

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CARLOS HENRIQUE KOSLINSKI SANTOS

**OTIMIZAÇÃO MULTIOBJETIVO DA EXTRAÇÃO DE
ANTIOXIDANTES DO RESÍDUO DA CASCA DE PINHÃO (*Araucaria
angustifolia* (Bertol.) Kuntze)**

DISSERTAÇÃO

CAMPO MOURÃO

2016

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CARLOS HENRIQUE KOSLINSKI SANTOS

**OTIMIZAÇÃO MULTI OBJETIVO DA EXTRAÇÃO DE
ANTIOXIDANTES DO RESÍDUO DA CASCA DE PINHÃO (*Araucaria
angustifolia* (Bertol.) Kuntze)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Fernanda Vitória Leimann
Co-orientador: Dr. Marcos Vieira da Silva

CAMPO MOURÃO

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S237o

Santos, Carlos Henrique Koslinski

Otimização multiobjetivo da extração de antioxidantes do resíduo da casca de pinhão (*Araucária Angustifolia* (Bertol.) Kuntze) / Carlos Henrique Koslinski Santos – 2016.

50 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fernanda Vitória Leimann

Coorientador: Dr. Marcos Vieira da Silva

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Campo Mourão, 2016.

Inclui bibliografias.

1. Araucária. 2. Antioxidante. 3. Fenóis. 4. Alimentos – Dissertações. I. Leimann, Fernanda Vitória, orient. II. Silva, Marcos Vieira da, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. III. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira
Fernanda Cristina Gazolla Bem dos Santos CRB: 9-1735



TERMO DE APROVAÇÃO

OTIMIZAÇÃO MULTI OBJETIVO DA EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES DO RESÍDUO DA CASCA DE PINHÃO (*Araucária angustifolia* (Bertol.) Kuntze)

Por

CARLOS HENRIQUE KOSLINSKI SANTOS

Essa dissertação foi apresentada às catorze horas, do dia quinze de dezembro de dois mil e dezesseis como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof.^a Dra. Fernanda Vitória Leimann (Orientadora – PPGTA)

Prof. Dr. Evandro Bona (Membro Interno – PPGTA)

Prof. Dr. Rafael Porto Ineu (Membro Externo – UTFPR – CM)

Prof. Dr. Lucio Cardozo Filho (Membro Externo – UEM)

* A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela sabedoria e paciência nos momentos necessários, a minha família que esteve comigo nos momentos difíceis e agradáveis, permitindo o desenvolvimento deste trabalho. Aos colegas de mestrado pelo convívio e afeto, em especial a Larissa Rocha, Melina, Fernanda, Amanda, Alexandre, Jessica e a Luiza. Agradecimentos aos amigos que fiz, que me proporcionaram alívio e confiança para prosseguir.

Agradeço a minha orientadora professora Dra. Fernanda Vitória Leimann, pelo apoio, auxílio e supervisão, sempre colocando foco e direcionamento durante todo projeto. Ao meu co-orientador Dr. Marcos Vieira da Silva, pela ajuda indispensável durante o desenvolvimento das análises antioxidantes, como também durante todo processo de extração e desenvolvimento do planejamento juntamente com minha orientadora. Aos alunos e colegas Daiane Andrade e Michel que dispuseram de tempo para participar do projeto e ajudar nas análises. Agradeço aos professores do programa que contribuirão para o meu crescimento intelectual e como profissional, em especial ao professor Dr. Evandro Bona, pela ajuda enriquecedora e contribuições indispensáveis no processo de otimização e revisão da parte do planejamento experimental e tratamento estatístico. Aos profissionais e demais envolvidos no projeto que contribuirão indireta e diretamente no trabalho, em destaque a Professora Dra. Isabel Ferreira do Instituto Politécnico de Bragança pelas análises de HPLC-UV-VIS/MS, ao técnico Alexandre José Gonçalves do CMCM (Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais), UTFPR-Campus Curitiba pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

RESUMO

KOSLINSKI, C.H.S. Otimização Multiobjetivo da Extração de Compostos Antioxidantes da do resíduo da casca de semente de pinhão (*Araucária angustifolia* (Bertol.) Kuntze). 2016 – Dissertação (mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2016.

A procura por novas formas de conservação de alimentos é uma alternativa para minimizar o uso abusivo de conservantes, que em muitos casos são prejudiciais à saúde. Os compostos fenólicos, principalmente os antioxidantes naturais, tem um papel em destaque na nutrição humana. A casca da semente de pinhão (*Araucária angustifolia* (Bertol.) Kuntze) é um resíduo que pouco aproveitado e que apresenta em sua constituição compostos com atividade antioxidante. A proposta do presente trabalho foi o estudo da extração destes compostos através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) envolvendo a proporção entre a casca e o solvente (X_1), proporção entre os solventes de extração (água e etanol, X_2) e a temperatura de extração (X_3). Foi utilizado o método de extração assistida por Ultra-Turrax (sistema rotor-estator) e os resultados foram avaliados quanto à atividade antioxidante frente ao radical DPPH (equivalente em Trolox, ET), a compostos fenólicos totais (CFT, equivalente em ácido gálico, EAG) e o rendimento em volume da extração (% em relação ao volume de solvente de extração). A última resposta foi considerada com finalidade de avaliar a retenção de extrato pela matriz sólida, devido ao possível inchamento das fibras da casca de pinhão. Os resultados obtidos foram de até $354,21 \mu\text{molET.g}^{-1}$ para DPPH ($X_1 = 8,75 \text{g}_{\text{casca}}.100\text{mL}^{-1}$, $X_2 = 38,07 \% \text{ etanol}$ e $X_3 = 42,5^\circ\text{C}$), $7304,64 \text{mgEAC}.100\text{g}^{-1}$ para CFT ($X_1 = 5\text{g}_{\text{casca}}.100\text{mL}^{-1}$, $X_2 = 50 \% \text{ etanol}$ e $X_3 = 55^\circ\text{C}$) e 80% de rendimento ($X_1 = 2,44\text{g}_{\text{casca}}.100\text{mL}^{-1}$, $X_2 = 67,5 \% \text{ etanol}$ e $X_3 = 42,5^\circ\text{C}$). Os modelos preditivos para as respostas foram significativos ($R^2_{\text{adj}} > 0,78$), não apresentando falta de ajuste. Para a resposta de CFT foi possível verificar significância ($p < 0,05$) dos fatores X_1 , X_2 , X_2^2 e X_3 sem interações significativas ($p > 0,05$). Já para o modelo de DPPH os fatores que apresentaram significância foram X_1^2 , X_2 , X_3 e a interação entre X_2X_3 . O rendimento em volume apresentou influência significativa de X_1 e X_2 bem como da interação entre X_2X_3 . Os resultados dos modelos demonstraram que o rendimento em volume foi potencializado com o aumento do etanol na solução extratora, sendo este comportamento distinto das respostas de caráter antioxidante. A otimização foi realizada visando a maximização das variáveis respostas, utilizando a função de desejabilidade para unificar os modelos das mesmas, possibilitando a utilização do algoritmo simplex sequencial para determinar a condição ótima. Dentre as condições avaliadas, com a condição de mesma importância para as variáveis (desejabilidades individuais 1-1-1), foi possível maximizar todas as respostas utilizando $X_1 = 2,45\text{g}_{\text{casca}}.100\text{mL}^{-1}$, $X_2 = 44,75 \% \text{ etanol}$ e $X_3 = 63,51^\circ\text{C}$. Os resultados foram validados experimentalmente sendo iguais a $7777,84 \text{mgEAG}.100\text{g}^{-1}$ para CFT, $378,66 \mu\text{molET.g}^{-1}$ para DPPH e de 68% para o rendimento em volume. O inchamento da matriz vegetal foi verificado por imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura, sendo observado o dilaceramento da matriz vegetal por atuação do sistema rotor-estator que proporciona elevado cisalhamento, além de acentuado significativamente pelo aumento na concentração de água e elevação da temperatura de extração, conforme demonstrado pelos efeitos significativos determinado pelo modelo de resposta do DCCR. Os extratos obtidos com a aplicação das condições experimentais ótimas do DCCR foram avaliados por HPLC-UV-VIS/MS quanto aos compostos fenólicos presentes. O composto identificado em maior concentração foi a + catequina com $13,13 \text{m.g}^{-1}$ para a condição experimental onde $X_1 = 12,5 \text{g}_{\text{casca}}.100\text{mL}^{-1}$, $X_2 = 30 \% \text{ etanol}$ e $X_3 = 30^\circ\text{C}$. O processo de otimização foi um sucesso, podendo ser aplicável a outros compostos.

Palavras-chave: Otimização multiobjetivo. *Araucária angustifolia*. Atividade Antioxidante. DPPH. Compostos fenólicos. Algoritmo Simplex sequencial.

ABSTRACT

KOSLINSKI, C.H.S. Multiobjective optimization of antioxidant compound extraction from residues of pinhão seed shell (*Araucária angustifolia* (Bertol.) Kuntze). 2016 – Dissertação (mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2016.

The search for new food preservation methods is an alternative to minimize the abusive use of conservatives, which in many cases present negative health effects. Phenolic compounds mainly natural antioxidants play an important role in human nutrition. Pinhão seed (*Araucária angustifolia* (Bertol.) Kuntze) shells is a solid waste which is underestimated while presenting constituents with antioxidant properties. The objective of this work was to study the extraction of such compounds from pinhão shells using the Rotational Central Composite Design (RCCD) with the following variables: shell:solvent proportion (X_1), solvent composition (water and ethanol proportion, X_2) and extraction temperature (X_3). Extraction was carried out with a high energy Ultra-Turrax stirrer and the evaluated responses were DPPH antioxidant activity (Trolox equivalent, TE), total phenolic content (TPC, acid galic equivalent, AGE) and extraction volumetric yield. The later response was considered in order to evaluate the extract retention in the fibrous matrix due to the shell fibers swelling. Results obtained were 354.21 $\mu\text{molTE.g}^{-1}$ para DPPH ($X_1 = 8.75 \text{g}_{\text{shell}}.100\text{mL}^{-1}$, $X_2 = 38.07 \%_{\text{ethanol}}$ e $X_3 = 42.5^\circ\text{C}$), 7304.64 $\text{mgAGE}.100\text{g}^{-1}$ para TPC ($X_1 = 5 \text{g}_{\text{shell}}.100\text{mL}^{-1}$, $X_2 = 50 \%_{\text{ethanol}}$ e $X_3 = 55^\circ\text{C}$) e 80% yield ($X_1 = 2.44 \text{g}_{\text{casca}}.100\text{mL}^{-1}$, $X_2 = 67.5 \%_{\text{ethanol}}$ e $X_3 = 42.5^\circ\text{C}$). Predictive models to the responses were statistically significant ($R^2 \text{ adj} > 0,78$) without lack of fit. The significant effects for TPC were X_1 , X_2 , X_2^2 e X_3 , with no significant interaction with each other. For the DPPH model the significant effects were X_1^2 , X_2 , X_3 as well as the interaction between X_2 and X_3 . For the extraction yield model the significant effects were X_1 e X_2 as well as the interaction between X_2 and X_3 . Also, model showed that extraction yield is higher for high ethanol to water proportions, with the opposite effect on the other responses. Optimization was carried out to maximize the evaluated responses using a desirability function to unify all three models and thus using a sequential simplex algorithm to find the optimized condition. Considering the same importance to all variables (individual desirability 1-1-1) it was possible to maximize them using the following conditions: $X_1 = 2.45 \text{g}_{\text{shell}}.100\text{mL}^{-1}$, $X_2 = 44.75 \%_{\text{ethanol}}$ e $X_3 = 63.51^\circ\text{C}$. For these conditions, the responses were experimentally validated as being 7777.84 $\text{mgGAE}.100\text{g}^{-1}$, 378.66 $\mu\text{molTE.g}^{-1}$, and 68% extraction yield. Shell fibers swelling was verified by Scanning Electron Microscopy caused by the high energy of the Ultra-Turrax system and increased due to the increase in water and temperature as demonstrated by the RCCD model. Extracts obtained under the optimized conditions were evaluated by HPLC-UV-VIS/MS to determine their phenolic compounds. + Catequin was the major component found in the extracts at 13.13 m.g^{-1} for $X_1 = 12.5 \text{g}_{\text{shell}}.100\text{mL}^{-1}$, $X_2 = 30 \%_{\text{ethanol}}$ e $X_3 = 30^\circ\text{C}$. The optimization process was successfully performed and applied to other compounds.

Keywords: multiobjective optimization. *Araucária angustifolia*. Antioxidant activity. DPPH, Phenolic compounds. Sequential simplex algorithm.

Lista de Siglas

CDD: Central Composite Design – Planejamento Central Composto

PC: Ponto Central

LI: Limite Inferior

LS: Limite Superior

d: Desejabilidade Individual

D: Desejabilidade Global

DPPH: 2,2- difenil-1-picrilhidrazil

TROLOX: Ácido 2-carboxilico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano

CTF: Conteúdo Total de Fenólicos

ATD: Atividade Antioxidante relacionada ao radical DPPH

RVE: Rendimento em volume de extrato

HPLC: High Performance Liquid Chromatography – Cromatografia líquida de alta performance

DAD: Diode Array Detector – Detector Arranjo de Diodos

ESI: Eletrospray Ionization

ANOVA: Análise de Variância

p-Valor: Probabilidade de erro tipo I

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

Lista de Figuras

FIGURA 1. Araucária angustifolia (Bertol.) Kuntze, pinha composta por pinhões e cascas de pinhões	14
FIGURA 2. Estrutura química genérica dos flavonoides e da catequina	17
FIGURA 3. Estruturas químicas dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico.	17
FIGURA 4. Representação estrutural da molécula de quercetina.	18
FIGURA 5. Princípio de dispersão em um sistema tipo rotor-estator	19
FIGURA 6. Representação gráfica de CCD	20
FIGURA 7. Fluxograma do procedimento de otimização multiobjetivo	28
FIGURA 8. Gráficos de contorno para as respostas:	32
FIGURA 9. Perfil fenólico dos extratos de resíduo de casca de <i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze	36
FIGURA 10. Micrografias das cascas de pinhão.....	41

Lista de Tabelas

TABELA 1. CCD para extração dos compostos fenólicos da casca do pinhão.....	25
TABELA 2.Resultados experimentais para as respostas CTF, ATD e RVE obtidos para os pontos do CCD.	29
TABELA 3.Coefficientes de regressão dos modelos preditivos para as respostas.	30
TABELA 4.Análise de variância para os modelos CTF, ATD e RVE com 95% de confiança.	31
TABELA 5.Resultados de intervalo de confiança dos modelos (IC a 95% de confiança) para a otimização multiobjetivo das respostas combinadas (CTF, ATD e RVE)	35
TABELA 6.Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região visível (λ_{max}), dados espectrais de massa e tentativa de identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos hidrometanólicos de <i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze.	39
TABELA 7.Quantificação de compostos fenólicos (mg.g-1) em extratos de <i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze (Média \pm DP).	40

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 <i>Araucária angustifolia</i> e pinhão	15
3.2 Antioxidantes e técnicas de avaliação	17
3.2.1 Radicais livres e Antioxidantes	17
3.2.2 Compostos fenólicos.....	18
3.3 Extração de compostos bioativos assistida por Ultra-Turrax	20
3.4 Delineamento Composto Central Rotacional	22
3.5 Otimização Multiobjetivo e algoritmo <i>simplex</i> sequencial com restrições	23
3.5.1 Função de desejabilidade	23
3.5.2 Algoritmo <i>simplex</i>	25
4 METODOLOGIA	26
4.1 Materiais	26
4.2 Métodos	26
4.2.1 Preparação das cascas de pinhão	26
4.2.2 Extração dos compostos antioxidantes	26
4.3 Caracterização dos extratos	28
4.3.1 Determinação do rendimento em volume de extrato.....	28
4.3.2 Conteúdo Total de Fenólicos	28
4.3.3 DPPH	29
4.3.4 Determinação do modelo experimental	29
4.3.5 Otimização Multiobjetivo e Função de desejabilidade.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5.1 Análise do planejamento experimental	31
5.2 Otimização dos parâmetros de extração e validação.....	36
5.3 Perfil dos extratos do resíduo da casca de pinhão	38
5.4 Caracterização Morfológica Do Resíduo Das Cascas De Pinhão Após E Extração	41
6 CONCLUSÃO	43
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

A procura por novas formas de conservação de alimentos é uma alternativa positiva para minimizar o uso abusivo de conservantes, que em muitos casos são prejudiciais à saúde. Os compostos fenólicos, principalmente os antioxidantes naturais, efetuam um papel em destaque na nutrição humana incluindo-se na categoria de alimentos de origem vegetal, com o objetivo de melhorar a saúde por meio da alimentação. Estes compostos atuam protegendo algumas biomoléculas importantes (como o DNA, proteínas e lipídios) do potencial oxidativo ocasionado pelas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (PENG et al., 2010; SWIECA et al., 2014).

