

**VALORIZAÇÃO DA CASCA DE *Ficus carica* L. COMO FONTE DE
PIGMENTOS NATURAIS: ESTUDOS DE EXTRAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA E
INCORPORAÇÃO EM ALIMENTOS**

Emanuelli Backes

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para
obtenção do título de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito
da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná*

Orientada por
Isabel C.F.R. Ferreira
Maria Filomena Barreiro
Aziza Kamal Genena

Bragança
2018

**VALORIZAÇÃO DA CASCA DE *Ficus carica* L. COMO FONTE DE
PIGMENTOS NATURAIS: ESTUDOS DE EXTRAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA E
INCORPORAÇÃO EM ALIMENTOS**

Emanuelli Backes

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para
obtenção do título de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito
da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná*

Orientada por
Isabel C.F.R. Ferreira
Maria Filomena Barreiro
Aziza Kamal Genena

Bragança
2018

Este trabalho é financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do Projeto NORTE-01-0145-FEDER-023289 (DeCodE) e Norte-01-0247-FEDER-024479 (projeto *Mobilizador ValorNatural*), e pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal, no âmbito do projeto 0377_Iberphenol_6_E.



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e sobretudo a Deus, pela vida e por tornar possível a concretização de mais esta etapa.

Aos meus pais, por todo amor, ensinamentos, valores, educação e todas as formas de apoio para que não só essa, mas todas as conquistas da minha vida fossem possíveis.

Ao meu namorado, por todo incentivo, motivação e amor enviado. Mesmo estando longe nesse período se fez fundamental para a concretização dessa etapa de aprendizado e crescimento pessoal.

Em especial, agradeço as professoras e orientadoras Dra. Maria Filomena Barreiro e Dra. Isabel C.F.R. Ferreira, por todos os conhecimentos e experiência transmitida. A Dra. Lillian Barros, por sempre acompanhar e auxiliar o desenvolvimento do trabalho. Tenho extrema gratidão por todo ensinamento repassado por vocês e me sinto privilegiada por essa oportunidade. A professora Dra. Aziza Kamal Genena, da UTFPR de Medianeira, por toda colaboração e incentivo despendido nesse período.

Sou grata também a toda equipe do BioChemCore, que de várias maneiras me auxiliaram no desenvolvimento do trabalho, em especial a Dra. Carla Pereira, que me acompanhou do início ao fim desta etapa.

Aos meus familiares e amigos que me apoiaram e ajudaram no desenvolvimento deste trabalho da forma que foi possível.

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

Muito Obrigada!

RESUMO

Devido à sua coloração, a casca do figo, infrutescência da figueira (*Ficus carica* L.), pode ser considerada como fonte potencial de antocianinas. Neste contexto, o objetivo deste estudo consistiu na comparação de diferentes técnicas de extração (assistidas por calor, ultrassons e micro-ondas) para a recuperação de antocianinas. Adicionalmente, e para as condições ótimas de extração, o extrato obtido foi caracterizado quanto à composição química e propriedades bioativas (atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e citotóxica). A fim de obter as condições que maximizam a extração de antocianinas, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta usando um delineamento composto central circunscrito de três variáveis com cinco níveis. As variáveis relevantes testadas e otimizadas neste estudo foram o tempo, temperatura e composição do solvente (razão etanol/água) para os métodos de extração assistidos por calor e micro-ondas. Para o método de ultrassons a temperatura foi mantida constante enquanto a potência ultrassônica foi a variável estudada, juntamente com o tempo e a composição do solvente. A composição em antocianinas foi determinada por HPLC-DAD-ESI/MS e as respostas utilizadas como critérios foram: quantificação da cianidina-3-rutinósido (C) no resíduo extraído (R; mg C/g R) e na casca do figo (P; mg C/g P dw) e a relação de ambas (g R/g P dw). A extração ultrassônica mostrou ser o método mais eficaz, conduzindo a extração de $7,0 \pm 0,2$ mg C/g R, $3,11 \pm 0,05$ mg C/g P dw e $0,19 \pm 0,001$ g R/g P dw nas condições ótimas globais de extração (21 min e 310 W com 100% de etanol e 180 g/L). Em relação às propriedades bioativas, o extrato otimizado de casca de figo apresentou atividade antioxidante com EC_{50} de 2,447 mg/mL pelo método de TBARS e EC_{80} , em 60 min ($EC_{80(60\text{ min})}$) e em 120 min ($EC_{80(120\text{ min})}$) de 0,52 e 1,62 mg/mL, respectivamente pelo método OxHLIA. O extrato revelou, para diferentes bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, atividade antimicrobiana, além de não apresentar citotoxicidade para células não tumorais. Porém, não apresentou atividade anti-inflamatória ou citotóxica para células tumorais humanas. O estudo da sua aplicação num produto alimentar foi efetuado tendo como objetivo a preparação de coberturas para donuts (glacê). Em síntese, os resultados obtidos colocam em evidência a potencial aplicação da casca de *F. carica* como fonte de antocianinas para diferentes setores industriais, nomeadamente alimentar, farmacêutico e cosmético, agregando os benefícios provenientes da sua atividade antioxidante e antimicrobiana ao seu poder corante.

ABSTRACT

Due to its coloration, the fig (*Ficus carica* L.) peel, a by-product of fruit processing and/or consumption, is a potential source of anthocyanin compounds. In the present study, different extraction techniques (heat, ultrasound, and microwave), aiming to recover the anthocyanin pigments and optimize its extraction, were compared by response surface methodology using a circumscribed central composite design of three variables with five levels. The relevant tested and optimized variables were time, temperature, and solvent composition (ethanol/water ratio) for the heat and microwave extraction methods. For the ultrasound method, the variables were the ultrasonic power, time, and solvent composition. The anthocyanin composition of the extract was determined by HPLC-DAD-ESI/MS, and the used criteria responses were the quantification of cyanidin 3-rutinoside (C) in the extracted residue (R; mg C/g R) and in the dried fig peel (P; mg C/g P dw), and the extraction yield of the obtained residue (g R/g P dw). Ultrasound extraction was the most effective method, yielding $17,0 \pm 0,2$ mg C/g R, $3,11 \pm 0,05$ mg C/g P dw e $0,19 \pm 0,001$ g R/g P dw at the optimal global extraction conditions (21 min and 310 W with 100% of ethanol and 180 g/L). Regarding its bioactive properties, the fig peel optimized extract showed antioxidant activity with EC_{50} of 2,447 mg/mL by the TBARS method and EC_{80} in 60 min ($EC_{80(60\text{ min})}$) and in 120 min ($EC_{80(120\text{ min})}$) of 0,52 and 1,62 mg/mL, respectively by the OxHLIA method. The extract revealed, for different Gram-positive and Gram-negative bacteria, antimicrobial activity, besides not presenting cytotoxic potential against non-tumor cells. However, the extract showed no anti-inflammatory or cytotoxic potential against human tumor cells. Its application in a food product was carried out aiming at the preparation of toppings for donuts. In conclusion, the obtained results highlight the potential application of *F. carica* peels as source of anthocyanin compounds to be considered in different industries, such as food, pharmaceutical and cosmetic, adding the benefits derived from its antioxidant and antimicrobial activity to the colorant power.

