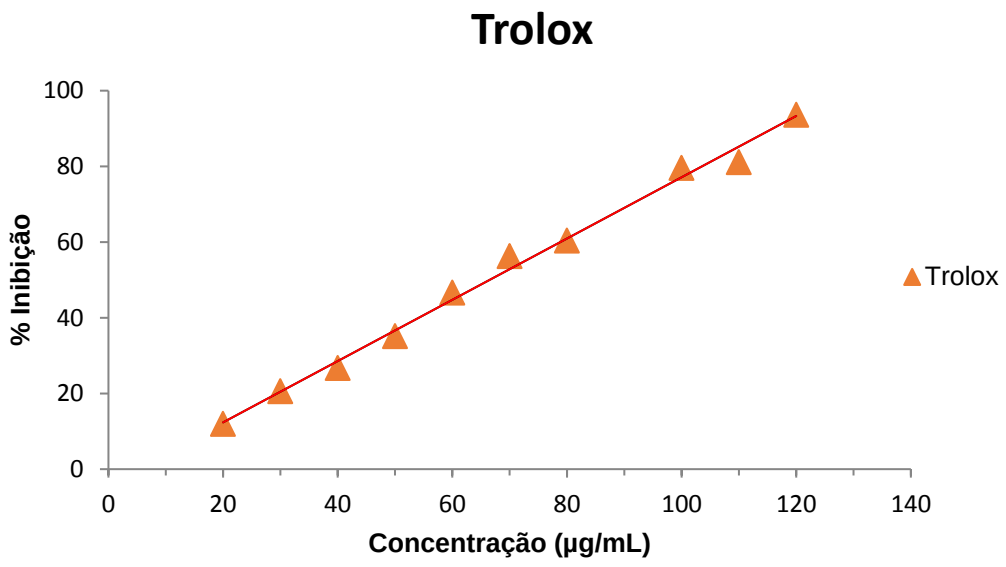

Figura 21 - Curvas de calibração e regressão linear para o antioxidante Trolox referente ao método do DPPH.

Tabela 33 - Parâmetros referentes à regressão ANOVA para o antioxidante, Trolox pelo método de DPPH.

$y = a + bx$		
Trolox	Ordenada na origem	-3,836 ± 3,993
	Declínio	8,10 E-01 ± 5,30 E-02
	R quadrado	0,994
	Erro padrão da correlação y/x	2,361
	Limite de deteção	6,42 µg/mL
	Limite de Quantificação	21,39 µg/mL