A *Araucária angustifolia* é uma árvore conífera nativa da América do Sul, que se desenvolve na região sul e sudeste do Brasil, e no nordeste da Argentina (CONFORTI; LUPANO, 2008; DA SILVA et al., 2014). Sua semente, denominada de pinhão, é gerada sazonalmente no período de abril a agosto (CLADERA-OLIVERA et al., 2012; DA SILVA et al., 2014). A casca do pinhão não é muito aproveitada pela indústria de alimentos que utilizam essa semente, sendo assim descartada, ela por sua vez possui uma significativa concentração de polifenóis (DA SILVA et al., 2014; KOEHNLEIN et al., 2012; LIMA et al., 2007).

O uso da modelagem experimental vem de muito tempo, sua implementação nos processos experimentais se baseia na otimização dos dados obtidos (MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2009). A otimização de sistemas é um processo de ajuste para os fatores que os influenciam na tentativa de produzir o melhor resultado (resposta) (BONA et al., 2000). O uso dessa ferramenta na obtenção de compostos fenólicos é muito interessante, pois possibilita extrair maior concentração desses compostos naturais com o uso minimizado de solvente e reagentes, reduzindo custos, por meio da combinação de parâmetros analisados (variáveis) (FERREIRA, 2016). Podendo ser utilizado como ferramenta de otimização, a metodologia de superfície de resposta (RSM, *Response Surface Methodology*) (ILAIYARAJA et al., 2015), redes neurais artificiais (ANN, *Artificial Neural Network*) (SOUZA et al., 2015), e métodos Simplex (CERDÀ; CERDÀ; IDRIS, 2016).

Para isso, utiliza-se de planejamentos de experimentos para determinação dos modelos preditivos das variáveis dependentes analisadas. O Delineamento Composto Central (DCD,) consiste em um grupo de procedimentos, estatísticos e matemáticos, podendo ser usado no estudo das inter-relações entre uma ou mais respostas (variáveis dependentes) com inúmeros fatores (variáveis independentes). É uma técnica estatística baseada no emprego de

planejamentos fatoriais, estabelecida na década de 1950, tendo sido utilizada com eficiência na modelagem de diversos processos industriais (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010)

Tendo em vista a otimização de processos de extração e o potencial da casca de pinhão como fonte de antioxidantes, o objetivo do presente trabalho é a obtenção de extratos da casca residual de pinhão por extração assistida por ultra-turrax e determinação da condição de extração otimizada em termos do teor de compostos fenólicos totais, da atividade antioxidante frente ao radical do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e do rendimento da extração em volume de extrato.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi a otimização do processo de extração de compostos antioxidantes da casca de pinhão por meio de Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) com Otimização Multiobjetivo e caracterização dos extratos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinação dos efeitos das variáveis independentes: percentual de sólidos (casca de pinhão) em relação à mistura de solventes (etanol e água) ($m.v^{-1}$), concentração de etanol em relação à água no solvente (%) e temperatura de extração ($^{\circ}C$) combinadas pelo CCD, envolvidas na extração assistida por Ultra-Turrax dos compostos antioxidantes do resíduo da casca de pinhão
- Determinação do teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin Ciocalteu (CTF), da capacidade antioxidante frente ao método do DPPH e RVE;
- Otimização Multiobjetivo dos parâmetros de extração com o uso do algoritmo *simplex* sequencial adaptado em conjunto com a função de desejabilidade;
- Validação da condição ótima gerada pelo algoritmo;
- Determinação da composição dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrometria de Massas (HPLC-DAD-ESI/MS);
- Avaliação da morfologia das cascas após o processo de extração por Microscopia Eletrônica de Varredura.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Araucária angustifolia* e pinhão

A *Araucária angustifolia* (Bertol.) Kuntze é uma árvore dióica, que possui os sistemas reprodutores, masculinos e feminino, separados em árvores diferentes, ou seja há arvores masculinas e femininas (BRANCO et al., 2015; VELOSO; FILHO; LIMA, 1991). Pertencente á família das *Araucariaceae*, é um tipo de conífera primitiva do hemisfério sul originada no período Triássico (CATTANEO et al., 2013). As folhagens são simples, alternas, espiraladas, lineares a lanceoladas, coriáceas, com até 6 cm de comprimento por 10 mm de largura. Suas flores masculinas possuem de 10 a 22 cm de comprimento, por 2 a 5 cm de diâmetro. É uma árvore perenifólia, nativa da região sul e sudeste do Brasil, no nordeste da Argentina, Paraguai e Chile (HORNUNG et al., 2014; KUBASKI et al., 2015). No Brasil, estabelece-se principalmente na região do extremo sul dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (HUECK, 1972). Com aspecto original e imponência em relação às demais arvores do sul do Brasil, geralmente possui 10 a 35 metros de altura. Seu tronco é reto, colunar e quase cilindro com 20 metros de comprimento (CARVALHO, 2002). Possui anéis na sua estrutura lenhosa, o que evidencia o processo de crescimento, evidenciado pela diferenciação do xilema em lenhoso inicial e tardio. No lenho inicial, os traqueídes são alongados radialmente e com parede celular delgada, promovendo ao xilema uma coloração clara. Na parte tardia, essas estruturas são menores, achatadas radialmente e com parede celular espessa, caracterizando uma cor escura ao xilema (SANTAROSA et al., 2007).

A parte comestível (fruto) das sementes da *Araucária angustifolia* é denominada como pinhão (Figura 1 (b)), possui cerca de 36% de amido, 3% de proteína, 1% de lipídio, 2% de açúcares solúveis, e menos de 0,2% de fibras, minerais e compostos fenólicos (BELLO-PÉREZ et al., 2006; BICUDO et al., 2009), e a sua casca, denominada de bráctea, é comumente descartada como resíduo (Figura 1 (c)) (BRANCO et al., 2015). O pinhão possui grande potencial para aplicações na indústria de alimentos, e a literatura menciona sua utilização como substituto parcial ou total da farinha de trigo em biscoitos (ACORSI et al., 2012) e em pães com iogurte (FORLIN et al., 2009). O amido do pinhão também pode ser usado como agente de superfície, atuando como encapsulante para evitar a degradação de carotenoides (SPADA, 2011), e ainda empregado em filmes biodegradáveis de embalagens ativas (SILVA, 2011).



Figura 1. (a) *Araucária angustifolia* (Bertol.) Kuntze, foto por Juliana Gonçalves da Silva; (b) pinha composta por pinhões, foto por Anita Stival dos Santos (FONTE: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars>); (c) Cascas de pinhões (acervo próprio).

De acordo com Ribeiro, Santos e Bittencourt (2015), a semente de araucária representa uma porção expressiva na economia do estado do Paraná, sobretudo em regiões de maior pobreza. Há uma reconhecida informalidade na produção e o seu comércio está basicamente segmentado entre produtores, coletores, atacadistas, varejistas e consumidores finais. Todavia, já podem ser encontrados produtos industrializados à base de pinhão, como conservas (WWC, 2016; RIELLE CONSERVAS, 2016) e cervejas (CERVEJARIA CAMPOS DO JORDÃO, 2016). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2014) a produção extrativa de pinhão no estado do Paraná em 2012 chegou a 5,9 mil toneladas, gerando 8,9 milhões de Reais em renda para os produtores e coletores, sendo que estes valores representam 62% da produção nacional. Segundo dados disponibilizados pela empresa Riele Conservas, foram processados no ano de 2014 trinta e cinco toneladas de pinhão pela empresa.

A parte do revestimento do pinhão (casca) representa cerca de 20% do peso da semente e é considerada resíduo pela indústria. De acordo com (DAUDT et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015; BRANCO et al., 2015) o extrato da casca possui potencial antioxidante, atividade seletiva do extrato para as células cancerosas e redução de níveis de triglicerídeos. Daudt et al. (2015) efetuaram um estudo para verificar o emprego do extrato da casca e o amido em materiais encapsulantes, onde o extrato da casca apresentou uma quantidade de compostos fenólicos significativa, sendo seu uso considerado relevante como agente antioxidante.

Da Silva et al. (2014) aplicaram extratos obtidos a partir da casca de pinhão (70% etanol em água) como inibidor de α -amilase. Os autores observaram que a composição de taninos do extrato era rica em procianidinas (catequina, epicatequina e os seus ésteres de ácido gálico) e que este é um inibidor eficaz das α -amilases salivar humana e pancreática de porcos. Além disso, eles constataram que o extrato da casca de pinhão também foi eficaz na diminuição dos níveis de glicose no sangue de ratos após a administração de amido.

Oliveira et al. (2015) continuaram a investigação iniciada por Da Silva et al. (2014) e concluíram que o mesmo extrato de casca de pinhão foi eficaz em diminuir os níveis de triglicerídeos no plasma em ratos após a administração de azeite. Os autores sugeriram que este efeito foi provavelmente consequência de uma inibição indireta da absorção de triglicerídeos através da inibição da lipase pancreática. Branco et al. (2015) mostraram que extratos aquosos obtidos a partir da casca de pinhão induziram uma citotoxicidade significativa em células tumorais HEP-2 em comparação com células epiteliais não tumorais humanas (HEK-293), indicando uma atividade seletiva do extrato para as células cancerosas.

Outras aplicações da casca também podem ser encontradas, como no trabalho de Lima et al. (2007), que aplicaram a casca de pinhão como agente de adsorção de Cu (II). Os autores verificaram que a casca poderia ser utilizada em meio aquoso para remoção de corantes, e utilizados em aterros para remoção de Cu (II). Royer (2008) utilizou a casca de pinhão para remoção de corantes têxteis, o corante vermelho reativo 194 não hidrolisado (NRR) e o corante vermelho reativo 194 hidrolisado (HRR) em soluções aquosas.

3.2 Antioxidantes e técnicas de avaliação

3.2.1 Radicais livres e Antioxidantes

É considerado um radical livre, o composto que possuir um ou mais elétrons desemparelhados, podendo captar elétrons de outros compostos para se estabilizar, sendo assim altamente instáveis. As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são radicais que apresentam pelo menos um elétron não pareado (reativo), capaz de oxidar biomoléculas. Comumente são denominados oxidantes ou pro-oxidantes (GÜLÇİN, 2012), podendo ser inibido pela atuação de um composto antioxidante.

Um composto antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, em baixas concentrações, promove o atraso ou inibe a oxidação do substrato. Os compostos antioxidante são, por sua vez, classificados em duas classes de acordo com o mecanismo de atuação: os primários, ou antioxidantes de quebra da cadeia oxidativa, e os secundários, ou preventivos, que atuam na etapa de iniciação da reação de oxidação (ANTOLOVICH et al., 2002). Podem ser classificados em enzimáticos, englobando a Glutathione-Peroxidase, Catalase, Metionina-Redutase e Superóxido Dismutase (ARA et al., 2013; ZENGIN et al., 2015) e não enzimáticos. Os Antioxidantes não enzimáticos, em sua maioria são exógenos, ou seja, necessitam ser absorvidos pela alimentação apropriada. Podem ser divididos em: vitaminas lipossolúveis

(vitamina A, vitamina E, betacaroteno), vitaminas hidrossolúveis (vitamina C, vitaminas do complexo B), os oligoelementos (Zinco, cobre, selênio, magnésio etc.), os bioflavonóides (derivados de plantas), etc. (AL TANOURY et al., 2013; JUHÁSZ et al., 2012; MÁRQUEZ-SILLERO et al., 2013; TORKILDSEN et al., 2013).

Em relação à atuação nos alimentos, antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância capaz de retardar ou impedir o desenvolvimento de rancificação ou outra alteração desagradável em alimentos ocasionada pelas reações de oxidação. Comumente os antioxidantes naturais são preferidos pelos consumidores e podem receber a aprovação da legislação mais facilmente do que os aditivos sintéticos (GÜLÇIN, 2012). Compostos fenólicos são exemplos de antioxidantes naturais, que possui grande quantidade de estudos na literatura.

3.2.2 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são metabólitos secundários presentes em plantas, vegetais, frutas e efetuam papel relacionado com a pigmentação e proteção contra patógenos e agentes oxidativos. Existem mais de 10.000 compostos fenólicos diferentes, e sua identificação e análise são grandes indicativos de sua diversidade estrutural (ROTHWELLET al., 2014; VELÁZQUEZ et al., 2015).

Em termos químicos, os compostos fenólicos podem ser definidos como substâncias que possuem anel aromático com uma ou mais hidroxilas, juntamente com seu grupo funcional (LEE et al., 2005). Destacam-se flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos e tocoferóis (ANGELO; JORGE, 2007), podendo estar presente na forma livre ou ligada a açúcares (glicosídeos) e proteínas (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014).

Os flavonoides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal e nos alimentos, encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos e agliconas (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014). São compostos de baixo peso molecular, constituídos por 15 átomos de carbono, seguindo a organização $C_6 - C_3 - C_6$ (ANGELO; JORGE, 2007; SILVA et al., 2010).