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE DE TABELAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
LISTA DE ABREVIACÕES.....	VIII
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. Aditivos alimentares e a necessidade de sua utilização.....	2
1.1.1. Importância dos aditivos alimentares	2
1.1.2. Contextualização legal.....	2
1.1.3. O caso dos corantes alimentares	3
1.2. Corantes artificiais <i>versus</i> corantes naturais.....	5
1.2.1. Corantes artificiais e o receio quanto à segurança alimentar.....	5
1.2.2. A alternativa dos corantes naturais	6
1.3. O caso particular das antocianinas.....	7
1.3.1. Caracterização química.....	7
1.3.2. Poder corante frente à estabilidade das antocianinas.....	9
1.4. Explorando recursos para obtenção de antocianinas	10
1.4.1. Fontes de obtenção alternativas e aplicação como corante na indústria alimentar	10
1.4.2. Obtenção de antocianinas a partir da casca da infrutescência de <i>Ficus carica</i> L.	11
1.4.3. Processos de extração de antocianinas	12
1.4.4. Otimização de processos de extração	15
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Amostra, padrões e reagentes	18
3.2. Técnicas de extração utilizadas e definição das variáveis relevantes para o processo de otimização.....	18
3.2.1. Extração assistida por calor (HAE)	19
3.2.2. Extração assistida por ultrassons (UAE)	19
3.2.3. Extração assistida por micro-ondas (MAE).....	19
3.2.4. Preparação dos extratos obtidos	20
3.3. Identificação e quantificação de antocianinas	20
3.4. Desenho experimental, análise de modelos e avaliação estatística	21
3.4.1. Desenho experimental por MSR.....	21
3.4.2. Formatos dos valores de resposta para análise dos resultados	21
3.4.3. Modelo matemático para gerar as respostas	22
3.4.4. Procedimento para otimização das variáveis e maximização da resposta	22
3.5. Análise da dose-resposta da razão sólido/líquido.....	22
3.6. Métodos numéricos, análises estatísticas e ilustrações gráficas	23
3.7. Preparação do extrato de casca de figo nas condições otimizadas e avaliação do seu poder corante	24
3.8. Avaliação das propriedades bioativas do extrato da casca do figo.....	24

3.8.1. Avaliação da atividade antioxidante: inibição da peroxidação lipídica (TBARS)	24
3.8.2. Avaliação da atividade antioxidante: inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA)	25
3.8.3. Citotoxicidade em linhas celulares tumorais humanas	26
3.8.4. Citotoxicidade numa cultura primária não tumoral	27
3.8.5. Atividade anti-inflamatória	27
3.8.6. Atividade antimicrobiana	28
3.9. Aplicação do extrato corante da casca do figo num produto alimentar: cobertura para donuts	29
3.9.1. Preparação da cobertura para donuts (glacê)	29
3.9.2. Avaliação da cor, pH e textura ao longo do tempo de armazenamento	30
3.9.3. Avaliação dos macronutrientes e valor energético ao longo do tempo de armazenamento	30
3.10. Análise estatística dos parâmetros físico-químicos e reológicos do glacê	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
4.1. Otimização da análise da MSR utilizando as 3 variáveis relevantes para cada método de extração	34
4.1.1. Ensaio preliminares para seleção das variáveis e gamas relevantes para delinear uma MSR apropriada	34
4.1.2. Modelos matemáticos derivados da MSR para um DCCC com três variáveis e sua avaliação estatística	36
4.1.3. Efeito das variáveis independentes nas respostas e condições ótimas de extração	40
4.1.4. Condições ótimas numéricas que maximizam a extração de antocianinas e verificação dos modelos preditivos	44
4.2. Análise dose-resposta do efeito da razão sólido/líquido nas condições ótimas	48
4.3. Comparação com outros estudos envolvendo extração de antocianinas	50
4.4. Poder corante do extrato rico em antocianinas obtido a partir da casca de figo	52
4.5. Avaliação das propriedades bioativas do extrato da casca do figo	52
4.5.1. Avaliação da atividade antioxidante	52
4.5.2. Citotoxicidade e atividade anti-inflamatória	55
4.5.3. Atividade antimicrobiana	55
4.6. Aplicação do extrato corante em um produto alimentar: Caracterização das diferentes formulações da cobertura para donuts (glacês)	58
4.6.1. Composição nutricional	58
4.6.2. Ácidos gordos	61
4.6.3. Parâmetros de cor	63
4.6.4. Parâmetros reológicos	64
5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Relação entre a estrutura química, cor e λ_{\max} das principais antocianinas encontradas na natureza.	8
Tabela 2: Vantagens e desvantagens da diferentes de métodos de extração na obtenção de compostos fenólicos.....	13
Tabela 3: Conteúdo total de antocianinas (CTA), em massa seca (dw), obtidas a partir de diferentes técnicas, condições de extração e fontes naturais diversificadas.....	14
Tabela 4: Delineamento experimental e codificação das variáveis independentes usadas no desenho fatorial DCCC com 5 níveis.	21
Tabela 5: Resultados experimentais da MSR para o DCCC para a otimização das três principais variáveis envolvidas (X_1 , X_2 e X_3) na HAE, UAE e MAE para os três formatos de respostas avaliados (Y_1 , Y_2 e Y_2/Y_1). As variáveis, valores naturais e intervalos são apresentados na Tabela 4.	38
Tabela 6: Resultados paramétricos da equação polinomial de segunda ordem da Eq. (1) para as técnicas de extração HAE, UAE e MAE avaliadas e em termos do comportamento de extração dos três formatos de valores de resposta (Y_1 , Y_2 e Y_2/Y_1), de acordo com DCCC, com 5 níveis de alcance. O subscrito paramétrico 1, 2 e 3 representa as variáveis envolvidas t (X_1), T ou P (X_2) e S (X_3), respectivamente. Análises de significância dos parâmetros ($\alpha=0,05$) são apresentadas em valores codificados. Além disso, a informação estatística do procedimento de adaptação ao modelo é apresentada.	39
Tabela 7: Condições das variáveis, em valores naturais, que levam a valores ótimos da resposta para MSR utilizando DCCC para cada uma das técnicas estudadas (HAE, UAE e MAE), para os três formatos de resposta individuais (Y_1 , Y_2 e Y_2/Y_1) e para condições ótimas globais.	45
Tabela 8: Resultados paramétricos da equação polinomial de segunda ordem da Eq. (2) para as técnicas de extração HAE, UAE e MAE, avaliadas em termos da variação da relação S/L	48
Tabela 9: Parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) e quantidade de cianidina-3-rutinósido (mg/g R) do extrato otimizado de casca de figo.	52
Tabela 10: Resultados da atividade antioxidante do extrato de casca de figo para os métodos OxHLIA e TBARS. Trolox foi utilizado como controlo positivo em ambos os casos.....	53
Tabela 11: Atividade antimicrobiana do extrato alcoólico de casca de <i>Ficus carica</i> L. e controlos positivos contra isolados hospitalares selecionados.	57
Tabela 12: Composição nutricional, açúcares livres (g/100 g pf) e valor energético (kcal/100 g pf) das diferentes formulações de glacê.	60
Tabela 13: Composição em ácidos gordos (%) das diferentes formulações de glacê (média±desvio-padrão).	62
Tabela 14: Parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) e pH nas diferentes formulações de glacê.	63
Tabela 15: Parâmetros reológicos nas diferentes formulações de glacê.	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Classificação dos corantes de acordo com a fonte de origem.	4
Figura 2: Estrutura química comum às antocianinas. A numeração de átomos e a nomenclatura de anel do núcleo de 2-fenilbenzopirílio são marcadas.	8
Figura 3: Comportamento químico das antocianinas conforme pH do meio.	10
Figura 4: A. Figo inteiro. B. Secção transversal do figo.	11
Figura 5: Representação do perfil de antocianinas do extrato de casca de figo obtidos por HPLC-DAD e registrados a 520 nm. O tempo de retenção (TR) é apresentado junto ao pico.	35
Figura 6: <u>Parte A:</u> Análise gráfica conjunta em 3D em termos do comportamento de extração para a resposta Y_1 para a otimização das três principais variáveis envolvidas (X_1 , X_2 e X_3) no HAE, UAE e MAE. Cada uma das superfícies da rede representa a superfície de resposta tridimensional teórica prevista com o polinômio de segunda ordem da Eq. (1). As ações binárias entre as variáveis são apresentadas quando a variável excluída é posicionada no centro do domínio experimental. <u>Parte B:</u> Adequação do ajuste segundo dois critérios gráficos básicos de estatística: a capacidade de simular as mudanças da resposta entre os dados previstos e observados; e a distribuição residual em função de cada uma das variáveis.	41
Figura 7: <u>Parte A:</u> Análise gráfica conjunta em 3D em termos do comportamento de extração para a resposta Y_2 para a otimização das três principais variáveis envolvidas (X_1 , X_2 e X_3) no HAE, UAE e MAE. Cada uma das superfícies da rede representa a superfície de resposta tridimensional teórica prevista com o polinômio de segunda ordem da Eq. (1). As ações binárias entre as variáveis são apresentadas quando a variável excluída é posicionada no centro do domínio experimental. <u>Parte B:</u> Adequação do ajuste segundo dois critérios gráficos básicos de estatística: a capacidade de simular as mudanças da resposta entre os dados previstos e observados; e a distribuição residual em função de cada uma das variáveis.	42
Figura 8: <u>Parte A:</u> Análise gráfica conjunta em 3D em termos do comportamento de extração para a resposta Y_2/Y_1 para a otimização das três principais variáveis envolvidas (X_1 , X_2 e X_3) no HAE, UAE e MAE. Cada uma das superfícies da rede representa a superfície de resposta tridimensional teórica prevista com o polinômio de segunda ordem da Eq. (1). As ações binárias entre as variáveis são apresentadas quando a variável excluída é posicionada no centro do domínio experimental. <u>Parte B:</u> Adequação do ajuste segundo dois critérios gráficos básicos de estatística: a capacidade de simular as mudanças da resposta entre os dados previstos e observados; e a distribuição residual em função de cada uma das variáveis.	43
Figura 9: Projeção das isolinhas otimizadas para as três principais variáveis otimizadas (X_1 , X_2 e X_3) no HAE, UAE e MAE nos três formadores de valores de respostas (Y_1 , Y_2 e Y_2/Y_1) para descrever visualmente as tendências de cada resposta e guiar a seleção das condições mais favoráveis, levando em conta simultaneamente todas as respostas. Cada um dos gráficos de contorno representa a projeção no plano XY da superfície de resposta tridimensional teórica prevista pelo polinômio de segunda ordem da Eq. (1).	46