➢ **ABTS**

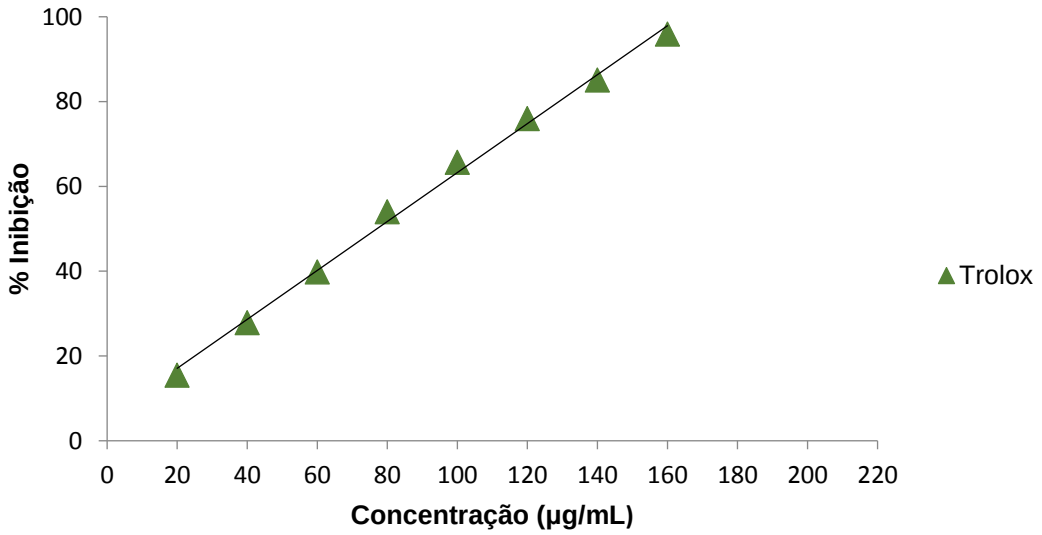

Figura 22 - Curvas de calibração e regressão linear para o antioxidante Trolox referente ao método do ABTS.

Tabela 34 - Parâmetros referentes à regressão ANOVA para o antioxidante, Trolox pelo método do ABTS.

$y = a + bx$		
Trolox	Ordenada na origem	5,550 ± 3,614
	Declínio	5,77E-01 ± 3,58E-02
	R quadrado	0,996
	Erro padrão da correlação y/x	1,895
	Limite de deteção	7,68 µg/ml
	Limite de Quantificação	25,59 µg/ml

➢ **Ferro**

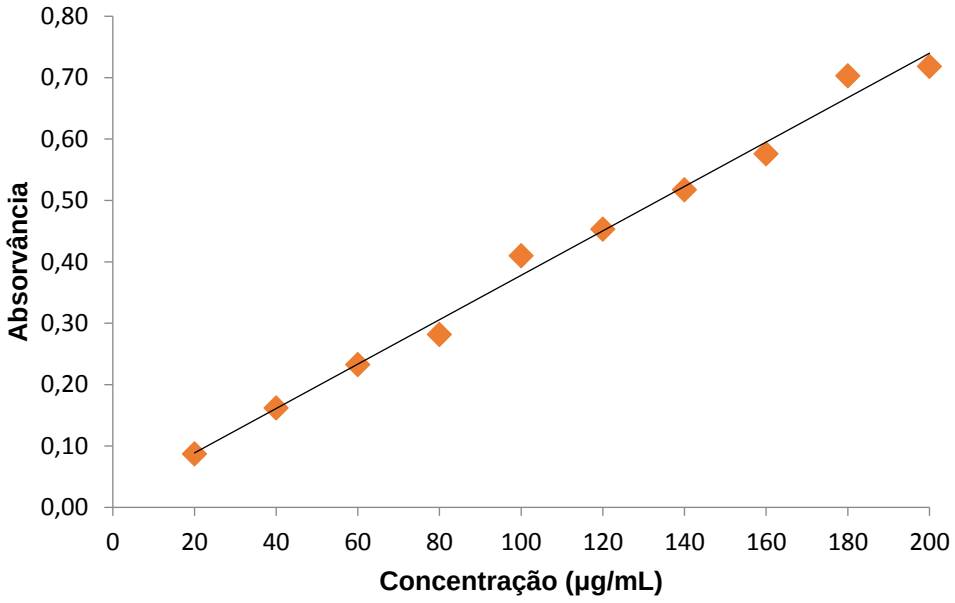

Figura 23 - Curva de calibração e regressão linear para o antioxidante Trolox, para o método de redução do ião ferro.

Tabela 35 - Parâmetros referentes à regressão ANOVA para o antioxidante Trolox pelo método da redução do ião ferro.