A estrutura química dos flavonoides é constituída por dois anéis aromáticos (A e B) unidos por 3 carbonos que formam um anel heterocíclico (C) (Figura 2 (a)). O anel aromático A é derivado do ciclo acetato (malonato), enquanto o anel B é derivado da fenilalanina (MERKEN; BEECHER, 2000; QIAO-HUI et al., 2016; SAIT et al., 2015). As catequinas (Figura 2(b)) são compostos flavonoides hidrossolúveis, incolores e que contribuem para o sabor amargo e adstringente do chá verde (BALENTINE; WISEMAN; BOUWENS, 1997).

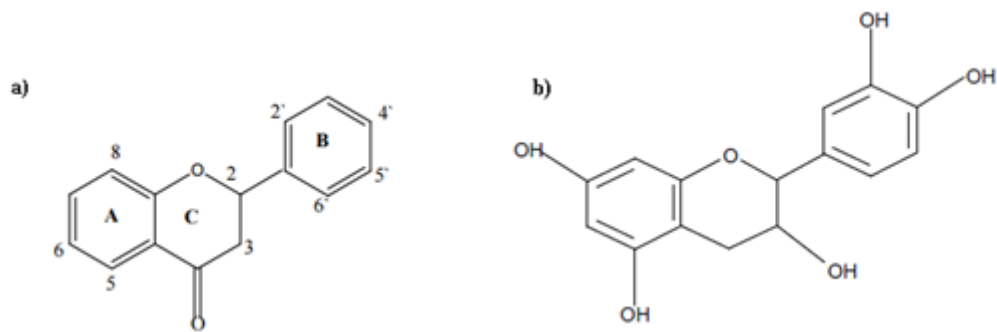


Figura 2. Estrutura química genérica dos flavonoides (a) e da catequina (b). Fonte: Adaptado de SILVA et al., (2010); DORNAS et al. (2008).

Os ácidos fenólicos são caracterizados por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxilas e/ou metoxila, conferindo as propriedades antioxidantes para os vegetais (SOARES, 2002). Eles consistem em dois grupos: os derivados do ácido hidroxibenzoico (incluindo os ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e sirínico) que contêm estrutura comum, C₆ – C₁ (Figura 3 (a)); e os compostos derivados do ácido hidroxicinâmico, que são formados por compostos aromáticos ligados a 3 carbonos que formam uma cadeia lateral C₆ – C₃ (Figura 3 (b)), integrando a esse grupo os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico (BRAVO, 1998). Os ácidos fenólicos ocorrem principalmente na natureza nas formas insolúveis ou ligadas (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014).

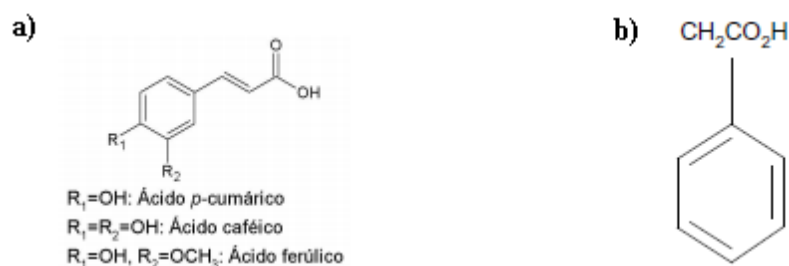


Figura 3. Estruturas químicas dos ácidos hidroxicinâmico (a) e hidroxibenzoico (b) Fonte: Adaptado de SILVA et al. (2010) e MOURA et al., (2011).

Os taninos são compostos polifenólicos que podem ser classificados em dois grandes grupos: os taninos condensados (proantocianidinas) e os hidrolisáveis que, por hidrólise ácida, liberam ácidos fenólicos, como o gálico, formado a partir do chiquimato, no qual o grupo hidroxila do açúcar é esterificado com os ácidos fenólicos (POZZAN; BRAGA; SALIBE, 2012).

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-2-flavona) é um flavonoide encontrado em flores e frutos, e possui várias propriedades biológicas relacionada a sua capacidade antioxidante e antirradicalar. Essa característica é influenciada pela sua alta reatividade como um agente doador de H^+ e elétrons, o que permite reduzir a presença de radicais livres. Possui a capacidade de quelar cátions metálicos, devido seus três possíveis sítios de interação: os grupos 3-hidroxi-4-ceto, 5-hidroxi-4-ceto e 13-14-orto-di-hidroxi no anel B, de acordo com a Figura 4. (SUN et al., 2008).

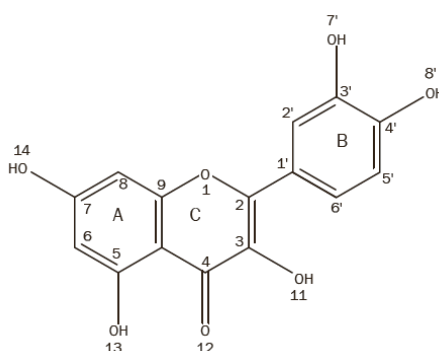


Figura 4. Representação estrutural da molécula de quercetina. Fonte: Adaptado de Sun et al, (2008).

A quercetina nos alimentos não se encontra na forma de agliconas, que são moléculas desprovidas de açúcares, mas sim glicosilada (glicosídeo). Com isso, a biodisponibilidade depende do tipo de glicosídeo presente no alimento. Apesar da crença comum, de que a forma livre poderia ser mais facilmente absorvida no intestino, por difusão passiva, devido a sua natureza hidrofóbica, estudos posteriores demonstram, que a forma glicosídica da quercetina tem uma absorção de quase duas vezes maior em comparação a sua forma aglicona (HOLLMAN et al., 1995; RUSSO et al., 2012). Os glicosídeos de quercetina possuem a capacidade de controlar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade por sequestrar os radicais livres, evitando a degradação dessas moléculas e que esses radicais consigam reagir com moléculas biológicas vivas e que venham causar doenças (JEEVITHA et al., 2016).

3.3 Extração de compostos bioativos assistida por Ultra-Turrax

Métodos não convencionais, que são considerados mais seguros ao meio ambiente devido à redução no uso de produtos e solventes sintéticos e orgânicos, tempo operacional reduzido e melhor rendimento bem como qualidade do extrato, têm sido desenvolvidos durante os últimos 50 anos (AZMIR et al., 2013). As metodologias podem ser divididas em convencionais: soxhlet, maceração e hidrodestilação; e em não convencionais: extração

assistida por ultrassom, extração em campo elétrico pulsado, extração assistida por enzimas, extração assistida por micro-ondas, extração supercrítica e extração assistida por Ultra-Turrax (AZMIR et al., 2013; HERRERO; CIFUENTES; IBÁÑEZ, 2006; VILKHU et al., 2008; XU et al., 2016).

A extração assistida por Ultra-Turrax (*Ultra-Turrax assisted extraction*), ou extração assistida por homogeneizador (*Homogenizer assisted extraction*) pode ser aplicada para a extração de compostos antioxidantes a partir de matrizes vegetais, como por exemplo da casca de banana (PEREIRA et al., 2016) e de sálvia vermelha (*Salvia splendens*) (BILGIN et al., 2013).

O ultra-homogeneizador é normalmente utilizado na homogeneização de amostras em condições de elevada velocidade. A elevada taxa de cisalhamento em poucos segundos promove a ruptura do material vegetal e, conseqüentemente, a liberação de compostos para o meio. Neste caso, a polaridade do composto alvo e do solvente utilizado podem ter grande efeito no rendimento da extração. O tempo necessário para extrair os compostos de interesse são extremamente curtos quando comparado a outros métodos, devido à elevada taxa de cisalhamento (PEREIRA et al., 2016).

A dispersão com um Ultra-Turrax é baseada no princípio de rotor-estator (Figura 5). Neste caso, o motor é movido com uma alta velocidade perimetral. A rotação produz uma sucção que puxa o meio para dentro do rotor e depois o empurra para fora com ajuda dos dentes do estator. Esse processo resulta na dispersão da amostra e leva à pulverização intensiva e momentânea de gotículas de líquido e/ou partículas sólidas (IKA, 2016).

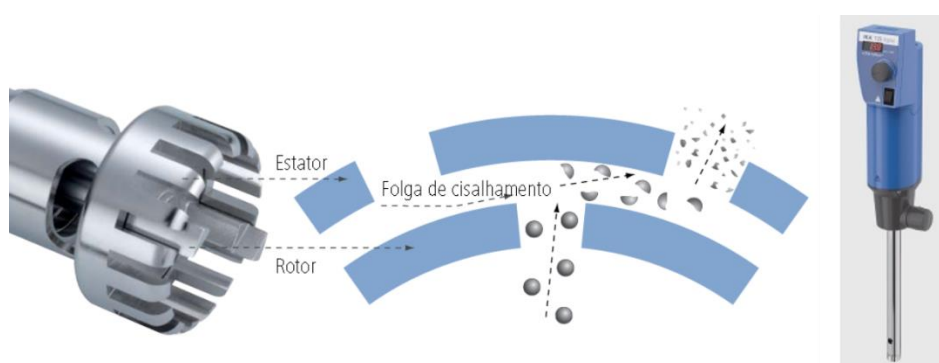


Figura 5. Princípio de dispersão em um sistema tipo rotor-estator (IKA, 2016).

Apesar de conhecido o mecanismo de cisalhamento do sistema rotor-estator nas amostras sólidas, não se encontram trabalhos descrevendo o seu efeito na matriz sólida de

extração. Diversos autores discutem o efeito do inchamento da matriz sólida em função da presença de água no solvente de extração que pode levar ao aumento do rendimento de extração uma vez que a difusão dos compostos no sólido apresenta resistência reduzida (AGUILERA, 2005; CRAVOTTO et al., 2008; ESPINOZA-PÉREZ et al., 2007; PAYNEL et al., 2013; PEREIRA et al., 2016), no entanto a influência do cisalhamento neste processo não foi ainda considerada.

3.4 Delineamento Composto Central Rotacional

O Delineamento Composto Central (CCD, *Central Composite Design*) é um delineamento fatorial de resolução de 5 ou maior (KIRAN et al., 2016). Esta metodologia permite não apenas otimizar como também reduzir o tempo de realização dos experimentos, diminuindo o número de experimentos necessários (DILER; IPEK, 2013; ZENG et al., 2016).

O CCD é uma abordagem na qual escolhidas as variáveis a serem consideradas, são estudadas as interações entre estas, no caso, os efeitos, por meio de várias combinações de variáveis dentro de limites inferiores e superiores de cada variável (faixa analítica), com isso podendo-se estudá-las simultaneamente. (KIRAN et al., 2016).

Na Figura 6 está representada a disposição gráfica de um CCD com duas (Figura 6 (a)) e três variáveis (Figura 6 (b)) incluindo o ponto central.

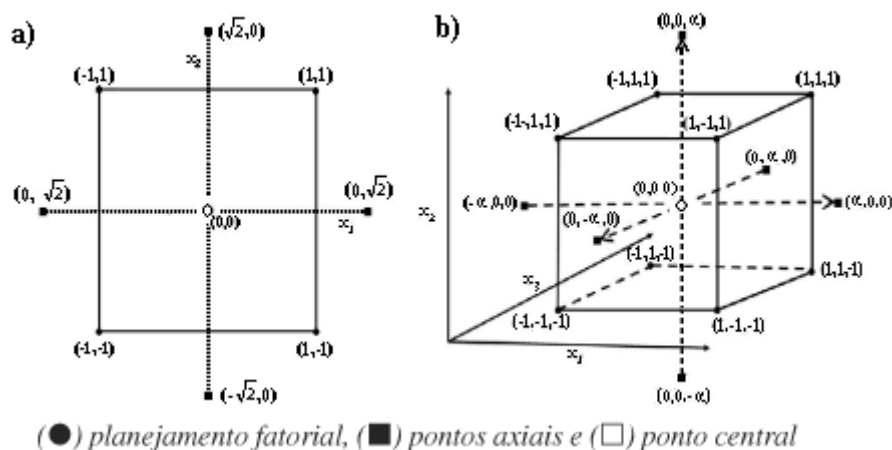


Figura 6. Representação gráfica de CCD com duas variáveis (a) $k = 2$ e $\alpha = 1,414$, e três variáveis (b) $k = 3$ e $\alpha = 1,682$. Fonte: Teófilo; Ferreira, (2006)

O ponto central (PC) é replicado para determinar o erro experimental, e por isso o planejamento não necessita da replicação de todos os experimentos, além deste (DILER; IPEK, 2013). Para três variáveis o número de experimentos é guiado por $2^k + 2k + n$, sendo k é o

número de variáveis, 2^k é o número de pontos fatoriais nos vértices do cubo, $2k$ é o número de pontos axiais no eixo de cada planejamento fatorial a uma distância de $\pm \alpha$ ($\alpha = 2^{k/4} = 1,68179$ para $k = 3$) a partir do centro do cubo, e n representa o número de pontos centrais (1+4 repetições = 5 pontos centrais). Com isso o número de experimentos para três variáveis é $8 + 6 + 5 = 19$ (BOX; HUNTER, 1957; DILER; IPEK, 2013).

3.5 Otimização Multiobjetivo e algoritmo *simplex* sequencial com restrições

3.5.1 Função de desejabilidade

De acordo com Barros Neto et al (2010), considerando um planejamento de experimentos com várias respostas (y_1, y_2, y_n), e construindo um modelo que envolva as variáveis independentes (x_1, x_2, x_n) se o número de fatores (x_n) significativos possibilitar a visualização dos modelos ajustados, e se o número de respostas não for grande demais, uma sobreposição dos gráficos de contorno permite visualizar a melhor região por inspeção visual. Entretanto, se o objetivo do planejamento usado, for maximizar ou minimizar uma resposta fixando os valores das demais, ou seja, otimizando uma variável por vez, pode-se utilizar métodos de programação linear ou não-linear.

Ainda de acordo com Barros Neto et al. (2010), caso o objetivo não se enquadre em nenhuma das categorias descritas, aplica-se a metodologia de otimização simultânea proposta por Derringer e Suich (1980). Esse método se baseia na determinação de uma função de desejabilidade para cada resposta, com valores restritos ao intervalo $[0,1]$. Onde zero representa um valor inaceitável, e um, o valor mais desejável. Posterior a definição da função de desejabilidade para todas as respostas, deve-se combiná-las numa desejabilidade global (D), que geralmente é dada pela média geométrica das (m) desejabilidade individuais, de acordo com a Equação (1), sendo então reduzida à maximização de um único valor, a desejabilidade global. Assim o problema se reduz a apenas descobrir os níveis dos fatores que maximizem o valor de D. O uso da média geométrica faz com que a desejabilidade global (D) se anule sempre que uma das respostas tiver um valor inaceitável, mesmo que as outras sejam muito satisfatória.