Figura 10: Resumo final dos efeitos de todas as variáveis avaliadas para sistemas HAE, UAE e MAE. Parte A: Mostra as respostas 2D individuais em todos os formatos de respostas estudados e em função de todas as variáveis avaliadas. As variáveis em cada um dos gráficos 2D foram posicionadas nos valores ótimos individuais das outras. Os pontos (⊙) apresentados ao longo de cada linha destacam a localização do valor ótimo. Linhas e pontos são gerados pelos modelos polinomiais teóricos de segunda ordem derivados da Eq. (1). Parte B: Mostra a resposta da dose de S/L aos valores ótimos globais das outras três variáveis (X_1 , X_2 e X_3). Resultados experimentais são representados por pontos (o), enquanto as linhas são o padrão previsto pela Eq. (2). 47

Figura 11: Resposta projetada pelo modelo MSR da relação da dose de S/L nos três formatos de respostas estudados (Y_1 , Y_2 e Y_3) quando as demais variáveis estudadas (X_1 , X_2 e X_3) são posicionadas em seus valores ótimos globais..... 50

Figura 12: Comportamento da população de eritrócidos ao longo do tempo expostos a diferentes concentrações do extrato de casca de figo. 54

Figura 13: Diferentes formulações de cobertura. A. receita base (GB0), B. receita aditivada com extrato de figo (GF0), ambas referentes ao dia de preparação..... 58

LISTA DE ABREVIÇÕES

AAPH	Dicloro-hidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AC	Absorbância do controle
AE	Absorbância da solução de extrato
AGMI	Ácidos gordos monoinsaturados
AGPI	Ácidos gordos polinsaturados
AGS	Ácidos gordos saturados
ATF	Ácido trifluoroacético
b_0	Coefficiente constante
b_i	Coefficiente de efeito linear
b_{ij}	Coefficiente de efeito interativo
b_{ii}	Coefficiente de efeito quadrático
C	Cianidina-3-rutinósido
CH₀	Densidade óptica completa da hemólise a 0 min
CIE	<i>Commission Internationale de l'Eclairage</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMB	Concentração mínima bactericida
CMI	Concentração mínima inibitória
CTA	Conteúdo total de antocianinas
DAD	Detetor de diodos
DCCC	Delineamento composto central circunscrito
DDA	Dose diária admissível
DMEM	Meio de cultura <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo
dw	<i>Dry weight</i> (massa seca)
EC₅₀	Concentração da amostra responsável por 50% de inibição de radicais livres (para atividade antioxidante) ou da produção de NO (para atividade anti-inflamatória)
EC₂₅	Concentração da amostra responsável por 25% de inibição de radicais livres
EC₈₀	Concentração de amostra responsável por retardar a hemólise em 80%
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
EM	Espectrômetro de massa
Eq.	Equação
Eqs.	Equações
ESI	Fonte de ionização <i>Electrospray</i>
ET	Equivalente trolox
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>

FAME	Ésteres metílicos de ácidos gordos
FBS	Soro fetal bovino
FID	Detetor por ionização de chama
GB0	Glacê controlo (sem extrato corante) no dia 0
GB1	Glacê controlo (sem extrato corante) no dia 1
GC	Cromatografia gasosa
GF0	Glacê com extrato de casca de figo no dia 0
GF1	Glacê com extrato de casca de figo no dia 1
GI₅₀	Concentração da amostra responsável por 50% de inibição do crescimento celular
HAE	Extração assistida por calor
HeLa	Linha celular humana de carcinoma cervical
HepG2	Linha celular humana de carcinoma hepatocelular
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
H_{t80}	Tempo correspondente a 80% da hemólise
INT	Corante cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazóico
K	Valor máximo para a extração. Unidade depende do formato de resposta
LPS	Lipopolissacarídeos
MAE	Extração assistida por micro-ondas
MC	Massa de cinzas
MCF-7	Linha celular humana de carcinoma mamário
MG	Massa de gordura
MHB	Meio de cultura <i>Muller Hinton Broth</i>
MHC	Massa de hidratos de carbono
min	Minutos
<i>m_n</i>	Valor paramétrico <i>S/L</i> para o nível <i>n</i> de resposta selecionado
MP	Massa de proteínas
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
MSR	Metodologia de superfície de resposta
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à metilina
N	Teor de azoto
<i>n</i>	Número de variáveis para Eq. (1) ou qualquer nível desejado de resposta entre 0 a 100% para Eq. (2)
NCI-H460	Linha celular humana de carcinoma de pulmão
NED	Hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina
NO	Óxido nítrico
<i>ns</i>	Coeficiente não significativo
<i>nt</i>	Não testado
<i>Obs</i>	Número de observação
<i>P</i>	Potência ultrassónica
PBS	Tampão fosfato salino
PE	População de eritrócitos

pf	Produto fresco
PI	Padrão interno
pH	Potencial iónico de hidrogénio
PLP2	Cultura primária de células de fígado de porco
R	Resíduo extraído em base seca
R²	Coefficiente de correlação
R²adj	Coefficiente de correlação ajustado
RAW 246.7	Linha celular de macrófagos de rato
RI	Índice de refração
RGB	Sistema de cores RGB (<i>Red, Green e Blue</i>)
rpm	Rotação por minuto
RPMI-1640	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Segundos
S	Concentração do solvente
SRB	Corante Sulforadamina B
S_t	Densidade óptica da amostra no instante <i>t</i> e tempo <i>t</i>
<i>t</i>	Tempo
<i>T</i>	Temperatura
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TDAH	Transtorno de défice de atenção e hiperatividade
TR	Tempo de retenção
TSB	Meio de cultura <i>Tryptic Soy Broth</i>
UAE	Extração assistida por ultrassons
UE	União Europeia
W	Equação de Weibull
↑ W	Equação de Weibull para acréscimo da resposta
↓ W	Equação de Weibull para decréscimo da resposta
X₁	Variável tempo
X₂	Variável temperatura ou potência
X₃	Variável concentração do solvente
X₄	Variável relação sólido/líquido
X_i e X_j	Variáveis independentes
Y	Variável dependente
Y₁	mg de cianidina-3-rutinósido obtida por g de resíduo em peso seco extraído (mg C/g R)
Y₂	mg de cianidina-3-rutinósido obtida por g de casca de figo em peso seco (mg C/g P dw)
Y₂/Y₁	Obtido pela divisão das respostas Y ₂ e Y ₁ (mg R/g P dw)

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Aditivos alimentares e a necessidade de sua utilização

1.1.1. Importância dos aditivos alimentares

Embora a alimentação seja uma necessidade imutável para a manutenção da vida, a forma como os alimentos são consumidos sofreu profundas mudanças ao longo dos anos. Em um mercado global competitivo, como o verificado atualmente, o método mais barato de preservação de alimentos é sempre favorecido e, na maioria dos casos, os aditivos alimentares são escolhidos em relação aos demais. Além disso, tais aditivos são essenciais para permitir que a indústria alimentar atenda às demandas legais e comerciais cada vez mais desafiadoras (Carocho et al., 2015).