	$y = a + bx$	
Trolox	Ordenada na origem	1.63E-02 ± 3,40E-02
	Declínio	3,62E-03 ± 2,74E-04
	R quadrado	0,991
	Erro padrão da correlação y/x	2,16E-02
	Limite de deteção	12,13 µg/ml
	Limite de Quantificação	40,82 µg/ml

- **Polifenóis**

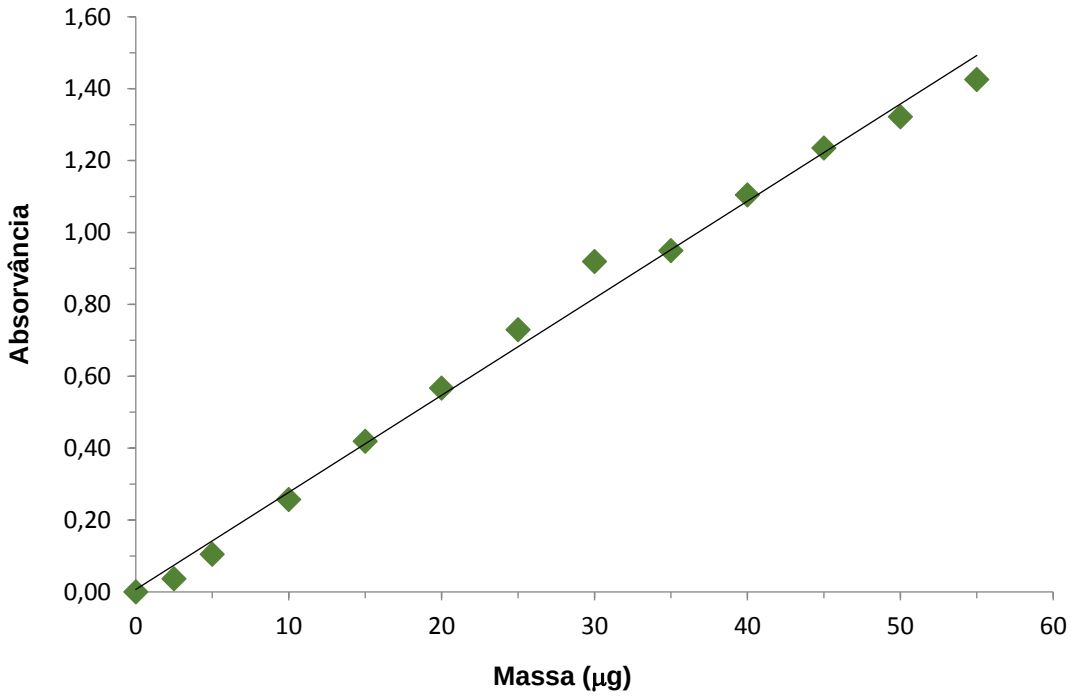

Figura 24 - Curva de calibração e regressão linear para o Ácido Gálico, para o método do teor em polifenóis.

Tabela 36 - Parâmetros referentes à regressão ANOVA para o Ácido Gálico, para determinação do teor em polifenóis.

$y = a + bx$		
Ácido Gálico	Ordenada na origem	9,01E-03 ± 1,803E-03
	Declínio	2,695E-02 ± 5,855E-02
	R quadrado	0,991
	Erro padrão da correlação y/x	4,047E-02
	Limite de deteção	2,92 µg
	Limite de Quantificação	9,75 µg