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m} \quad \text{Equação (1)}$$

A forma da função da desejabilidade (d) de uma resposta é dependente da formulação do problema. Sendo o objetivo a determinação de um valor-alvo ótimo (A) para uma dada resposta (\hat{y}), em que esse valor encontra-se dentro de uma faixa de aceitação, cujo limites

inferior (LI) e superior (LS), são determinados, a função de desejabilidade da resposta (d), é descrita de acordo com as Equações 2, 3 e 4, onde d está restrito ao intervalo $[0,1]$.

$$d = \left(\frac{\hat{y}-LI}{A-LI} \right)^s, \text{ para } LI \leq \hat{y} \leq A; \quad \text{Equação (2)}$$

$$d = \left(\frac{\hat{y}-LS}{A-LS} \right)^t, \text{ para } A \leq \hat{y} \leq LS; \quad \text{Equação (3)}$$

$$d = 0 \text{ para } \hat{y} \text{ fora do intervalo (LI e LS) Equação (4)}$$

O valor de “ d ” só será 1, quando a resposta coincidir com o valor-alvo, $A = \hat{y}$, e se o numeradores forem iguais aos respectivos denominadores. O valor da desejabilidade irá cair, quando \hat{y} se afastar do valor de A , sendo zero quando um dos limites da faixa de aceitação for alcançado.

A variação de “ d ” com a resposta estimada \hat{y} , pelo modelo, é determinada pelos valores dos expoentes “ s ” e “ t ”. Valores altos desses expoentes faz com que a desejabilidade caia rapidamente, sendo muito baixa a menos que \hat{y} esteja muito perto do alvo. Valores baixos, permitem que a resposta tenha uma variação mais ampla sem que d esteja muito reduzido. Tudo isso depende do objetivo proposto e prioridade ou importância relativa dada para cada resposta. Além do mais, os valores dos expoentes não precisam necessariamente serem iguais. Se o objetivo é que o valor da resposta fique acima do valor-alvo do que abaixo, ou seja, uma maximização, deve-se atribuir que $t \ll s$.

Em muitos casos não é estabelecido um valor-alvo definido, mas sim um limite unilateral, acima ou abaixo do valor desejado para a resposta. Nesse caso deve-se modificar uma parte da definição de desejabilidade, fazendo que o valor-alvo coincida com um dos extremos e considerando $d = 1$. Nessa condição, há duas possibilidades:

1. Desconsiderar a equação (2) e fazer $d = 1$ para $\hat{y} \leq LI$. Ou seja, que o resultado considerado satisfatório para a resposta encontra-se abaixo do limite inferior LI.
2. Se, o objetivo for manter a resposta acima do limite superior LS, descarta-se a equação (3) e considerar $d = 1$ para qualquer $\hat{y} \geq LS$.

A função de desejabilidade foi utilizada para determinar “ D ” em função de “ d ” das respostas, com isso obter um modelo global, para que pudesse ser inserido no algoritmo simplex.

3.5.2 Algoritmo simplex

Um método de otimização muito disseminado é o método *simplex* sequencial, neste método, o simplex é um poliedro com faces planares que se desloca sobre a superfície de resposta, evitando regiões de respostas insatisfatória. Com uma superfície de resposta com n variáveis independentes, o *simplex* é um poliedro de $n+1$ vértices. Refere-se a um método recursivo, em que, ao se aproximar de uma região ótima, o *simplex* converge sobre o ponto considerado ótimo (BONA et al., 2000).

Os vértices do simplex são caracterizados em B (melhor), N (intermediário) e W (pior), considerando o quanto cada um deles representa para o objetivo da otimização, ou seja, o quanto cada combinação de valores das variáveis mais se aproxima do melhor resultado predito esperado com a otimização. Rejeita-se o vértice correspondente à pior resposta, substitui-se esse vértice pela sua reflexão (R) na hiperface definida pelos vértices restantes, criando, com isso, um novo simplex. A direção do movimento de reflexão é guiada pelo centroide (\bar{P}), formado pelos pontos considerados nesse novo simplex (BONA et al., 2000; GAO; HAN, 2012).

O método *simplex* sequencial já foi empregado na procura de parâmetros ideais em vários processos, como na maximização do conteúdo de compostos fenólicos em mistura de chás (GRANATO et al., 2014), desidratação osmótica de uma maçã (BORSATO et al., 2010), verificação do conteúdo de antioxidantes e compostos inerentes de sucos consumidos comerciais (ZIELINSKI et al., 2014).

Tendo em vista a importância da utilização dos resíduos de cascas de pinhão, bem como da obtenção de extratos biologicamente ativos com características antioxidantes, a determinação das melhores condições operacionais para obtenção dos extratos necessita ser melhor investigada.

O simplex sequencial foi utilizado no presente trabalho para otimizar o conjunto de variáveis dependentes (respostas) englobadas por “D”. Esse procedimento é recorrente e se cessa pela obtenção de valores sugeridos para as variáveis independentes, quando não há mais a variação desses valores (Convergência) ou quando o limite máximo de interações seja alcançado.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais

As sementes de pinhão foram adquiridas no mercado local de Campo Mourão, Paraná, Brasil (24° 2'45" S, 52° 22' 58" W), durante o mês de junho de 2015. Para extração foi utilizado etanol (99,5% Biotec) e para as análises de atividade antioxidante os seguintes reagentes: DPPH (Sigma Aldrich), Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich), Trolox (Sigma Aldrich), ácido gálico (Sigma Aldrich), carbonato de sódio (Vetec), metanol (P.A. Neon). Para as análises cromatográficas foram utilizados acetonitrila (99,9%, grau HPLC Fisher Scientific), ácido fórmico (Panreac Química S.L.U.), padrões fenólicos (Extrasynthèse, Genay, França) e água tratada em um sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, USA).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação das cascas de pinhão

Inicialmente, as sementes de pinhão foram cozidas em água fervente (526 g.L⁻¹), durante 2 horas. Em seguida, as cascas foram separadas das sementes e secas por 24 horas, a 40°C em estufa com convecção de ar forçado (Cienlab). Finalmente as cascas secas foram trituradas em um moinho de facas (Solab Científica) e peneiradas (malha Tyler -200/+400 mesh).

4.2.2 Extração dos compostos antioxidantes

Os compostos antioxidantes foram extraídos das cascas de pinhão de acordo com as condições experimentais descritas pelo CCD, apresentado na Tabela 1, gerado pelo *software* Statistica 7.0 (StatSoft Incorporation, Tulsa, OK, EUA, 2006). Foram utilizadas para o estudo as variáveis: percentual de sólidos (casca de pinhão) em relação à mistura de solventes (etanol e água) (% m.v⁻¹) = X₁, concentração de etanol em relação à água no solvente (%) = X₂ e temperatura de extração (°C) = X₃, com quatro repetições no ponto central. A faixa analítica foi determinada com base em experimentos preliminares e em resultados da literatura. Nestes testes, especial atenção foi dada para que o fator X₁ permitisse que a mistura apresentasse fluidez suficiente durante a agitação. No caso da proporção entre os solventes, os limites foram baseados no trabalho de Wong et al. (2015). Para a faixa de temperatura foi observada a possibilidade de ebulição do etanol e os valores mantidos abaixo deste limite.

As respostas avaliadas a partir do planejamento experimental proposto foram: CTF (expresso em mg EAG.100 g⁻¹, Y₁), ATD (expresso em μmol ET.g⁻¹, Y₂) e RVE (Y₃), para verificar a possibilidade da matriz sólida reter extrato por inchamento.

Tabela 1. CCD para extração dos compostos fenólicos da casca do pinhão.

Experimento	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
	X ₁	X ₂	X ₃	Sólidos ^a (g/100 ml)	Etanol ^b (%)	Temperatura (°C)
01	-1,0000	-1,0000	-1,0000	5,00	50,00	30,00
02	-1,0000	-1,0000	1,0000	5,00	50,00	55,00
03	-1,0000	1,0000	-1,0000	5,00	85,00	30,00
04	-1,0000	1,0000	1,0000	5,00	85,00	55,00
05	1,0000	-1,0000	-1,0000	12,50	50,00	30,00
06	1,0000	-1,0000	1,0000	12,50	50,00	55,00
07	1,0000	1,0000	-1,0000	12,50	85,00	30,00
08	1,0000	1,0000	1,0000	12,50	85,00	55,00
09	-1,6818	0,0000	0,0000	2,44	67,50	42,50
10	1,6818	0,0000	0,0000	15,06	67,50	42,50
11	0,0000	-1,6818	0,0000	8,75	38,07	42,50
12	0,0000	1,6818	0,0000	8,75	96,93	42,50
13	0,0000	0,0000	-1,6818	8,75	67,50	21,48
14	0,0000	0,0000	1,6818	8,75	67,50	63,52
15	0,0000	0,0000	0,0000	8,75	67,50	42,50
16	0,0000	0,0000	0,0000	8,75	67,50	42,50
17	0,0000	0,0000	0,0000	8,75	67,50	42,50
18	0,0000	0,0000	0,0000	8,75	67,50	42,50
19	0,0000	0,0000	0,0000	8,75	67,50	42,50

^a percentual de matriz (casca de pinhão) em relação a mistura de solvente (água e etanol); ^b percentual de etanol em relação a água na solução extratora.

Para a extração, as cascas de pinhão previamente preparadas foram pesadas em um reator encamisado de borosilicato (100 mL). O reator então foi ligado a um banho termostático com circulação (Quimis). Ao reator com as cascas de pinhão, foram adicionados 50 mL de solvente com composição fixada conforme o planejamento experimental (com temperatura

inicial anteriormente equilibrada à temperatura do experimento), e promoveu-se a mistura sob agitação a 12.000 rpm com um Ultra-Turrax® (IKA-T25), por 15 min. Finalmente, os extratos foram filtrados sob vácuo e armazenados a -18 °C.

4.3 Caracterização dos extratos

4.3.1 Determinação do rendimento em volume de extrato

A utilização da resposta rendimento em volume no delineamento se deu pelo seu comportamento oposto quando comparado com as respostas de perfil antioxidante (CTF e ATD), devido ao comportamento de “inchamento” da matriz sólida, que influencia a atuação do solvente na extração. Para sua determinação, os extratos foram coletados de forma padronizada ao final das extrações para avaliar a possibilidade de retenção de extrato em função do inchamento da matriz sólida. Para tanto, foi utilizado um funil de Buchner de 90 mm de diâmetro com papel filtro quantitativo, conectado a um kitasato, que por sua vez conectava-se a uma bomba a vácuo (Primatec, 121). Toda a mistura da extração foi depositada sobre o papel filtro com a bomba em funcionamento (-500 mmHg) e a filtração foi mantida por 15 min. O volume de extrato coletado na filtração (V_E , mL) foi determinado com uma proveta graduada de 50 mL e o rendimento em volume foi calculado com base no volume inicial de solvente adicionado ao reator para extração (V_S , mL) pela Equação (5).

$$R (\% v.v^{-1}) = \frac{V_E}{V_S} \cdot 100 \quad \text{Equação (5)}$$

4.3.2 Conteúdo Total de Fenólicos

As análises de determinação de CTF foram realizadas em triplicata para cada ponto experimental do planejamento. A análise seguiu a metodologia proposta por Singleton e Rossi, (1965), pela qual se adicionou 30 μ L de extrato em tubo de ensaio, 2370 μ L de água destilada e 150 μ L do reagente Folin-Ciocalteu. O processo de mistura foi ministrado na ausência de luz, e a agitação feita em vórtex por 10 s. Após 2 min, adicionou-se 400 μ L de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 15 % (m.v⁻¹), agitou-se em vórtex por 10 s e incubou-se por 2 horas, no escuro. Por fim, foram feitas leituras de absorbância a 765 nm, usando um espectrofotômetro UV-VIS (Red Tide USB650 UV, Ocean Optics, Duneden, USA), com interface computadorizada (SpectraSuit 2.0.162, Ocean Optics, Duneden, USA). A quantificação foi realizada usando uma curva padrão de ácido gálico (30 a 1500 mg.L⁻¹, $y = 0,0011x - 0,0088$, $R^2 = 0,9995$).

4.3.3 DPPH

A verificação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH seguiu a metodologia proposta por Mensor et al., (2001). As análises foram realizadas em triplicata para cada ponto experimental do planejamento. Adicionou-se 2,5 mL de extrato e 1 mL do DPPH a 0,3 mmol/L em tubos de ensaio com 10 mL de capacidade, seguido de agitação em vórtex por 10 s, incubação ao abrigo da luz a temperatura ambiente por 30 min, e leitura das absorvâncias a 518 nm, no espectrofotômetro UV-VIS. A capacidade antioxidante foi calculada por uma curva padrão de Trolox (15 a 60 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, $y = -0,0168x + 1,0728$, $R^2 = 0,9977$).

4.3.4 Determinação do modelo experimental

Inicialmente foi avaliada a significância dos coeficientes do modelo experimental relativo ao CCD quanto a três modelos para as respostas: y_1 -CTF (mg EAG.100g^{-1}), y_2 -ATD ($\mu\text{mol ET.g}^{-1}$), e y_3 - RVE ($\% \text{v.v}^{-1}$). Os termos que não apresentaram-se significativos (5% de significância, ANOVA) em cada modelo foram eliminados e o coeficientes de determinação ajustado R^2_{adj} foi avaliado juntamente com o p-valor e a variância residual para definição da composição final dos coeficientes. Assim em conjunto com a significância da regressão do modelo e da falta de ajuste, obtidos pela análise de variância ANOVA do modelo (5% de significância), foi definido o modelo para descrição de cada resposta (CTF, ATD e RVE).

Foi testado um modelo quadrático (Equação 6) descrita abaixo.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (6)$$

Em que y é o coeficiente de regressão para o intercepto; b_1 , b_2 e b_3 são os coeficientes de regressão para os efeitos lineares; b_{11} , b_{22} e b_{33} são os coeficientes de regressão para os efeitos quadráticos; b_{12} , b_{13} e b_{23} são os coeficientes de regressão para os efeitos de interação; e X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis independentes em valores codificados.

Os gráficos de contorno para os modelos obtidos foram plotados somente para os efeitos que se apresentaram significativos para as respostas avaliadas com uma das variáveis fixas, sendo o valor fixado indicado na legenda da Figura dos resultados.

4.3.5 Otimização Multiobjetivo e Função de desejabilidade

A otimização dos resultados foi conduzida em rotinas no software MatLab versão R2008b (The Mathworks, USA, 2008), com o objetivo de maximização das respostas (y_1 -CTF (mg

EAG.100g⁻¹), y_2 -ATD ($\mu\text{mol ET.g}^{-1}$), e y_3 - RVE (%v.v⁻¹). Na Figura 7 é apresentado um fluxograma do processo de otimização multiobjetivo com o *simplex* sequencial. Para cada “d” foram atribuídos valores específicos para o expoente “s” (Equação 2), de acordo com o valor-alvo desejado, codificando os valores dos modelos de resposta (Y_1 , Y_2 e Y_3) obtidos e gerando “D” pela média geométrica das desejabilidade individuais (d_1 , d_2 e d_3). Então o algoritmo *simplex* sequencial (BONA et al., 2000; GAO; HAN, 2012) foi executado para maximização do valor de D. Com o valor de D definido, o algoritmo sugere novos valores codificados das variáveis independentes (X_1 , X_2 e X_3), cessando a partir do momento em que os valores gerados pelo algoritmo convergem, resultando numa condição específica de extração.