O *Codex Alimentarius* (1995) define aditivo alimentar como qualquer substância que normalmente não se consome como alimento por si só, e não é utilizado como um ingrediente típico, que tenha ou não valor nutritivo, e que se adiciona intencionalmente nos alimentos com fins tecnológicos ou organolépticos durante a sua fabricação, envase, transporte ou armazenamento.

Os aditivos são aplicados aos alimentos por razões tecnológicas, nutricionais ou sensoriais. No que concerne ao aumento do valor nutricional, os aditivos geralmente utilizados pertencem ao grupo das vitaminas, minerais e aminoácidos, por exemplo. Quando se deseja melhores atributos sensoriais, adicionam-se corantes, aromatizantes ou agentes texturizantes. Já quando se pretende aumentar o tempo de prateleira, além de utilizar técnicas de processamento diferenciadas que permitam prolongar a vida útil do produto, pode-se recorrer à utilização de conservantes (Belitz et al., 2009).

São reconhecidos os benefícios agregados à utilização de aditivos na produção de alimentos. Alguns dos maiores benefícios proporcionados por esses compostos correspondem à garantia de alimentos mais seguros, alargando o leque de produtos disponíveis que podem, também, atingir um preço inferior. Atualmente, existem mais de 2500 aditivos que são intencionalmente adicionados aos alimentos visando distintos fins (Carocho et al., 2014).

1.1.2. Contextualização legal

Dentro da União Europeia (UE), os aditivos alimentares encontram-se divididos em 26 classes, variando de acordo com a função que estes possuem no alimento: edulcorantes, corantes, conservantes, antioxidantes, agentes de transporte, acidificantes, reguladores de acidez, antiaglomerantes, antiespumas, agentes de volume, emulsionantes,

sais de fusão, agentes de endurecimento, intensificadores de sabor, espumantes, geleificantes, agentes de revestimento, humidificantes, amidos modificados, gases de embalagem, propulsores, levedantes químicos, sequestrantes, estabilizadores, espessantes e agentes de tratamento de farinha (Parlamento Europeu, 2008).

Perante a legislação brasileira (Presidência da República, 1965), os aditivos alimentares são organizados em 11 classes, nomeadamente, corantes, flavorizantes, conservantes, antioxidantes, estabilizantes, espumantes e antiespumantes, espessantes, edulcorantes, umectantes, anti-umectantes e acidulantes.

Para além da sua classificação funcional, os aditivos podem ser divididos em 4 grupos fundamentais quanto à sua origem e/ou fabricação: aditivos naturais, que são os obtidos diretamente de animais ou plantas; aditivos idênticos aos naturais, que são produzidos sinteticamente imitando as estruturas químicas dos compostos naturais; aditivos modificados de naturais, que são naturais, porém passaram por processos que os modificaram quimicamente; e, finalmente, aditivos artificiais ou sintéticos que são os compostos obtidos por via química mas cujas estruturas químicas não existem na natureza (Carocho et al., 2014).

1.1.3. O caso dos corantes alimentares

A primeira característica observada num alimento é a sua cor; de facto, através da coloração é feito um pré-julgamento e criada uma expectativa acerca das suas características de sabor e qualidade (Martins et al., 2017). A cor é prontamente associada ao sabor do produto, por exemplo, os produtos de coloração vermelha são geralmente associados ao sabor do morango. São poucos os casos em que a cor do alimento não remete ao seu sabor (Houghton & Hendry, 1996). Da produção à conservação de alimentos, existe o desejo e a necessidade de que os produtos industrializados apresentem coloração idêntica à dos produtos naturais originais (Coultate, 1998).

A cor dos alimentos atribuiu-se a diferentes fatores, nomeadamente à presença natural de pigmentos corantes, à formação de pigmentos como produto de reações químicas ou enzimáticas e à adição intencional de corantes (Mateos-Aparicio, 2017). Os corantes alimentares são adicionados aos alimentos nos casos em que se pretende recuperar a sua cor original que foi alterada durante o processamento, propiciar um aspeto atraente, proteger constituintes do alimento sensíveis à luz, além de preservar a cor característica do produto original (Martins et al., 2016).

Na UE, o regulamento CE nº 1333/2008, do Parlamento Europeu e do Conselho, prevê o estabelecimento de uma lista de aditivos alimentares aprovados para utilização alimentar, bem como as respetivas condições de uso. Este documento define corantes como substâncias que conferem ou restituem cor a um género alimentar, que normalmente não são consumidas como géneros alimentares em si mesmos, nem é utilizado como ingredientes característicos dos géneros alimentares.

Dado que a diversidade de compostos com poder corante é elevada e a sua aplicação é vasta, desde alimentos até para bebidas, houve a necessidade de criar um controlo mais apertado sobre estas substâncias. Para tal, cada país possui uma legislação própria que especifica quais os agentes permitidos, ou não, e em que dose podem ser aplicados nos produtos alimentares. Esta medida também é justificada pela preocupação resultante do uso sem restrições de agentes corantes, e outros, e dos seus efeitos sobre a saúde humana (Ring et al., 2001).

Existem várias formas de se classificarem os corantes. Estas podem ter por base a sua fonte de origem, o processo de certificação, ou ainda, o tipo de grupo cromóforo, isto é, o radical que lhe confere uma determinada cor. De acordo com sua origem os corantes podem ser obtidos de fontes naturais (vegetais, animais ou minerais) ou de fontes sintéticas (produzidos por síntese química) (Carocho et al., 2014). Estas podem ser depois subdivididas em outras classes conforme apresentado na Figura 1.

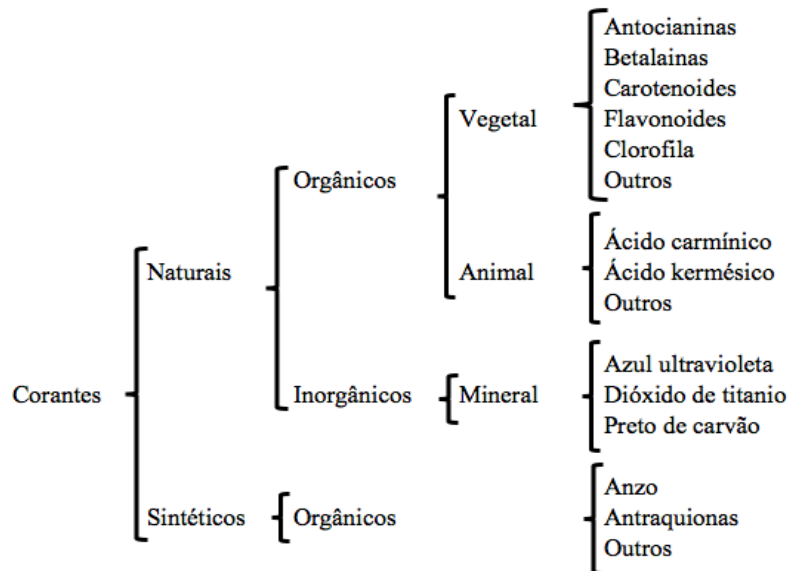


Figura 1: Classificação dos corantes de acordo com a fonte de origem.

Fonte: Garibay et al., 2000

1.2. Corantes artificiais *versus* corantes naturais

1.2.1. Corantes artificiais e o receio quanto à segurança alimentar

Em 1865, o químico inglês Perkin sintetizou o primeiro corante orgânico de importância comercial que foi designado de *mauve*, púrpura de anilina, ou ainda, púrpura de Tiro. Esta descoberta permitiu incrementar os avanços na pesquisa sobre corantes artificiais, impulsionando, algum tempo depois, a síntese de vários outros compostos químicos coloridos (Garibay et al., 2000).

Os corantes artificiais (ou sintéticos) são capazes de conferir aos produtos onde são introduzidos uma ampla gama de cores, cobrindo praticamente todas as tonalidades do espectro da radiação visível. Adicionalmente, o baixo custo de produção, a elevada estabilidade, o elevado poder corante e a uniformidade de cor, associaram aos corantes artificiais inegáveis vantagens de utilização, comparativamente com os corantes naturais (Benvidi et al., 2017). Porém, estas vantagens são também acompanhadas de diversos problemas que resultam de um estudo contínuo e aprofundado dos seus efeitos adversos na saúde (Celli & Brooks, 2017).