- **Flavonoides**

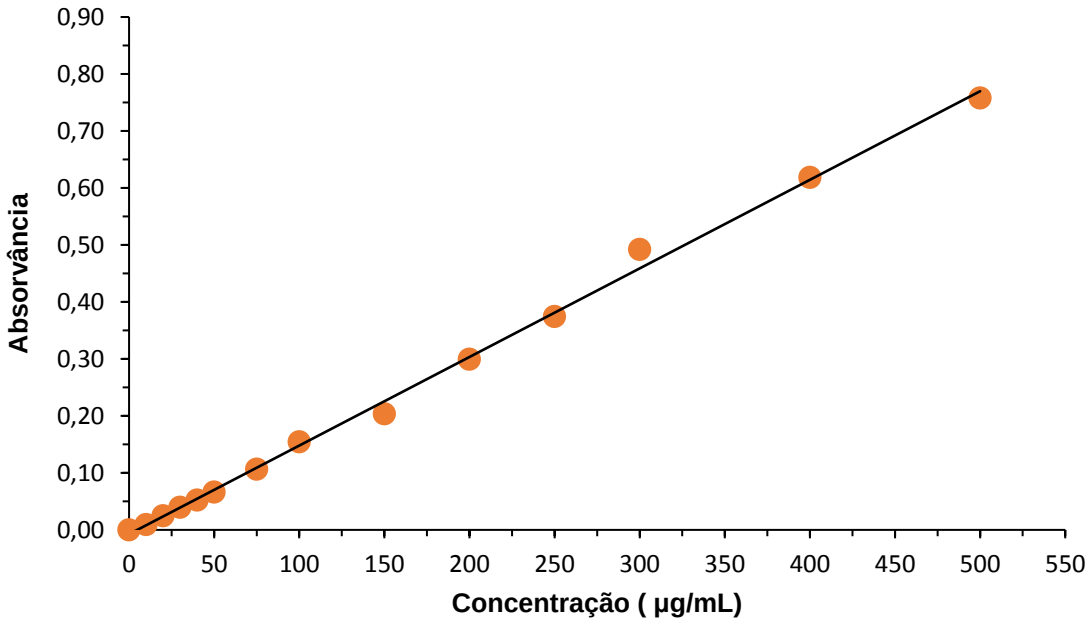

Figura 25 - Curva de calibração e regressão linear utilizando catequina, para o método do teor em flavonoides.

Tabela 37 - Parâmetros referentes à regressão ANOVA para a catequina para determinação do teor em flavonoides.

$y = a + bx$		
Catequina	Ordenada na origem	8,75E-03 ± 1,171E-02
	Declínio	1,56E-03 ± 5,30E-05
	R quadrado	0,997
	Erro padrão da correlação y/x	1,304E-02
	Limite de deteção	10,24 µg/ml
	Limite de Quantificação	34,13 µg/ml

ANEXO D – Índice de escurecimento

Tabela 38 - Médias das leituras lidas e valores determinados do índice de escurecimento no instante inicial.

	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	BI
Controlo	21,874	2,302	17,593	179,10
Amostra A	10,526	-0,158	14,913	575,48
Amostra B	21,759	-0,366	18,892	163,30
Amostra C	20,618	-1,769	18,882	166,14
Amostra D	17,159	-3,346	18,793	258,21

Tabela 39 - Médias das leituras lidas e valores determinados do índice de escurecimento após 15 minutos.

	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	BI
Controlo	16,757	3,614	18,947	327,11
Amostra A	13,132	2,072	16,741	433,17
Amostra B	22,024	-0,331	18,463	148,40
Amostra C	15,833	-0,927	18,001	293,15
Amostra D	16,626	-1,087	17,872	298,07

Tabela 40 - Médias das leituras lidas e valores determinados do índice de escurecimento após 30 minutos.

	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	BI
Controlo	32,749	4,109	22,687	139,47
Amostra A	27,408	2,899	20,751	143,31
Amostra B	35,747	0,269	20,725	86,97
Amostra C	37,363	0,324	20,534	77,50
Amostra D	35,414	-0,954	21,461	84,66

ANEXO E – Divulgação de trabalho realizado para a comunidade científica

Comunicação em poster

- ‘’Extração da *Codium Tomentosum”,* P. Castro, M.P. Robalo, J.P. Coelho. **iFEQB 2019– Fórum de Engenharia Química e Biológica**, 7-9 Maio, ISEL. Lisboa, Portugal;
- “On the Microwave Assisted Extraction of High Added Value Compounds from Spent Coffee Grounds”, J.A.P. Coelho, S. Boyadjieva, M. P. Robalo, P. Castro, R.P. Stateva. **Tenth Jubilee National Conference on Chemistry. 2019 International Year of the Periodic Table of Chemical Elements**, 26-28 September 2019, House of Science and Technology Federation of the Scientific Engineering Unions, Sofia, Bulgaria.