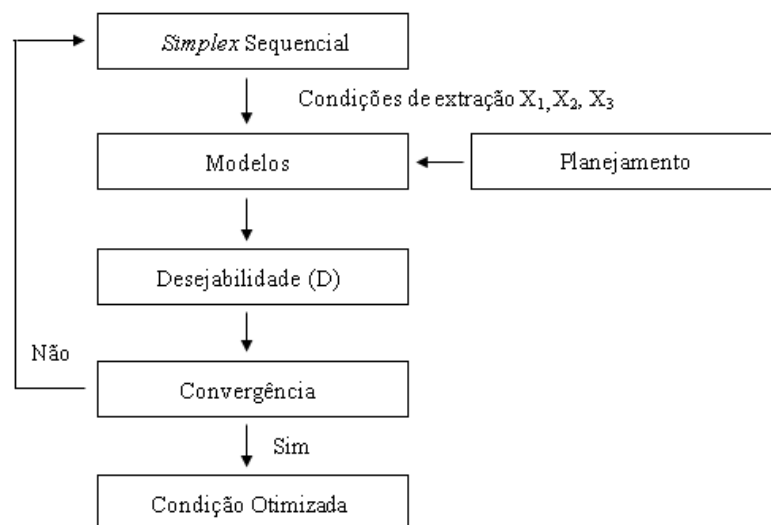


Figura 7. Fluxograma do procedimento de otimização multiobjetivo dos modelos gerados.

Os valores preditos para as respostas nestas condições apresentadas pelas simulações foram comparadas entre si em conjunto com o desvio padrão do modelo experimental para cada resposta. Quando os valores simulados não mais extrapolavam a resposta da simulação anterior o primeiro resultado que apresentou estabilidade (valor não mais variável) foi definido como ótimo. As condições referentes a X_1 , X_2 e X_3 então foram aplicados em um experimento de validação da otimização, em triplicata. As análises de CTF, ADT e RVE foram realizadas conforme descrito anteriormente. A comparação das médias experimentais foi então avaliada com relação aos desvios padrões experimentais com relação ao valor teórico obtido pela simulação e com os valores dos erros padrões dos modelos experimentais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Análise do planejamento experimental

Os resultados experimentais obtidos para as três respostas avaliadas na extração da casca do pinhão estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados experimentais para as respostas de CTF, ATD e RVE obtidos para os pontos do CCD.

Exp.	CTF ^b	ATD ^c	RVE ^d
	(mg EAG.100g ⁻¹)	($\mu\text{mol ET.g}^{-1}$)	(% v.v ⁻¹)
	Exp ^a (Previsto)	Exp ^a (Previsto)	Exp ^a (Previsto)
1	5976,97 \pm 72,92 (5892,07)	251,34 \pm 3,44 (251,64)	50,00 (50,15)
2	7304,64 \pm 68,61 (7172,81)	335,34 \pm 12,78 (328,26)	58,00 (68,11)
3	1736,86 \pm 16,39 (2041,13)	64,82 \pm 0,14 (70,68)	74,00 (80,43)
4	3169,73 \pm 157,95 (3321)	108,25 \pm 1,64 (113,02)	78,00 (75,39)
5	5404,99 \pm 50,16 (5478,03)	273,64 \pm 3,86 (264,72)	6,00 (22,53)
6	6945,61 \pm 65,08 (6758,77)	343,52 \pm 2,48 (341,34)	38,00 (40,49)
7	1825,73 \pm 20,67 (1627,09)	61,57 \pm 0,30 (64,48)	54,00 (52,81)
8	2715,46 \pm 34,69 (2907,33)	103,43 \pm 0,20 (106,82)	44,00 (47,77)
9	5504,23 \pm 40,68 (5303,14)	212,01 \pm 4,15 (209,63)	80,00 (75,93)
10	4594,03 \pm 64,54 (4606,82)	212,69 \pm 1,83 (215,41)	38,00 (29,48)
11	6775,48 \pm 64,81 (6986,47)	354,21 \pm 1,80 (364,98)	44,00 (30,92)
12	763,21 \pm 15,72 (509,99)	25,51 \pm 0,06 (15,60)	62,00 (62,50)
13	3556,23 \pm 56,91 (3514,90)	124,85 \pm 1,83 (124,63)	62,00 (61,36)
14	5669,76 \pm 168,88 (5668,84)	224,13 \pm 0,71 (224,67)	68,00 (72,22)
15	4981,78 \pm 35,32 (4954,98)	200,70 \pm 6,05 (190,29)	68,00 (66,79)
16	5142,75 \pm 151,22 (4954,98)	194,52 \pm 1,03 (190,29)	62,00 (66,79)
17	4760,51 \pm 101,99 (4954,98)	191,12 \pm 1,87 (190,29)	74,00 (66,79)
18	4866,02 \pm 20,76 (4954,98)	182,77 \pm 6,05 (190,29)	72,00 (66,79)
19	4870,54 \pm 83,49 (4954,98)	182,95 \pm 5,71 (190,29)	72,00 (66,79)

^a valores obtidos experimentalmente; ^b conteúdo total de fenólicos; ^c atividade antioxidante (DPPH); ^d rendimento em volume de extrato.

Na Tabela 3 são apresentados os coeficientes de regressão dos modelos preditivos aplicados as respostas CTF, ATD e RVE juntamente com os respectivos valores da probabilidade de erro tipo I (p-valor). Para a definição da composição de termos dos modelos preditivos foram considerados apenas os coeficientes significativos com base no seu p-valor (5% de significância).

Tabela 3. Coeficientes de regressão dos modelos preditivos para as respostas CTF, ATD e RVE.

Coeficientes	CTF ^a	p-valor*	ATD ^b	p-valor*	RVE ^c	p-valor*
Intercepto b ₀	4954,98	<10 ⁻⁶	190,29	<10 ⁻⁶	69,91	<10 ⁻⁶
b ₁ ^(a)	-207,02	<10 ⁻²	1,72	0,47	-13,81	<10 ⁻³
b ₁₁	30,26	0,60	7,86	<10 ⁻²	-5,48	0,04
b ₂ ^(b)	-1925,47	<10 ⁻⁶	-103,87	<10 ⁻⁶	9,39	<10 ⁻²
b ₂₂	-426,65	<10 ⁻⁴	-0,11	0,96	-7,60	0,01
b ₃ ^(c)	640,37	<10 ⁻⁵	29,74	<10 ⁻⁶	3,23	0,20
b ₃₃	-123,94	0,056	-5,53	0,04	-3,36	0,19
b ₁₂	70,70	0,36	-4,82	0,14	1,25	0,69
b ₁₃	-41,27	0,59	-1,96	0,53	1,25	0,69
b ₂₃	-68,21	0,38	-8,57	0,02	-5,75	0,09

*probabilidade de erro tipo 1; ^a conteúdo total de fenólicos; ^b atividade antioxidante (DPPH); ^c rendimento em volume de extrato.

Os coeficientes foram analisados e considerados para o modelo final preditivo para as respostas de acordo com sua probabilidade de erro tipo I (em negrito os coeficientes significativos), o “b₁” da resposta ATD foi mantido para o modelo, porque o “b₁₁” é altamente significativo, e ele é um termo recorrente de “b₁”, sendo assim também pode ser considerado importante e significativo mesmo seu p-valor ser maior 5%.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados relativos à análise da variância para os modelos propostos, considerando somente os efeitos significativos identificados através do p-valor (Tabela 3), juntamente com o modelo final preditivo para cada resposta. Pela análise de variância, os modelos preditivos para as respostas demonstraram-se altamente significativos ($p < 10^{-4}$), podendo ser utilizados para representar os comportamentos das respostas analisadas. Nota-se ainda que os resultados da análise da probabilidade de erro tipo 1 corroboram com os valores dos coeficientes de determinação R^2_{adj} (98,69%, 99,20% e 77,03%) das respostas, em que a falta de ajuste não foi significativa para nenhum dos modelos matemáticos confirmando que os modelos em questão são capazes de descrever o comportamento da extração dos antioxidantes da casca de pinhão sob as condições analisadas. Os valores preditos pelos modelos para CTF (mg EAG.100g⁻¹), ATD (μmol ET.g⁻¹) e RVE (% v.v⁻¹) estão apresentados juntamente com os resultados experimentais na Tabela 2.

Tabela 4. Análise de variância para os modelos de CTF, ATD e RVE com 95% de confiança.

Resposta	Fonte de variância	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F ^d	p ^e	
CTF	Regressão	5,96 x10 ⁷	5	1,19x10 ⁷	311,84	< 10 ⁻⁶	
	Resíduo	4,97 x10 ⁵	13	3,82x10 ⁴			
	Falta de ajuste	4,13 x10 ⁵	9	4,59x10 ⁴	2,18	0,2355	
	Erro puro	8,41 x10 ⁴	4	2,10x10 ⁴			
	Total	6,01 x10 ⁷	18				
	Coeficiente de determinação			R ²	0,9934		
	Coeficiente de determinação ajustado			R ² aj	0,9869		
	Desvio padrão da estimativa			Dp	195,45		
	CTF = 4954,98-207,02.(X ₁)-1925,47.(X ₂)-426,65.(X ₂ ²)+640,37.(X ₃)-123,94.(X ₃ ²)						
	ATD	Regressão	1,61 x10 ⁵	6	2,69x10 ⁴	374,18	< 10 ⁻⁶
Resíduo		862,38	12	71,87			
Falta de ajuste		624,93	8	78,12	1,32	0,4192	
Erro puro		237,45	4	59,36			
Total		1,62 x10 ⁵	18				
Coeficiente de determinação				R ²	0,9946		
Coeficiente de determinação ajustado				R ² aj	0,9920		
Desvio padrão da estimativa				Dp	8,48		
ATD = 190,29+1,72.(X ₁)+7,86.(X ₁ ²)-103,87.(X ₂)+29,74.(X ₃)-5,53.(X ₃ ²)-8,57.(X ₂ X ₃)							
RVE		Regressão	5,13 x10 ³	5	1,03x10 ³	13,36	9,70x10 ⁻⁵
	Resíduo	9,97 x10 ²	13	7,67x10 ¹			
	Falta de ajuste	9,06 x10 ²	9	1,01x10 ²	4,41	0,0832	
	Erro puro	9,12 x10 ¹	4	22,80			
	Total	6,12 x10 ³	18				
	Coeficiente de determinação			R ²	0,8341		
	Coeficiente de determinação ajustado			R ² aj	0,7703		
	Desvio padrão da estimativa			Dp	8,75		
	RVE = 69,91-13,81.(X ₁)-5,48.(X ₁ ²)+9,39.(X ₂)-760.(X ₂ ²)-5,75.(X ₂ X ₃)						

^a soma dos quadrados; ^b graus de liberdade; ^c quadrados médios; ^d coeficiente F calculado; ^e probabilidade de erro tipo I

Pela análise dos coeficientes, pode-se verificar que para a resposta CTF os efeitos das variáveis X₂ (teor de etanol no solvente) e X₁ (% de sólidos) desempenharam efeito negativo para a resposta não havendo, porém, interação entre elas (X₁X₂ não significativo p > 0,05), também observado pela Figura 8 (a). O aumento do teor de sólidos reduz a possibilidade de extração dos compostos fenólicos totais, por tornar a mistura extratora menos fluida, assim o solvente não consegue atuar de forma homogênea em todos os pontos. No caso da variável X₂, o aumento do teor do etanol reduziu a extração do teor de fenólicos totais, provavelmente em função dos compostos que se encontram presentes na matriz possuem característica hidrofílica, demonstra que a extração dos antioxidantes da matriz depende da quantidade de água, tanto para hidratação da matriz sólida, quanto para solubilização dos compostos extraíveis em função da afinidade com a água (ESCRIBANO-BAILON; SANTOS-BUELGA, 2003). A variável X₃

(temperatura) desempenhou um efeito positivo para o modelo CFT, entretanto não teve interação com as demais variáveis (X_1X_3 e X_2X_3 não significativo $p > 0,05$). Aumento da temperatura tem relação com o aumento do coeficiente de difusão do solvente líquido na matriz sólida, o que favorece a cinética de dessorção dos compostos a partir da matriz (HERRERO et al., 2005). Os efeitos quadráticos sugerem o comportamento da superfície de resposta para o modelo, onde para a resposta CFT só foram significativos os efeitos quadráticos do etanol e da temperatura (X_2^2 e X_3^2), desempenhando efeito negativo, sendo uma parábola com concavidade para baixo, o que sugere que o valor ideal se encontra na condição de ponto máximo, como pode-se observar na Figura 8 (f).

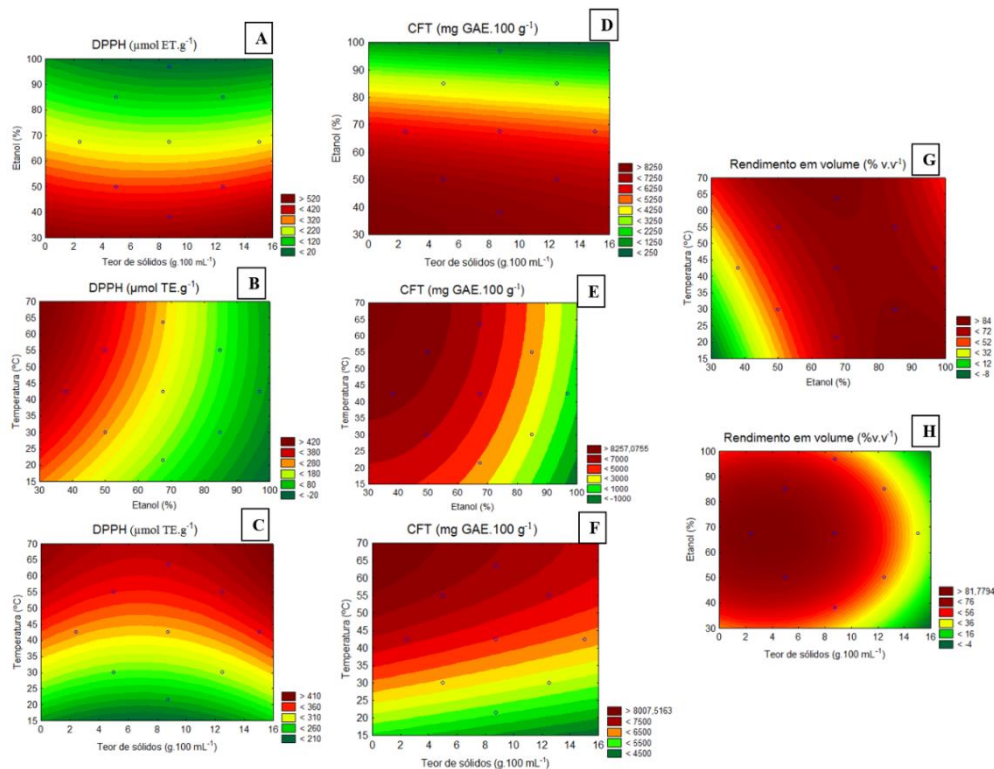


Figura 8. Gráficos de contorno para as respostas: ATD ($\mu\text{mol TE.g}^{-1}$) (a) etanol (%) e teor de sólidos (g.100 mL^{-1}), (b) temperatura (°C) e etanol (%), (c) temperatura (°C) e teor de sólidos (g.100 mL^{-1}); CTF (mg GAE.100 g⁻¹): (d) etanol (%) e teor de sólidos (g.100 mL^{-1}), (e) temperatura (°C) e etanol (%), (f) temperatura (°C) e teor de sólidos (g.100 mL^{-1}); RVE (%v.v⁻¹): (g) temperatura (°C) e etanol (%), (h) temperatura (°C) e teor de sólidos (g.100 mL^{-1}). A terceira variável foi fixada na condição ótima obtida pela otimização multiobjetivo e desejabilidade: Teor de sólidos = 2,45%; Etanol = 44,75% e Temperatura = 63,51°C.