Um dos fatores preocupantes acerca da segurança que envolve os corantes artificiais é que, de facto, a maioria dos produtos alimentares em que esses corantes são aplicados são consumidos diariamente, isto é, bebidas, coquetéis, produtos à base de carne, entre outros (Martins et al., 2016).

Na tentativa de limitar o uso desenfreado de corantes e aditivos artificiais em geral, o *Codex Alimentarius* (1995) introduziu o conceito de doses a serem respeitadas na adição destes componentes a matrizes alimentares. A dose diária admissível (DDA), por exemplo, é uma estimativa da quantidade do aditivo alimentar a ser ingerida, sem que resulte em problemas para a saúde. A DDA é expressa em relação à massa corporal e serve como parâmetro para estudos de caso envolvendo doses ingeridas e efeitos observados.

Para além de sintomas moderados, como as reações alérgicas, por exemplo, os corantes artificiais já foram reportados como responsáveis por causar mudanças comportamentais em crianças. O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é o mais comum, sendo que seis corantes alimentares artificiais estão atualmente indicados como apresentando este efeito negativo, nomeadamente, tartrazina, amarelo de quinolona, amarelo *sunset* FCF, carmoisina/azorubina, ponceau 4R e vermelho allura AC (Martins et al., 2016). O estudo realizado por McCann et al. (2007) associou o TDAH,

em crianças de três a nove anos de idade, à ingestão de alimentos contendo quatro corantes artificiais derivados do benzoato de sódio. A evidência destes dados prova a importância clínica dos efeitos observados e a gravidade dos perigos associados à ingestão de corantes artificiais (Mateos-Aparicio, 2017).

Garibay et al. (2000) descreveram sobre um estudo realizado nos Estados Unidos em 1906 com 80 corantes artificiais. Da lista utilizada, 30 corantes nunca tinham sido testados em termos da sua segurança, 26 apresentaram resultados diversos e 8 deles foram considerados de elevado risco para a saúde humana. Muitos corantes foram também identificados como responsáveis por causarem pequenos danos na saúde, nomeadamente o amarelo *sunset* e o amarelo tartrazina, que estão associados a problemas de alergia.

Para além das pesquisas já realizadas, estudos clínicos devem ser realizados a fim de elucidar os efeitos toxicológicos e outros efeitos adversos à saúde provenientes não apenas da ingestão de um corante sintético isolado, mas a de uma mistura de corantes (cenário também encontrado nos alimentos) (Amchova et al., 2015).

1.2.2. A alternativa dos corantes naturais

Face à consciencialização da população sobre a toxicidade e uso excessivo de aditivos alimentares artificiais, a importância da indústria de corantes artificiais tende a diminuir, surgindo um crescente interesse pela utilização de corantes naturais, tanto por parte da indústria alimentar, como por parte do consumidor. Os resultados de estudos que relacionam a produção e consumo de corantes artificiais com diferentes formas de poluição ambiental e diversos efeitos secundários toxicológicos adversos para a saúde humana (por exemplo distúrbios mentais), só aumenta o interesse e a necessidade de existirem alternativas no campo dos corantes naturais, bem como proceder à identificação e diversificação de matrizes para extração de pigmentos (Salem et al., 2014).

Os corantes naturais são compostos orgânicos ou inorgânicos derivados de fontes naturais e utilizados na preparação de produtos alimentares. Seu uso e aplicação em matrizes alimentares é permitido em todas as partes do mundo (Houghton & Hendry, 1996). Não obstante, a obtenção destes componentes naturais apresenta algumas desvantagens frente aos corantes artificiais, tanto do ponto de vista económico como tecnológico, dado que estes são mais caros e menos estáveis. Porém, por questões de segurança, é crescente a procura por produtos industrializados que utilizem ingredientes naturais na sua formulação, visto que a maioria dos corantes naturais são considerados

inofensivos e/ou até saudáveis, característica não associada aos corantes sintéticos (Martins et al., 2016)

Este grupo de corantes abrange uma diversa gama de compostos, o que dificulta uma avaliação generalizada sobre a sua performance. Porém, uma das considerações que pode ser feita é que a sua utilização em produtos alimentares resulta no desenvolvimento de uma aparência mais “natural” (Houghton & Hendry, 1996). Adicionalmente, os corantes obtidos de fontes naturais são também complementados por uma gama de componentes bioativos importantes e com efeitos benéficos para a saúde. Tais efeitos envolvem atividade antioxidante (proteção contra a oxidação celular), efeito anti-inflamatório e prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (Rodriguez-Amaya, 2016).

1.3. O caso particular das antocianinas

1.3.1. Caracterização química

Para além da clorofila, as antocianinas são o grupo mais significativo de pigmentos vegetais visíveis e solúveis em água que podem ser encontrados na natureza. Esses compostos podem existir em quase todas as partes da planta terrestre, incluindo as raízes, caules, folhas, flores e frutas, sendo responsáveis pela ampla variedade de tons vermelho, azul e roxo existentes na natureza (Garibay et al., 2000; Zhao et al., 2017).

Pertencentes ao grupo flavonóide de polifenóis, a molécula de antocianina ocorre naturalmente nas plantas como um glucósido, onde a antocianidina (aglicona) está ligada a um grupo de açúcar (R_1), podendo este ser glucose, galactose, ramnose, xilose ou arabinose, por exemplo. Quimicamente, as antocianidinas são derivados de poli-hidroxi ou de polimetoxi de 2-fenilbenzopirílio: 2 anéis de benzoílo (A e B) separados por um anel heterocíclico (C) (Figura 2) (Pojer et al., 2013).

As possibilidades de variações químicas da antocianina permitem a existência de uma grande variedade de compostos e, conseqüentemente, de colorações (Rustioni et al., 2013). Existem mais de 600 compostos pertencentes ao grupo das antocianinas, presentes em proporções variadas em diferentes matrizes. Algumas frutas como, por exemplo, o morango, possui apenas dois ou três tipos de antocianinas na sua composição, enquanto algumas variedades de uva podem apresentar pelo menos 15 tipos (Houghton & Hendry, 1996).

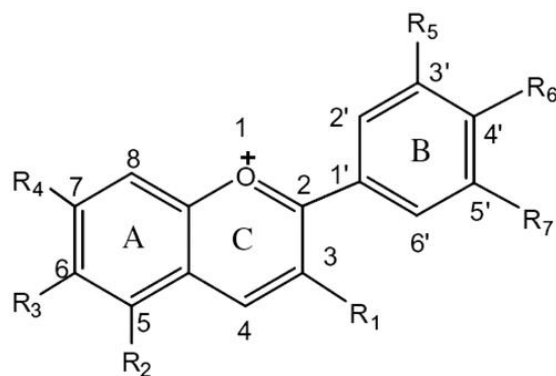


Figura 2: Estrutura química comum às antocianinas. A numeração de átomos e a nomenclatura de anel do núcleo de 2-fenilbenzopirílio são marcadas.

Fonte: Pojer et al., 2013

Entre os vários tipos de antocianinas encontradas na natureza, apenas 6 se destacam na área dos alimentos: cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina e petunidina (Garibay et al., 2000). Na Tabela 1 é apresentada a variação de coloração observada neste conjunto de antocianinas em função do tipo de radicais R_5 e R_7 (Figura 2) presentes na molécula. Estima-se que cerca de 95% das antocianinas existentes na natureza são derivadas dessas seis principais (He & Giusti, 2010).

Tabela 1: Relação entre a estrutura química, cor e λ_{\max} das principais antocianinas encontradas na natureza.