Durling et al. (2007) observaram também que com a diminuição no teor de etanol na solução extratora os compostos fenólicos foram extraídos mais facilmente da sálvia (*Salvia officinal*). Os autores comentaram que este efeito ocorreu devido à seletividade dos composto pela água. Turkmen et al. (2006) analisaram a extração de polifenóis de chá preto e chá mate, e

obtiveram resultados semelhantes. Os autores concluíram que com o aumento da polaridade do solvente a extração é potencializada.

Para o modelo de resposta ATD o efeito da variável X_2 (teor de etanol no solvente) também apresentou efeito muito maior em relação a variável X_1 (% de sólidos), desempenhando um efeito negativo para a resposta. A variável X_3 (temperatura), assim como para o modelo CFT, também apresentou um efeito significativo e positivo para o modelo de DPPH. De acordo com Zuorro (2015) a cinética de extração é melhorada com o aumento de temperatura. Além disso a temperatura permitiu também um aumento na taxa de difusão e solubilidade, resultando numa extração mais elevada dos compostos antioxidantes (AYBASTIER et al., 2013).

Zuorro (2015) observou que acima de 55° C havia uma diminuição na recuperação de polifenóis extraídos da borra de café com uma solução aquosa de etanol. O autor concluiu que polifenóis foram degradados termicamente nesta condição. Chen et al. (2015) também observaram uma redução na extração de compostos antioxidantes de melão de beterraba devido à degradação térmica de antocianinas. No presente trabalho, esse efeito não foi observado possivelmente devido aos compostos antioxidantes extraídos possuírem característica termorresistente nas condições analisadas.

Quanto as interações entre as variáveis, nota-se que a única significativa detectada foi entre teor de etanol e temperatura (X_2X_3 significativo $p < 0,05$). Essa interação pode ser explicada pelo fato da alteração na constante dielétrica da água devido à variação na temperatura que favorece a extração de compostos menos polares (HERRERO et al., 2005).

Com relação aos efeitos quadráticos observou-se significância para X_1^2 com efeito positivo para a resposta, ou seja, a concavidade da parábola da superfície de resposta voltada para cima, o que sugere que o valor ideal se encontra no ponto de mínimo de sólidos, figura 8 (a). Já para X_3^2 o efeito foi significativo porém negativo, tendo concavidade da superfície de resposta voltada para baixo, ponto de máximo mais adequado.

Para a resposta RVE os efeitos de X_1 e X_2 (% de sólidos e teor de etanol) apresentaram-se significativos ($p < 0,05$). A variável X_1 teve um efeito negativo enquanto que X_2 apresentou efeito positivo na resposta, ou seja, quanto maior o percentual de sólidos na extração, mais extrato tende a manter-se retido na matriz sólida, e quanto maior o teor de etanol menor o inchamento da matriz retendo menor quantidade de extrato por intumescimento. A interação X_2X_3 foi significativa para a resposta com efeito negativo, nesse sentido com o aumento da temperatura e teor de etanol a matriz tende a inchar e reter maior quantidade de extrato, reduzindo o rendimento. Os efeitos quadráticos X_1^2 e de X_2^2 foram significativos e negativo,

resultando em uma superfície de resposta de concavidade para baixo, valor ideal se encontra no ponto de mínimo.

5.2 Otimização dos parâmetros de extração e validação

Para a otimização das repostas CTF, ATD e RVE, as importâncias relativas das respostas foram escolhidas de acordo com o valor-alvo desejado, dando maior importância para uma resposta, esta teria maior peso perante as demais, e de acordo com o efeito que as variáveis implicam nesta resposta, a condição ótima gerada, se modifica.

Na Tabela 5 são apresentadas as condições geradas e os valores obtidos para as repostas, juntamente com o intervalo de confiança dos modelos. A condição de igualdade das variáveis dependentes (condição 1-1-1), permitiu satisfazer a maximização dos valores das repostas, sendo esta então, reproduzida para validação da otimização. Foi possível verificar que as repostas experimentais obtidas estão dentro do intervalo de confiança de 95% (Tabela X). A condição apresentou os seguintes valores das variáveis dependentes: $X_1 = 2,45 \text{g}_{\text{casca}} \cdot 100 \text{mL}^{-1}$, $X_2 = 44,75 \%_{\text{etanol}}$ e $X_3 = 63,51^\circ \text{C}$, sendo as repostas iguais a $7777,84 \text{mgEAC} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ para CTF, $378,66 \mu\text{molET} \cdot \text{g}^{-1}$ para ATD e de 68% para RVE.

Pode-se observar também, que a única variável a ser modificadas nas condições, foi o percentual de etanol no solvente, o que denota que essa variável tem um efeito mais atuante perante as repostas analisadas, e que o processo de inchamento da matriz tem um papel influente nas condições geradas pelo simplex, o que corrobora com os efeitos já determinados pelos modelos preditivos das repostas testadas.

Tabela 5. Resultados de intervalo de confiança dos modelos (IC a 95% de confiança) para a otimização multiobjectivo das respostas combinadas (CTF, ATD e RVE) na extração de antioxidantes da casca de pinhão usando o método simplex sequencial em função da importância relativa (IR) das variáveis dependentes.

IR (s)	Variáveis dependentes			CTF (mg EAG.100 g ⁻¹)			ATD (μmol ET.g ⁻¹)			RVE (%)		
	Sólidos (g.mL ⁻¹)	Etanol (%)	T (°C)	Exp ^a	IAT ^b	IC (95%)	Exp ^a	IAT ^b	IC (95%)	Exp ^a	IAT ^b	IC (95%)
2-1-1	2,45	44,75	63,51	7710,26	7651,43-7778,74	7393,17 - 8203,92	378,63	377,17-381,55	353,34 - 421,01	65,00	64-65	52,89 - 86,53
1-2-1	2,45	38,08	63,51	7531,92	7531,92-7709,63	7572,77 - 8522,70	369,87	366,95-369,87	389,81 - 468,55	70,00	68-70	41,25 - 82,23
1-1-2	2,47	50,21	63,51	7388,39	7388,39-7462,98	7126,25 - 7877,29	327,32	327,32-328,77	322,98 - 382,52	70,00	68-70	60,12 - 89,28
1-1-1	2,45	44,75	63,51	7777,84	7746,67-7787,75	7393,17 - 8203,92	378,66	377,93-379,39	353,34 - 421,01	68,00	67-70	52,89 - 86,53

^a valor da resposta obtido experimentalmente; ^b intervalo analítico.

5.3 Perfil dos extratos do resíduo da casca de pinhão

As características dos picos (tempo de retenção, λ_{\max} na região visível e dados de espectro de massa) e a tentativa de identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos de resíduo de casca de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, estão apresentados na Tabela 6, bem como um perfil de compostos fenólicos para exemplificação obtido em 280 nm é apresentado na Figura 9. A quantificação dos compostos fenólicos é apresentada na Tabela 7. Treze compostos fenólicos foram identificados em todas as amostras, dez proantocianidinas (catequina e derivados de epicatequina), dois ácidos fenólicos (ácido protocatecuico e derivados de ácido ferúlico), um flavonol (quercetina-3-o-glicosídeo) e uma flavona (eriodictiol-O-hexosídeo).

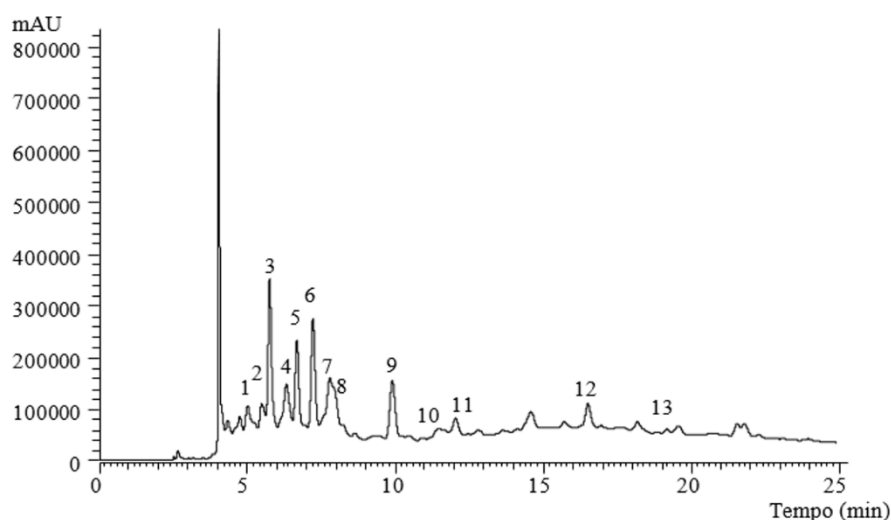


Figura 9. Perfil fenólico dos extratos de resíduo de casca de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (amostra 7) obtido a 280 nm por HPLC-DAD-ESI/MS.

Os compostos dos picos 3, 6, 9 e 13 foram positivamente identificados como ácido protocatecuico, (+)-catequina, (-)-epicatequina e quercetina-3-O-glucosídeo, respectivamente, de acordo com os seus tempos de retenção, e características de massa e UV-vis por comparação com os padrões comerciais. Os compostos catequina, (-)-epicatequina e quercetina já foram anteriormente identificados em pinhões de *A. angustifolia* (SOUZA et al., 2014), enquanto que, o ácido protocatecuico e a quercetina foram anteriormente reportados em cascas mortas da árvore *A. angustifolia* (SECCON et al., 2010). O ácido gálico e a catequina já foram identificados nas sementes de pinhão cruas e cozidas de *A. angustifolia* (KOEHNLEIN et al., 2012), enquanto que a quercetina foi identificada por dois diferentes grupos de pesquisa no

mesmo tipo de amostra que o presente trabalho (CORDENUNSI et al., 2004; KOEHNLEIN et al., 2012). A catequina tem sido reportada como o principal componente presente nas sementes de *A. angustifolia* (PERALTA et al., 2016).

Os seguintes compostos foram identificados como proantocianidinas baseado nos seus íons pseudomoleculares e padrões de fragmentação MS². A análise dos fragmentos produzidos proporciona informações sobre o tipo de unidade elementar e pode também informar sobre sua posição relativa no oligômero de proantocianidina. Entretanto, o espectro de massa não permite estabelecer a posição da ligação entre as unidades de flavanol (por exemplo., C4-C8 ou C4-C6) nem diferenciar entre catequinas isoméricas (como, catequina/epicatequina). Os compostos identificados com os picos 2, 4, 7 e 8 apresentaram o mesmo íon pseudomolecular [M-H]⁻ em m/z 577 e padrões de fragmentação MS², coerentes com dímeros de (epi)catequina tipo B (exemplo., unidades de (epi)catequina com C4-C8 ou C4-C6 com interligações tipo flavana). Produtos característicos de íons foram observados em m/z 451 (-126 u), 425 (-152 u) e 407 (-152-18 u), atribuídos a fissões em anéis heterocíclicos (HRF), via retro-Diels-Alder (RDA) e também perda de água a partir de uma unidade de (epi)catequina, e em m/z 289 e 287, que podem estar associados aos fragmentos correspondendo as unidades inferior e superior de (epi)catequina, respectivamente. Similarmente, os compostos dos picos 10 e 11 (íons pseudomoleculares [M-H]⁻ em m/z 865), podem ser designados com trímeros de (epi)catequina tipo B. Em todos os casos, os padrões e fragmentação são coerentes com aqueles esperados para tais tipos de compostos, por exemplo, similar aqueles observados para dímeros de proantocianidinas mas com fragmentos adicionais de quebras alternativas de ligações de diferentes ligações interflavanas. O composto 1 apresentou um íon pseudomolecular [M-H]⁻ em m/z 593 sendo identificado por tentativa como prodelfinidina B3, enquanto o composto 5 ([M-H]⁻ em m/z 355) foi identificado como ácido ferúlico hexosídeo, e o compostos12 ([M-H]⁻ em m/z 449) como um eriodictiol-O-hexosídeo.

Proantocianidinas e biflavonóides já foram descritos anteriormente como os compostos mais abundantes presentes na *A. angustifolia* (FREITAS et al., 2009; PERALTA et al., 2016; SOUZA et al., 2014; YAMAGUCHI et al., 2005; YAMAGUCHI et al., 2009). Porém, o estado atual do conhecimento, uma caracterização detalhada da fração de proantocianidinas ainda não foi descrita para as sementes de *A. angustifolia*.

O perfil fenólicos de todas as amostras apresentou-se muito similar, modificando somente a quantidade dos compostos identificados. Os compostos mais abundantes identificados foram (+)-catequina (composto 6) e um dímero de (epi)catequina (composto 4)

sendo a amostra 7 a que mostrou as maiores quantidades dos compostos identificados, seguida a amostra 12.

Tabela 6. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda de absorção máxima na região visível (λ_{max}), dados espectrais de massa e tentativa de identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos hidrometanólicos de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze.

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa de identificação
1	5.01	279	593	575(28),549(3),467(36),441(57),425(100),423(31),407(11),305(18),289(8)	Prodefinidina B3
2	5.47	280	577	451(23),425(100),407(22),289(12),287(10)	Dímero tipo-B (epi)catequina
3	5.74	260/sh292	153	109(100)	Ácido protocatepânico
4	6.31	280	577	451(16),425(100),407(19),289(8),287(7)	Dímero tipo-B (epi)catequina
5	6.67	314	355	193(100)	Hexósido de ácido ferúlico
6	7.21	280	289	245(100),203(50),187(10),161(9),137(3)	(+) - Catequina
7	7.78	280	577	451(24),425(100),407(22),289(11),287(10)	Dímero tipo-B (epi)catequina
8	7.9	280	577	451(18),425(100),407(22),289(9),287(7)	Dímero tipo-B (epi)catequina
9	9.89	280	289	245(100),203(35),187(6),161(8),137(3)	(-) - Epicatequina
10	11.35	279	865	739(78),713(47),695(100),577(62),575(42),425(12),407(9),289(6),287(11)	Trímero tipo-B (epi)catequina
11	12.02	281	865	739(78),713(56),695(100),577(46),575(82),425(11),407(9),289(6),287(9)	Trímero tipo-B (epi)catequina
12	16.49	283/sh324	449	287(100)	Eriodictiol-O-hexósido.
13	19.31	350	463	301(100)	Quercetina-3-O-glucósido

Tabela 7. Quantificação dos compostos fenólicos (mg.g⁻¹ de extrato) em extratos de resíduo de casca de pinhão de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Média ± DP).