NOME	SUBSTITUINTE		COR	λ_{\max} (nm) EM MeOH ACIDIFICADO EM HCl
	R_5	R_7		
Cianidina	OH	H	Magenta	535
Peonidina	OCH ₃	H	Magenta	532
Pelargonidina	H	H	Vermelho	520
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	Roxo	542
Delfinidina	OH	OH	Roxo	546
Petunidina	OCH ₃	OH	Roxo	543

Fonte: He & Giusti, 2010

Frente a consciência e preferéncia dos consumidores por alimentos promotores da saúde, o desenvolvimento de novos produtos que atendam esta demanda é uma tendência de liderança na indústria alimentar. Diversos compostos bioativos foram identificados nas antocianinas e demonstraram múltiplos efeitos benéficos à saúde humana. Tais efeitos incluem atividade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e imunomoduladoras. O efeito terapêutico desses compostos auxilia na prevenção de doenças como câncer,

doenças cardiovasculares, degenerativas, neuronais, diabetes, entre várias outras (Li et al., 2015; Recharla et al., 2017; Zhao et al., 2017). Até ao momento não foi detetado nenhum efeito nocivo decorrente do consumo de antocianinas, nem existe uma DDA estabelecida, pelo contrário, sua aplicação em produtos alimentares agrega valor comercial devido a gama de componentes bioativos que apresenta (Mateos-Aparicio, 2017).

1.3.2. Poder corante frente à estabilidade das antocianinas

Responsáveis por uma vasta paleta de cores existentes na natureza, as antocianinas fornecem a pigmentação às frutas e vinhos, por exemplo, e podem ainda ser incorporadas em confeituras, conservas, entre outros (Díaz-García et al., 2015). As variações químicas das antocianinas tornam complexo o estudo acerca de sua estabilidade no que se refere a sua incorporação como corante alimentar. Fatores como temperatura, pH e oxigênio, por exemplo, quando em condições específicas, podem afetar sua taxa de deterioração (Estupiñan et al., 2011).

As antocianinas atuam como indicadores de pH. Elas mudam gradualmente a sua coloração de vermelho, passando à roxo, azul e amarelo conforme acréscimo do pH. Porém, quando adicionadas em produtos alimentares, estes geralmente possuem pH em torno de 4, ou menos (Houghton & Hendry, 1996; Rodriguez-Amaya, 2016). De maneira geral, em pH entre 1 e 2 o catião de flavilium vermelho predomina. Conforme acréscimo de pH para valores entre 2 e 4, o catião de flavilium dará lugar a base quinoidal que possui coloração azul. À medida que o pH passa para 4 a 6 há uma tendência da pseudobase de carbinol incolor prevalecer. Para pH 6, o chalcone amarelo pálido torna-se a espécie predominante (Figura 3) (Rodriguez-Amaya, 2016). Contudo, não é apenas a cor da antocianina que varia com o pH, mas também a sua intensidade, que é mais pronunciável a pH igual a 1, e se torna menos intensa conforme o aumento do mesmo (Houghton & Hendry, 1996).

Estudos realizados sobre a estabilidade das antocianinas durante o armazenamento de frutas e vegetais processados demonstraram que o nível deste pigmento diminuiu quanto maior o período e temperatura de armazenamento do produto. Além disso, quando em produtos com uma elevada quantidade de açúcar, e em contato com o oxigênio, a taxa de destruição também foi superior (DeMan, 1999).

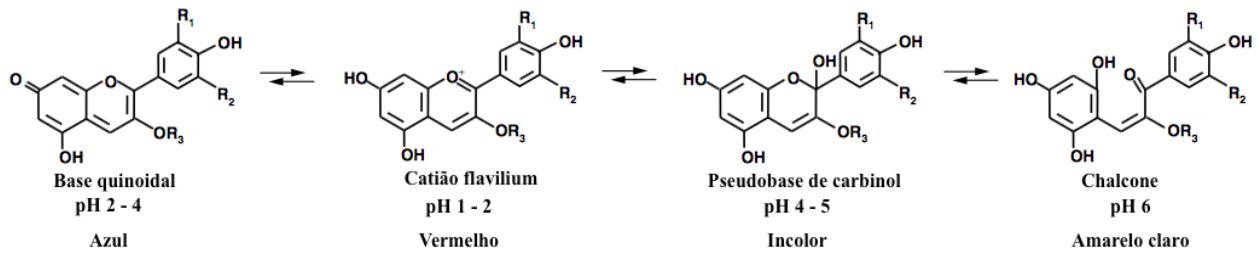


Figura 3: Comportamento químico das antocianinas conforme pH do meio.

Fonte: Rodriguez-Amaya, 2016

A fim de aumentar a estabilidade das antocianinas e ampliar sua aplicação na indústria alimentar, são utilizados parâmetros capazes de atrasar sua degradação. Baixas temperaturas de armazenamento dos produtos, bem como seu baixo pH e evasão da luz são algumas das principais formas de garantir uma maior estabilidade desse corante, preservando suas características de coloração (Ge et al., 2018).

1.4. Explorando recursos para obtenção de antocianinas

1.4.1. Fontes de obtenção alternativas e aplicação como corante na indústria alimentar

Muitos investigadores têm procurado novas fontes de compostos bioativos naturais a fim de tornar a dieta humana mais saudável e funcional (Garcia-Mendoza et al., 2017). O processamento industrial, comercialização e consumo de frutas e legumes, são segmentos que geram uma alta carga de resíduos não aproveitados como, por exemplo, as cascas (Kowalska et al., 2017).

A gestão de resíduos não se refere apenas ao seu descarte. Nas grandes escalas trabalhadas pelas indústrias são notórias as perdas económicas e os prejuízos ambientais resultantes do descarte direto de resíduos (Vong & Liu, 2016). Atualmente, ainda é frequente subestimar o potencial dos resíduos, que acabam por ser utilizados na alimentação animal ou simplesmente descartados no meio ambiente pelos consumidores (Iora et al., 2014).

A uva é um forte exemplo desta contextualização, onde uma quantidade significativa de resíduos por vezes sem aproveitamento, nomeadamente as casca, sementes e hastes, são gerados no seu processamento e consumo direto. Contudo, tais resíduos, em especial a casca, são potenciais produtos de retorno económico, visto que são fontes de compostos bioativos, entre eles as antocianinas (Iora et al., 2014), que possuem importantes funções biológicas para o organismo (He et al., 2016).

A indústria de bebidas foi o primeiro segmento a aplicar antocianinas na coloração dos seus produtos, principalmente em refrigerantes e afins (refrescos, isotônicos, águas aromatizadas, carbonatados, entre outros). O baixo pH destas bebidas, conjugado com o tratamento térmico ligeiro (pasteurização), criam o ambiente perfeito para que as antocianinas exibam o seu brilho e intensidade de coloração em condições de estabilidade adequada. Porém, este não é o único segmento do mercado alimentar que utiliza este tipo de pigmentos. A aplicação de antocianinas também já foi descrita em doces, produtos de confeitaria, coberturas de bolos, gelatinas, rebuçados e sorvetes (He & Giusti, 2010).

Num estudo realizado por Mojica et al. (2017), que avaliou o uso de extratos de antocianinas como corantes alimentares, os autores apontam que fatores como a ampla gama de cores propiciadas pelas antocianinas, além da sua característica de hidrossolubilidade, reforçam e potencializam a sua utilização como pigmentos alimentares naturais.

1.4.2. Obtenção de antocianinas a partir da casca da infrutescência de *Ficus carica* L.

Os figos (Figura 4) são infrutescências da figueira (*Ficus carica* L.), uma árvore decídua pertencente à família Moraceae (Palassarou et al., 2017). Os figos podem ser consumidos de diversas formas, desde fresco, seco, conservado, ou ainda, enlatado. A maior parte da produção mundial ocorre nos países mediterrâneos, onde as dietas são caracterizadas pela ingestão abundante deste produto (Harzallah et al., 2016).



Figura 4: A. Figo inteiro. B. Secção transversal do figo.

Fonte: Arquivo pessoal

Recentemente, o interesse pelo estudo da composição do figo aumentou devido aos seus micronutrientes, como flavonoides e carotenos, por exemplo, além de vários outros compostos fenólicos com atividade antioxidante (Kamiloglu & Capanoglu, 2015; Palassarou et al., 2017). Segundo Vallejo et al. (2012), o vinho tinto e o chá, duas fontes

de referência para os compostos fenólicos, contêm teores inferiores de fenóis relativamente ao figo.

Quando o figo amadurece suas cores são diversas. Dependendo do cultivar a cor da casca pode ser verde, amarela-esverdeada, amarela, vermelha, roxa, ou ainda, violeta-preto. A coloração da casca do figo deve-se principalmente ao acúmulo de antocianinas, que tem conteúdo diferenciado entre os diferentes cultivares (Wang et al., 2017). A forma de consumo da infrutescência varia conforme as regiões, entretanto, ela é geralmente descascada e a polpa consumida, enquanto as cascas se tornam um resíduo direto (Harzallah et al., 2016).

Num estudo realizado por Harzallah et al. (2016), onde foi avaliado o conteúdo total de antocianinas (CTA) em sucos obtidos a partir de diferentes partes do figo (fruto inteiro, polpa e casca) e provenientes de diferentes variedades, determinou-se que as antocianinas são encontradas principalmente na casca da infrutescência, com valores de CTA significativamente superiores aos encontrados na sua polpa. A composição química é dependente da parte do fruto e da variedade, portanto, extratos obtidos a partir de variedades mais escuras, nomeadamente das suas cascas, apresentaram um conteúdo de fitoquímicos superior, em comparação com frutos de coloração mais clara (Harzallah et al., 2016).

São escassos os trabalhos existentes na literatura que envolvem a valorização da casca do figo como fonte de antocianinas. Porém, devido à tonalidade de sua coloração (em variedades específicas), esta pode ser uma potencial fonte para obtenção destes compostos que podem, posteriormente, encontrar aplicação como corante alimentar.

1.4.3. Processos de extração de antocianinas

A extração de um componente é um passo crítico que irá permitir a liberação das moléculas do analito que estão aprisionadas na estrutura de amostras complexas (Chen & Urban, 2015). Existem vários métodos de extração que podem ser utilizados para obtenção de antocianinas a partir de matrizes alimentares, cada um com as suas vantagens e limitações (Tabela 2) (Wang & Weller, 2006). Além da técnica de extração, a recuperação e análise de compostos fenólicos é influenciada por outros fatores, tais como a natureza do composto, padrão e solvente utilizados, tempo e condições de armazenamento (Chen & Urban, 2015), por exemplo, como pode observar-se na síntese do estudo bibliográfico apresentado na Tabela 3.

Tabela 2: Vantagens e desvantagens da diferentes de métodos de extração na obtenção de compostos fenólicos

MÉTODO DE EXTRAÇÃO	VANTAGENS	LIMITAÇÕES
Maceração	Simples; Barato	Necessita etapa da filtração
Soxhlet	Não necessita filtração; Solvente fresco em contato repetido com a amostra	Tempo de extração longo; Promove a decomposição de compostos termo-sensíveis
Ultrassons	Simples; Barato; Utiliza temperaturas de extração baixas	Necessita etapa da filtração
Micro-ondas	Tempo de extração e quantidade de solvente reduzidos	Necessita etapa da filtração; Pouco eficiente com compostos voláteis
Líquidos pressurizados	Requer pouco solvente; Elevado poder de dissolução da amostra	Caro
Fluidos supercríticos	Rápido; Elevada taxa de difusão dos solventes	Caro

Fonte: Azmir et al., 2013; Chan et al., 2013; Chemat et al., 2017; Ongkowitzoy et al., 2018; L. Wang & Weller, 2006

No que se refere ao solvente de extração, sendo as antocianinas pigmentos solúveis em compostos polares, recomenda-se que estas sejam extraídas utilizando soluções alcólicas de metanol ou etanol acidificado. O ácido é empregado para diminuir o pH, prevenindo a degradação das antocianinas e mantendo sua coloração estável. A maioria dos estudos utilizam soluções alcólicas de metanol ou etanol acidificado com HCl, entretanto, devido à toxicidade do metanol é aconselhável que este seja substituído pelo etanol na obtenção de extratos destinados à área alimentar (Março et al., 2008; Ongkowitzoy et al., 2018).

Entre os métodos de extração de compostos fenólicos existentes, a extração assistida por calor (também conhecida como maceração) é uma das mais simples. O método consiste em deixar a amostra em contato com o solvente por um determinado período de tempo e temperatura específica. A agitação durante a maceração facilita a extração, visto que aumenta a difusão dos compostos e remove a solução concentrada da superfície da amostra, pelo que é recomendável manter uma agitação constante (Azmir et al., 2013; Ghasemzadeh et al., 2014).

Tabela 3: Conteúdo total de antocianinas (CTA), em massa seca (dw), obtidas a partir de diferentes técnicas, condições de extração e fontes naturais diversificadas.

TÉCNICA APLICADA	FONTE	PARTE	CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO					CTA (mg/100 g dw)	REFERÊNCIA
			<i>Solvente</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Pressão (bar)</i>	<i>Potência (W)</i>	<i>Tempo (min)</i>		
Maceração	Uva	Casca	Metanol	25	-	-	-	111,00	Chen et al., 2015
	Amora	Polpa	Água	Ambiente	-	-	8	718,47	Yamashita et al., 2017
	Cana de açúcar	Casca	Metanol:Água (40:60)	Ambiente	-	-	12	13,20	Zhao et al., 2018
	Batata doce roxa	Raíz	Etanol:Água (70:30)	60	-	-	90	200,92	Cai et al., 2016
	Mirtilo	Fruto	Etanol:Água (70:30)	Ambiente	-	-	2	1435,00	Cesa et al., 2017
Ultrassons	Batata doce roxa	Polpa	Metanol:Água (80:20)	45	-	-	30	74,73	Qiu et al., 2018
	Haskap	Fruto	Etanol:Água (80:20)	35	-	-	20	2273,00	Celli et al., 2015
	Amora	Fruta	Etanol	25	-	-	15	1150,00	Ivanovic et al., 2014
	Batata doce roxa	Raíz	Etanol:Água (80:20)	40	-	200	45	183,53	Cai et al., 2016
Micro-ondas	Uva	Fruta	Etanol:Água (50:50)	100	-	300	21	1120,00	Álvarez et al., 2017
	Mirtilo	Fruta	Etanol:Água (55:45)	47	-	-	7	1715,58	Zheng et al., 2013
Líquidos pressurizados	Amora	Casca	Etanol:Água (50:50)	80	100	-	30	6630,00	Machado et al., 2017
	Mirtilo	Casca	Etanol:Água (70:30)	80	100	-	30	6929,00	
Fluidos supercríticos	Mirtilo	Fruta	CO ₂ supercrítico	50	350	-	50	4366,00	Kerbstadt et al., 2015
	Mirtilo	Fruta	CO ₂ supercrítico	50	350	-	60	8500,00	Eliasson et al., 2017
Soxhlet	Amora	Casca	Etanol	80	-	-	5	7840,00	Machado et al., 2017
	Mirtilo	Casca	Etanol	80	-	-	5	6830,00	

A extração por ultrassons pode melhorar a obtenção de componentes bioativos sensíveis ao calor dado que utiliza temperaturas de processamento baixas, além de ser uma técnica mais efetiva do que as convencionais. Os efeitos mecânicos dos ultrassons proporcionam maior penetração dos solventes nos materiais celulares, melhorando assim a transferência de massa, enquanto a ruptura das paredes celulares biológicas facilita a liberação do seu conteúdo (Bonfigli et al., 2017; Chemat et al., 2017). A baixa reprodutibilidade e a baixa potência dos ultrassons são alguns dos inconvenientes dos banhos ultrassônicos quando comparado ao método de ultrassons com sonda. Assim, as sondas ultrassônicas de alta potência são preferencialmente utilizadas para efeitos de extração, visto que o sistema de sonda é mais poderoso, devido a uma intensidade ultrassônica distribuída através de uma superfície menor (apenas a ponta da sonda) (Chemat et al., 2017).

A extração auxiliada por micro-ondas é um processo no qual a energia das micro-ondas é utilizada para acelerar a extração (Tsatsop et al., 2016). Este método tem sido amplamente utilizado pelo seu bom desempenho em termos de rendimento de extração, baixo consumo de solvente e tempo de extração. Tais fatores tornam a extração assistida por micro-ondas um método com potencial para substituir os métodos convencionais (Chan et al., 2013).