Compostos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Prodelfinidina B3 ¹	1.60±0.05	1.36±0.01	2.23±0.02	2.28±0.02	1.62±0.07	2.40±0.02	3.87±0.09	3.20±0.05	1.90±0.06	2.08±0.08	2.30±0.01
Dímero tipo-B (epi)catequina ¹	1.86±0.03	2.20±0.01	2.95±0.10	3.33±0.03	2.07±0.04	2.43±0.02	6.78±0.14	5.22±0.08	2.63±0.10	3.10±0.09	2.90±0.02
Ácido protocatepânico ²	1.46±0.01	1.52±0.01	2.19±0.02	2.24±0.09	1.39±0.01	1.47±0.04	4.33±0.17	3.28±0.05	1.75±0.01	1.88±0.07	1.62±0.01
Dímero tipo-B (epi)catequina ¹	2.72±0.09	3.10±0.01	5.28±0.07	5.79±0.16	3.11±0.01	4.07±0.01	13.34±0.25	9.87±0.06	4.71±0.10	4.99±0.04	4.27±0.08
Hexósido de ácido ferúlico ³	0.48±0.01	0.45±0.01	0.72±0.03	0.72±0.01	0.51±0.01	0.63±0.01	1.52±0.04	0.99±0.07	0.61±0.01	0.60±0.01	0.53±0.01
(+)-Catequina ¹	2.78±0.03	2.16±0.02	5.84±0.22	6.07±0.02	2.58±0.11	3.08±0.04	13.13±0.41	9.89±0.16	3.40±0.02	4.00±0.07	2.55±0.09
Dímero tipo-B (epi)catequina ¹	1.81±0.05	1.40±0.04	2.49±0.05	3.47±0.01	1.84±0.05	2.24±0.01	6.25±0.05	4.99±0.01	2.49±0.08	2.56±0.05	2.08±0.08
Dímero tipo-B (epi)catequina ¹	1.91±0.06	1.90±0.07	3.35±0.03	4.46±0.03	2.89±0.18	2.35±0.02	7.19±0.01	6.85±0.05	3.05±0.12	2.81±0.04	2.06±0.03
(-)-Epicatequina ¹	2.03±0.06	1.62±0.04	3.54±0.03	4.70±0.03	2.02±0.02	2.08±0.08	8.07±0.22	6.37±0.03	1.91±0.01	2.28±0.01	1.12±0.07
Trímero tipo-B (epi)catequina ¹	1.30±0.18	1.08±0.02	1.82±0.13	2.01±0.04	1.51±0.03	1.38±0.09	2.39±0.10	2.03±0.09	0.89±0.10	1.64±0.01	0.85±0.02
Trímero tipo-B (epi)catequina ¹	1.62±0.03	1.29±0.03	2.16±0.08	2.36±0.01	1.94±0.05	1.37±0.03	3.25±0.04	2.60±0.09	1.21±0.01	1.85±0.02	1.04±0.03
Eriodictiol-O-hexósido ⁴	0.0039±0.0004	tr	0.16±0.05	0.12±0.01	tr	tr	0.68±0.05	0.29±0.01	tr	0.15±0.01	tr
Quercetina-3-O-glucósido ⁵	0.919±0.003	0.95±0.01	0.97±0.01	0.97±0.01	1.00±0.01	0.93±0.01	1.03±0.01	0.98±0.01	0.95±0.01	0.95±0.01	0.96±0.01
Ácidos fenólicos totais	1.94±0.02	1.97±0.02	2.91±0.05	2.97±0.08	1.90±0.02	2.10±0.05	5.85±0.13	4.28±0.13	2.37±0.01	2.48±0.08	2.16±0.01
Flavonoides totais	18.55±0.19	17.06±0.18	30.80±0.66	35.56±0.33	20.56±0.11	22.34±0.09	65.99±0.17	52.30±0.16	23.13±0.32	26.41±0.36	20.12±0.14
Compostos fenólicos totais	20.49±0.17	19.03±0.20	33.71±0.71	38.53±0.41	22.47±0.08	24.44±0.14	71.83±0.30	56.58±0.29	25.49±0.33	28.89±0.44	22.28±0.13
Compostos	12	13	14	16	18	19					
Prodelfinidina B3 ¹	3.11±0.08	1.96±0.01	2.56±0.06	2.11±0.03	1.93±0.02	1.87±0.03					
Dímero tipo-B (epi)catequina ¹	4.04±0.07	2.52±0.07	4.03±0.03	2.75±0.03	2.87±0.03	2.69±0.05					
Ácido protocatepânico ²	5.06±0.05	1.73±0.05	2.05±0.10	1.71±0.01	1.72±0.04	1.58±0.02					
Dímero tipo-B (epi)catequina ¹	7.56±0.12	4.64±0.05	6.55±0.08	5.17±0.04	4.68±0.01	4.48±0.03					
Hexósido de ácido ferúlico ³	1.33±0.01	0.61±0.01	0.71±0.02	0.67±0.02	0.61±0.01	0.56±0.02					
(+)-Catequina ¹	11.64±0.25	2.91±0.05	5.33±0.08	3.64±0.06	3.52±0.08	2.91±0.05					
Dímero tipo-B (epi)catequina ¹	6.74±0.15	1.90±0.08	3.57±0.13	2.52±0.02	2.13±0.05	2.19±0.05					
Dímero tipo-B (epi)catequina ¹	5.62±0.14	2.38±0.08	3.53±0.07	2.81±0.05	2.70±0.02	2.53±0.04					
(-)-Epicatequina ¹	7.48±0.01	1.89±0.06	2.71±0.02	1.89±0.08	2.10±0.01	1.93±0.07					
Trímero tipo-B (epi)catequina ¹	2.35±0.04	1.08±0.03	1.15±0.11	1.00±0.04	1.13±0.02	1.29±0.08					
Trímero tipo-B (epi)catequina ¹	3.73±0.07	1.31±0.06	1.74±0.06	1.13±0.03	1.06±0.02	1.25±0.04					
Eriodictiol-O-hexósido ⁴	1.01±0.01	tr	0.30±0.08	0,134±0,001	tr	tr					
Quercetina-3-O-glucósido ⁵	1.00±0.01	0.89±0.01	0.94±0.01	0.95±0.01	0.95±0.01	0.91±0.01					
Ácidos fenólicos totais	6.38±0.05	2.34±0.06	2.76±0.13	2.38±0.02	2.33±0.04	2.14±0.05					
Flavonoides totais	54.27±0.78	21.47±0.38	32.40±0.13	24.12±0.16	23.07±0.08	22.06±0.05					
Compostos fenólicos totais	60.66±0.83	23.81±0.44	35.16±0.26	26.49±0.18	25.33±0.03	24.20±0.10					

tr- traços; nd- não detectado. Curvas de calibração padrão: 1- catequina ($y = 84950x - 23200$; $R^2 = 1$); 2- ácido protocatecânico ($y = 214168x + 27102$; $R^2 = 0.9999$); 3- ácido ferúlico ($y = 633126x - 185462$; $R^2 = 0.999$); 4- naringenina ($y = 18433x + 78903$; $R^2 = 0.9998$); 5- quercetina-3-O-glucósido ($y = 34843x - 160173$; $R^2 = 0.9998$).

5.4 Caracterização Morfológica Do Resíduo Das Cascas De Pinhão Após Extração

Na Figura 10 são apresentadas as micrografias da matriz sólida de casca de pinhão, antes (Figura 10 (a)) e após a extração. As amostras obtidas após a extração foram coletadas a partir dos pontos experimentais em que o teor de sólidos permaneceu constante ($X_1 = 8,75 \text{ g.100mL}^{-1}$), variando somente o percentual de etanol e a temperatura de extração.

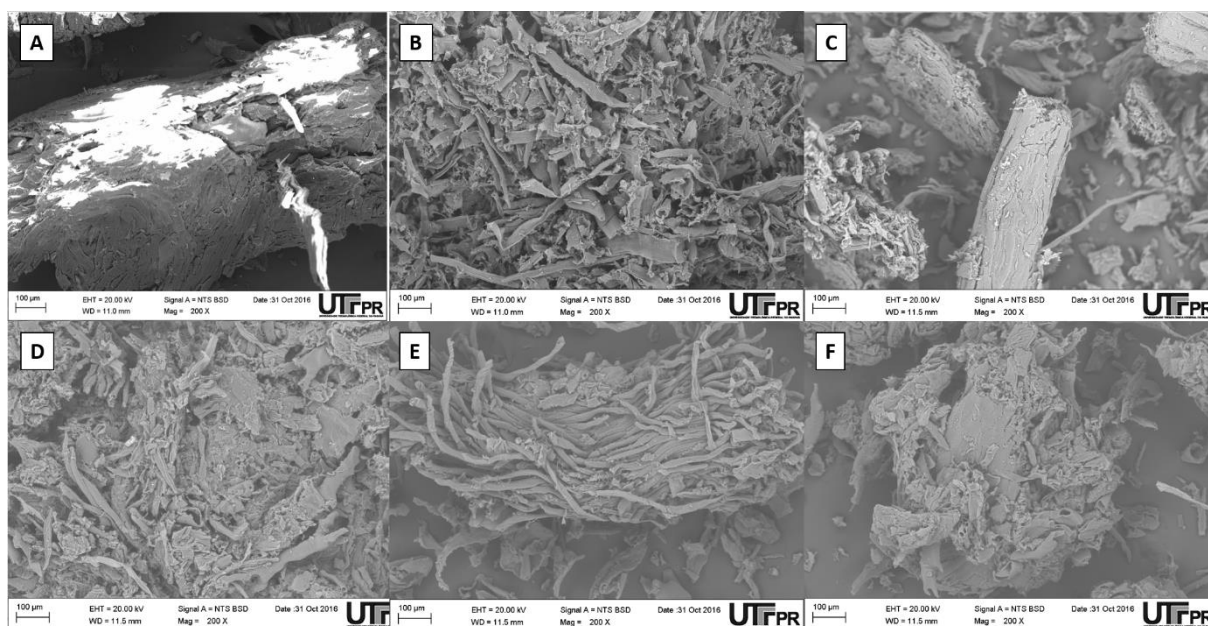


Figura 10. Micrografias das cascas de pinhão. Antes (a) e após o processo de extração referentes aos pontos experimentais: 11 onde $X_2 = 38,07\%$ e $X_3 = 42,50^\circ\text{C}$ (b); 12 onde $X_2 = 96,93\%$ e $X_3 = 42,50^\circ\text{C}$ (c); 13 onde $X_2 = 67,50\%$ e $X_3 = 21,48^\circ\text{C}$ (d); 14 onde $X_2 = 67,50\%$ e $X_3 = 63,52^\circ\text{C}$ (e); 15 onde $X_2 = 67,50\%$ e $X_3 = 42,50^\circ\text{C}$ (f). Magnificação de 200 x. O valor da variável X_1 para todos os pontos analisados era de $8,75 \text{ g.100mL}^{-1}$.

Percebe-se através das imagens que na Figura 10 (c) a amostra permaneceu íntegra de forma semelhante à casca analisada anteriormente à extração (Figura 10 (a)). O ponto experimental referente a esta amostra apresenta o maior percentual de etanol no solvente aplicado as condições experimentais (96,93%) e a observação corrobora com os resultados de rendimento em volume obtidos no planejamento experimental. O maior percentual de etanol não permite que as fibras que compõe a casca desfibrilem diminuindo a retenção do líquido entre as mesmas ao final do processo de extração, resultando num maior volume de extrato coletado. Analisando o efeito da elevação da temperatura, percebe-se pela Figura 10 (e) onde o percentual de etanol é o mesmo aplicado ao ponto experimental da Figura 10 (c) porém a

temperatura foi elevada de 42,50°C para 63,52°C, que o desfibrilamento se inicia. Dessa forma confirma-se a influência significativa da combinação destes dois fatores na resposta rendimento em volume. Ao contrário, as condições onde o percentual de etanol é menor (Figuras 10 (b) e (d)) ocorreu um visível desfibrilamento da matriz sólida que permitiu maior retenção de extrato ao final da extração. Uma vez que a água leva à hidratação da matriz sólida, a tendência ao desfibrilamento é acentuada significativamente.

O processo de desfibrilamento de materiais lignocelulósicos é estudado na utilização destes materiais como reforço em compósitos poliméricos, por exemplo (TEN; VERMERRIS, 2013). Bulota e Budtova, (2015) utilizaram o Ultra-Turrax para desfibrilamento de linhaça para utilização como material de reforço para laminados de poli(ácido láctico). No presente trabalho a homogeneização com Ultra-Turrax foi aplicada no processo de extração dos antioxidantes da casca de pinhão, resultando em um material desfibrilado, que apresenta potencial de aplicação como reforço.

6 CONCLUSÃO

A extração, utilizando-se do método de extração assistida por Ultra-Turrax, dos compostos antioxidantes presentes no resíduo da casca de pinhão através de condições experimentais obtidas por DCCR foi realizada com sucesso. Os modelos preditivos para as três respostas, DPPH, CFT e rendimento em volume, respostas foram significativos ($R^2_{adj} > 0,77$), não apresentando falta de ajuste. Os efeitos das variáveis dependentes (X_1 : teor de casca de pinhão, X_2 : teor de etanol no solvente e X_3 : temperatura) mostraram-se significativos ($p < 0,05$) para o teor CFT bem como o fator quadrático do teor de etanol, porém sem interações significativas ($p > 0,05$) entre as variáveis. No caso do modelo de DPPH o teor de sólidos não apresentou-se significativo porém o seu fator quadrático sim bem como o teor de etanol e a temperatura de extração e a interação entre ambos. Para a resposta de rendimento em volume o teor de sólidos e percentual de etanol no solvente apresentaram influência significativa bem como da interação entre temperatura e teor de etanol. Dessa forma os resultados dos modelos demonstraram que o rendimento em volume foi potencializado com o aumento do etanol na solução extratora, sendo este comportamento distinto das respostas de caráter antioxidante.

Com a otimização pela maximização das três respostas, utilizando a função de desejabilidade através do algoritmo simplex sequencial, pode-se verificar que com a condição de mesma importância para as variáveis (desejabilidades individuais 1-1-1), foi possível maximizar todas as respostas e o ponto otimizado foi validado com sucesso.

Foi verificado através das imagens de MEV o efeito do cisalhamento do sistema de extração bem como das condições experimentais (variáveis dependentes do delineamento) na microestrutura da matriz vegetal que levou à retenção de extrato ao final do processo de extração e redução do rendimento em volume.

Os extratos obtidos com a aplicação das condições experimentais do DCCR foram avaliados por HPLC-UV-VIS/MS quanto aos compostos fenólicos presentes. O composto identificado em maior concentração dentre todas as condições experimentais foi a + catequina com 13,13 m.g-1 para a condição experimental onde $X_1 = 12,5$ gcasca.100mL 1, $X_2 = 85$ %etanol e $X_3 = 30^\circ\text{C}$.

Foi comprovado que os extratos possuem uma capacidade antioxidante bem significativa, sendo possível aplica-los em algum material de barreira ou similar, como um estudo futuro, e essa metodologia proposta pode ser utilizada para outros tipos de extrações.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACORSI, D. M. et al. Viabilidade do processamento de biscoitos com farinha de pinhão. Viability of cookie-processing with Paraná pine nut flour. **Agris**, v. 5, n. 2, p. 207–212, 2012.
- ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, v. 152, p. 46–55, 2014.
- AGUILERA, J. M. Why food micro structure? **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1–2, p. 3–11, 2005.
- AL TANOURY, Z.; PISKUNOV, A.; ROCHETTE-EGLY, C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. **Journal of lipid research**, v. 54, n. 7, p. 1761–75, 1 jul. 2013.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, n. 1, p. 183–198, 2002.
- ARA, N. et al. Antioxidant Enzymatic Activities and Gene Expression Associated with Heat Tolerance in the Stems and Roots of Two Cucurbit Species (“*Cucurbita maxima*” and “*Cucurbita moschata*”) and Their Interspecific Inbred Line “Maxchata”. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 12, p. 24008–24028, 10 dez. 2013.
- AYBASTIER, Ö. et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 558–565, 2013.
- AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.
- BALENTINE, D. A.; WISEMAN, S. A.; BOUWENS, L. C. The chemistry of tea flavonoids. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr**, v. 37, n. 8, p. 693–704, 1997.
- BARROS NETO, B. DE; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.
- BELLO-PÉREZ, L. A. et al. Isolation and characterization of starch from seeds of *Araucaria brasiliensis*: A novel starch for application in food industry. **Starch/Staerke**, v. 58, n. 6, p. 283–291, 2006.
- BICUDO, S. C. W. et al. Thermoanalytical study and characterization of native starches of Paraná pine seeds (*Araucaria angustifolia*, Bert O. Ktze) and European chestnut seeds (*Castanea sativa*, Mill). **Ecletica Quimica**, v. 34, n. 1, p. 7–12, 2009.
- BILGIN, M. et al. OBTAINING SCARLET SAGE (*SALVIA COCCINEA*) EXTRACT THROUGH HOMOGENIZER- AND ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION METHODS. **Chemical Engineering Communications**, v. 200, n. 9, p. 1197–1209, 2013.

BONA, E. et al. Aplicativo para otimização empregando o método simplex seqüencial. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 22, n. 5, p. 1201–1206, 2000.

BORSATO, D. et al. Simulation of the multicomponent diffusion during the osmotic dehydration of apple: determination of the diffusion coefficients by the simplex method. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 391, 30 jul. 2010.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S. Multi-Factor Experimental Designs for Exploring Response Surfaces. **The Annals of Mathematical Statistics**, v. 28, n. 1, p. 195–241, 1957.

BRANCO, C. D. S. et al. Mitochondria and redox homeostasis as chemotherapeutic targets of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze in human larynx HEP-2 cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 231, p. 108–118, 2015.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Revista de nutrição**, v. 11, n. 56, p. 317–33, 1998.

BULOTA, M.; BUDTOVA, T. Highly porous and light-weight flax/PLA composites. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 132–138, 2015.

CARVALHO, P. E. R. Pinheiro-do-paraná. **Circular Técnica**, v. 60, 2002.

CATTANEO, N. et al. Sex-related, growth-climate association of *Araucaria angustifolia* in the neotropical ombrophilous woodlands of Argentina. **Dendrochronologia**, v. 31, n. 3, p. 147–152, 2013.

CERDÀ, V.; CERDÀ, J. L.; IDRIS, A. M. Optimization using the gradient and simplex methods. **Talanta**, v. 148, p. 641–648, 2016.

CHEN, M.; ZHAO, Y.; YU, S. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. **Food Chemistry**, v. 172, p. 543–550, 2015.

CLADERA-OLIVERA, F. et al. Influence of cooking in sorption isotherms of Pinhão (*Araucaria Angustifolia* seeds). **Latin American Applied Research**, v. 42, n. 1, p. 11–18, 2012.

CONAB, C. N. DO A. **CONJUNTURA ESPECIAL PINHÃO (Semente) Setembro de 2014**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_09_09_12_36_06_pinhaosemente_setembro_2014.pdf>.

CONFORTI, P. A.; LUPANO, C. E. Comparative Study of the Starch Digestibility of *Araucaria angustifolia* and *Araucaria araucana* Seed Flour. **Starch - Stärke**, v. 60, n. 3–4, p. 192–198, mar. 2008.

CORDENUNSI, B. R. et al. Chemical composition na glycemic index of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seeds. **Jornal of agricultural and food Chemistry**, v. 52, p. 3412–3416, 2004.

CRAVOTTO, G. et al. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 5, p. 898–902, 2008.

DA SILVA, S. M. et al. Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (*araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. **Food Research International**, v. 56, p. 1–8, 2014.

DAUDT, R. M. et al. Pinhão starch and coat extract as new natural cosmetic ingredients: Topical formulation stability and sensory analysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 573–580, 2015.

DILER, E. A.; IPEK, R. Main and interaction effects of matrix particle size, reinforcement particle size and volume fraction on wear characteristics of Al–SiCp composites using central composite design. **Composites Part B: Engineering**, v. 50, p. 371–380, 2013.

DORNAS, W.C, OLIVEIRA, T.T, RODRIGUES DAS DORES, R.G, SANTOS, A.F, NAGEM, T. . Flavonóides : Potencial Terapêutico no Estresse Oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241–249, 2008.

DURLING, N. E. et al. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1417–1424, 2007.

ESCRIBANO-BAILON, M. .; SANTOS-BUELGA, C. Polyphenols Extraction from Foods. **Royal Society of Chemistry**, p. 1–16, 2003.

ESPINOZA-PÉREZ, J. D. et al. Mathematical modeling of caffeine kinetic during solid-liquid extraction of coffee beans. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 72–78, 2007.

FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. Salvador, Bahia: Vento Leste, 2016.

FORLIN, D. et al. Viabilidade do processamento de pães com farinha de pinhão e iogurte. **Researchgate**, p. 93–100, 2009.

FREITAS, A. M. et al. Antiviral activity-guided fractionation from *Araucaria angustifolia* leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 512–517, dez. 2009.

GAO, F.; HAN, L. Implementing the Nelder-Mead simplex algorithm with adaptive parameters. **Computational Optimization and Applications**, v. 51, n. 1, p. 259–277, 2012.

GRANATO, D. et al. Analytical strategy coupled with response surface methodology to maximize the extraction of antioxidants from ternary mixtures of green, yellow, and red teas (*camellia sinensis* var. *sinensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 42, p. 10283–10296, 2014.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345–391, 2012.

HERRERO, M. et al. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 417–423, 2005.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 136–148, 2006.

HOLLMAN, P. C. H. et al. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1276–1282, 1995.

HORNUNG, P. S. et al. IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria 09 a 12 de novembro de 2014 – Serra Negra – SP - Brasil IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria 09 a 12 de novembro de 2014 – Serra Negra – SP - Brasil. p. 8–10, 2014.

HUECK, K. **Como Florestas da América do Sul**. São Paulo: Editora Universidade de Brasília e Editora Poligono, 1972.

IKA. **Dispersores Ultra-Turrax**.

ILAIYARAJA, N. et al. Optimisation of extraction of bioactive compounds from *Feronia limonia* (wood apple) fruit using response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v. 173, p. 348–354, 2015.

JEEVITHA, D. et al. DFT study of glycosyl group reactivity in quercetin derivatives. v. 1120, p. 15–24, 15 set. 2016.

JUHÁSZ, M. et al. Thermal stability of vitamin C: Thermogravimetric analysis and use of total ion monitoring chromatograms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2012.

KIRAN, B. et al. Statistical optimization using Central Composite Design for biomass and lipid productivity of microalga: A step towards enhanced biodiesel production. **Ecological Engineering**, v. 92, p. 73–81, 2016.

KOEHNLEIN, E. A. et al. Antioxidant activities and phenolic compounds of raw and cooked Brazilian pinhão (*Araucaria angustifolia*) seeds. **African Journal of Food Science**, v. 6, p. 512–518, 2012.

KUBASKI, A. L. et al. Análise Térmica De Diferentes Amostras De Amido De Pinhão (*Araucaria Angustifolia*) De Diferentes Regiões Do Sul Do Brasil. **Simposio de Analise Termica**, p. 19–22, 2015.

LEE, S.-J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131–137, jun. 2005.

LIMA, E. C. et al. Adsorption of Cu(II) on *Araucaria angustifolia* wastes: Determination of the optimal conditions by statistic design of experiments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 140, n. 1–2, p. 211–220, fev. 2007.

MÁRQUEZ-SILLERO, I.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Determination of water-soluble vitamins in infant milk and dietary supplement using a liquid chromatography on-line coupled to a corona-charged aerosol detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1313, p. 253–258, 2013.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, mar. 2001.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance

liquid chromatography: A review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577–99, mar. 2000.

MOURA, D. et al. BIODISPONIBILIDADE DE ÁCIDOS FENÓLICOS. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**. 3rd. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2009.

OLIVEIRA, R. et al. Inhibition of Pancreatic Lipase and Triacylglycerol Intestinal Absorption by a Pinhão Coat (*Araucaria angustifolia*) Extract Rich in Condensed Tannin. **Nutrients**, v. 7, n. 7, p. 5601–5614, 2015.

PAYNEL, F. et al. Polysaccharide hydrolases are released with mucilages after water hydration of flax seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 62, p. 54–62, 2013.

PENG, X. et al. The effects of grape seed extract fortification on the antioxidant activity and quality attributes of bread. **Food Chemistry**, v. 119, p. 49–53, 2010.

PERALTA, R. M. et al. Biological activities and chemical constituents of *Araucaria angustifolia*: An effort to recover a species threatened by extinction. **Trends in Food Science & Technology**, v. 54, p. 85–93, ago. 2016.

PEREIRA, G. A. et al. Optimizing the Homogenizer-Assisted Extraction (HAE) of Total Phenolic Compounds from Banana Peel. **Journal of Food Process Engineering**, 2016.

POZZAN, M. S. V.; BRAGA, G. C.; SALIBE, A. B. Teores de antocianinas, fenóis totais, taninos e ácido ascórbico em uva “bordô” sobre diferentes porta-enxertos. **Revista Ceres**, v. 59, n. 5, p. 701–708, 2012.

QIAO-HUI, D. U. et al. Dynamic changes of flavonoids in *Actinidia valvata* leaves at different growing stages measured by HPLC-MS / MS. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 14, n. 1, p. 66–72, 2016.

RIBEIRO, R. M.; SANTOS, A. J. DOS; BITTENCOURT, A. A política de garantia de preços mínimos para o pinhão. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 35, n. 84, p. 459, 2015.

ROTHWELL, J.A., MEDINA-REMÓN, A., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., NEVEU, V., KNAZE, V., SLIMANI, N., SCALBERT, A. Effects of food processing on polyphenol contents: A systematic analysis using Phenol-Explorer data. **Molecular Nutrition and Food Research**, p. 1–11, 2014.

ROYER, B. **Remoção de Corantes Têxteis Utilizando Casca de Semente de *Araucaria Angustifolia* como Biossorbente**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

RUSSO, M. et al. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 1, p. 6–15, jan. 2012.

SAIT, S. et al. HPLC-UV/DAD and ESI-MSⁿ analysis of flavonoids and antioxidant activity of an Algerian medicinal plant: *Paronychia argentea* Lam. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 111, p. 231–240, 2015.

SANTAROSA, E. et al. Crescimento Sazonal em *Araucaria angustifolia*: Evidências Anatômicas. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 618–620, 2007.

SECCON, A. et al. Antioxidant activity and low cytotoxicity of extracts and isolated compounds from *Araucaria angustifolia* dead bark. **Redox Report**, v. 15, n. 6, p. 234–242, 19 dez. 2010.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010.

SILVA, E. M. DA. Produção e caracterização de filmes biodegradáveis de amido de pinhão. p. 37, 2011.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, p. 71–81, 2002.

SOUZA, M. et al. Antioxidant and Antigenotoxic Activities of the Brazilian Pine *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Antioxidants**, v. 3, n. 1, p. 24–37, 6 jan. 2014.

SPADA, J. C. Uso do amido de pinhão como agente encapsulante. p. 147, 2011.

SUN, S. et al. Research on the chelation between quercetin and Cr(III) ion by Density Functional Theory (DFT) method. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 860, n. 1–3, p. 40–44, jul. 2008.

SWIECA, M. et al. Bread enriched with quinoa leaves – The influence of protein–phenolics interactions on the nutritional and antioxidant quality. **FOOD CHEMISTRY**, v. 162, p. 54–62, 2014.

TEN, E.; VERMERRIS, W. Functionalized polymers from lignocellulosic biomass: State of the art. **Polymers**, v. 5, n. 2, p. 600–642, 2013.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, abr. 2006.

TORKILDSEN, Ø. et al. Fat-soluble vitamins as disease modulators in multiple sclerosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 127, p. 16–23, jan. 2013.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. **Food Chemistry**, v. 99, n. 4, p. 835–841, 2006.

VELÁZQUEZ, C. et al. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin – Ciocalteu method. **Food Chemistry**, v. 176, p. 480–486, 2015.

VELOSO, H.; FILHO, A. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da Vegetação Brasileira Adaptada a um Sistema Universal**. [s.l.: s.n.].

VILKHU, K. et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 161–169, 2008.

WONG, W. H. et al. Two level half factorial design for the extraction of phenolics, flavonoids and antioxidants recovery from palm kernel by-product. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 238–248, 2015.

XU, W.-J. et al. Ultra-turrax based ultrasound-assisted extraction of five organic acids from honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) and optimization of extraction process. **Separation and Purification Technology**, v. 166, p. 73–82, 2016.

YAMAGUCHI, L. F. et al. Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. **Phytochemistry**, v. 66, n. 18, p. 2238–2247, set. 2005.

YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; DI MASCIO, P. Biflavonoids from *Araucaria angustifolia* protect against DNA UV-induced damage. **Phytochemistry**, v. 70, n. 5, p. 615–620, mar. 2009.

ZENG, C. et al. Optimization of the process variables of tilianin-loaded composite phospholipid liposomes based on response surface-central composite design and pharmacokinetic study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 123–131, 2016.

ZENGIN, H. et al. Antioxidant enzymatic defences during embryogenesis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 15, n. 2, 2015.

ZIELINSKI, A F. et al. Chemical Composition , Sensory Properties , Provenance , and Bioactivity of Fruit Juices as Assessed by Chemometrics : A Critical Review and Guideline. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 13, p. 300–316, 2014.

ZUORRO, A. Optimization of polyphenol recovery from espresso coffee residues using factorial design and response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 152, p. 64–69, 2015.