1.4.4. Otimização de processos de extração

Um processo de otimização refere-se ao melhoramento do desempenho de um sistema como, por exemplo, um método de extração, visando obter o máximo benefício do mesmo. O termo otimização tem sido comumente usado na química analítica como meio de determinar as condições de aplicação de um procedimento que irá produzir a melhor resposta possível. Tradicionalmente, a otimização nos processos químicos é realizada monitorando a influência de cada fator (condições estudadas) isoladamente e sua significância na resposta experimental. A principal desvantagem desta prática consiste no facto de não incluir os efeitos interativos entre os vários fatores e, com isso, não ser capaz de descrever os efeitos completos dos parâmetros na resposta. Para superar esse problema, a otimização de processos químicos, ou mesmo procedimentos analíticos, deve ser realizada usando técnicas estatísticas multivariadas (Bezerra et al., 2008).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma técnica importante para o estudo de casos que permite desenvolver e otimizar processos e produtos através de

equações matemáticas polinomiais. Na metodologia são geradas equações (modelos) que se ajustam aos dados experimentais obtidos e que são capazes de descrever o comportamento das interações entre as várias variáveis e prever as condições que geram respostas ótimas. Adicionalmente, estas informações são obtidas utilizando um número limitado de experimentos (Ranic et al., 2014; Sang et al., 2017).

2. OBJETIVOS

O primeiro objetivo deste trabalho consistiu na comparação de diferentes métodos para a extração de antocianinas a partir da casca do figo (*Ficus carica* L.), nomeadamente extração assistida por calor, por ultrassons e por micro-ondas. As condições ótimas que maximizam o processo de extração de antocianinas foram determinadas utilizando a metodologia de superfície de resposta (MSR), utilizando um delineamento composto central circunscrito com três variáveis e cinco níveis. A identificação dos compostos presentes nos extratos obtidos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de díodos e um de espectrometria de massa com uma fonte de ionização por *electrospray* (HPLC-DAD-ESI/MS).

O segundo objetivo visou a caracterização das propriedades bioativas do extrato obtido nas condições otimizadas no ponto anterior. As bioatividades avaliadas foram a atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e potencial citotóxico em células tumorais. Adicionalmente foi avaliada a citotoxicidade em células não-tumorais humanas visando assegurar a aplicação alimentar em condições de segurança para a saúde humana.

De forma a percorrer toda a cadeia produtiva, isto é, desde a produção do corante natural rico em antocianinas até à sua aplicação, o terceiro objetivo do trabalho consistiu em estudar a aplicação do extrato como corante alimentar, avaliando a sua adequação como potencial substituto de corantes artificiais. Este objetivo foi concretizado aplicando o extrato corante produzido numa matriz alimentar e avaliação da sua estabilidade comparativamente a um controlo (alimento sem adição do ingrediente corante). O produto escolhido foi uma cobertura para donuts, tendo sido avaliadas as suas propriedades físico-químicas, como o pH, cor, textura e valor nutricional logo após adição e após um dia em condições de armazenamento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostra, padrões e reagentes

As infrutescências de *Ficus carica* L. foram obtidas numa produção local do município de Bragança, em Trás-os-Montes, Nordeste de Portugal. As infrutescências foram descascadas e as cascas liofilizadas (FreeZone 4.5, Labconco), trituradas até 20 mesh de tamanho e armazenadas num congelador a -20°C para análise posterior.

A mistura padrão de referência de ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (padrão 47885-U), dicloro-hidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH), ácido acético, ácido fórmico, elipticina, sulforodamina B (SRB), azul de tripano, ácido tricloroacético (TCA) e Tris foram adquiridos na Sigma-Aldrich, assim como os padrões dos açúcares utilizados. O cloreto de hidrogénio, ácido fórmico, acetoneitrilo de grau de pureza HPLC e etanol grau PA foram obtidos na Fisher Scientific. O éter etílico foi adquirido da Lab-Scan. O soro fetal de bovino (FBS), a L-glutamina, a solução salina de Hank's (HBSS), a tripsina-EDTA (ácido etilenodiaminatetraacético), a solução de penicilina/streptomina (100 U/mL e 100 mg/mL), o RPMI-1640 (meio *Roswell Park Memorial Institute*) e o meio DMEM (*Dulbecco Modified Eagle*) forma adquiridos na empresa Hyclone. As células RAW 264.7 foram adquiridas da ECACC (*European Collection of Animal Cell Culture*) (Salisbury, UK). O *Griess Reagent System Kit* foi adquirido da Promega. Meio *Tryptic Soy Broth* (TSB) e meio *Mueller-Hinton Broth* (MHB) foram adquiridos da Biolab®. O corante *p*-iodonitrotetrazóico (INT) foi adquirido da Panreac Applichem. O tolueno, o ácido sulfúrico, e o restante dos reagentes químicos utilizados foram adquiridos na Sigma Chemical Co. A água foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems). O padrão de antocianina (cianidina-3-rutinósido) foi adquirido na Extrasynthèse.

3.2. Técnicas de extração utilizadas e definição das variáveis relevantes para o processo de otimização

A partir de estudos preliminares realizados considerando distintas variáveis individualmente, conjuntamente com a consulta de material bibliográfico, determinaram-se as variáveis relevantes para serem estudadas e otimizadas na metodologia de superfície de resposta (MSR). Para a extração assistida por calor (HAE) e extração assistida por micro-ondas (MAE), as variáveis relevantes consideradas foram o tempo (t), temperatura (T) e composição do solvente extrator (S). Para o método de extração assistido por ultrassons (UAE) a temperatura foi mantida constante, enquanto a potência ultrassónica

(*P*) foi variada, juntamente com o tempo e a composição do solvente. Para todos os ensaios realizados com as três técnicas de extração, a relação sólido-líquido (*S/L*) foi mantida constante (50 g/L). Os requisitos técnicos para cada método de extração são descritos brevemente em seguida.

3.2.1. Extração assistida por calor (HAE)

As amostras da casca de figo liofilizadas na forma de pó (1 g) foram colocadas num goblé com 20 mL de solvente acidificado (pH de 3, utilizando ácido cítrico). O goblé foi colocado num banho termostático (Banho com agitação, OVAN) sob agitação eletromagnética contínua (CimarecTM Magnetic, Thermo Scientific) durante o tempo necessário. As variáveis e intervalos testados foram: *t* (X_1 , 5 a 85 min), *T* (X_2 , 20 a 90°C) e *S* (X_3 , 0 a 100%).

3.2.2. Extração assistida por ultrassons (UAE)

A UAE foi realizada num dispositivo ultrassónico (QSonica sonicators, modelo CL-334) equipado com um temporizador digital e um controlador de temperatura. As amostras liofilizadas em forma de pó (2,5 g) foram extraídas com 50 mL de um solvente acidificado (pH de 3, utilizando ácido cítrico). As variáveis e intervalos testados foram: *t* (X_1 , 5 a 25 min), *P* (X_2 , 100 a 400 W) e *S* (X_3 , 0 a 100%). A *T* foi monitorada para garantir que a temperatura do meio extrativo estivesse sempre entre de 30 - 35°C.

3.2.3. Extração assistida por micro-ondas (MAE)

O processo MAE foi realizado num equipamento Biotage Initiator Microwave (Biotage® Initiator +) utilizando reservatórios fechados. As amostras de casca em pó liofilizada (0,5 g) foram introduzidas em um recipiente de reação fechado com 10 mL de solvente acidificado (pH de 3, utilizando ácido cítrico). Na extração por micro-ondas, as variáveis de pressão e temperatura estão correlacionadas e apenas uma pode ser usada para maximizar as respostas. Em consequência, *T* foi selecionada como variável principal e a potência do micro-ondas ajustada para 400 W. Nestas condições, o *t* necessário para atingir a *T* selecionado foi sempre menor que 20 segundos (especificação do equipamento), garantindo assim um processo de aquecimento rápido (este intervalo de tempo pode ser negligenciado considerando o intervalo de tempo de extração estudado).

Assim, as variáveis e intervalos finais testados foram: t (X_1 , 5 a 35 min), T (X_2 , 40 a 115°C) e S (X_3 , 0 a 100%).

3.2.4. Preparação dos extratos obtidos

As soluções resultantes da extração foram centrifugadas (centrífuga refrigerada Centorion; 600 rpm, 20 min) e filtradas através de um filtro de papel Whatman nº 4 para remover os sólidos em suspensão. Para a determinação do resíduo extraído (R), 5 mL dos extratos foram secos a 105°C em estufa (Pol-eko-aparatura, SLN 240). Para análise e quantificação de antocianinas em HPLC, o solvente foi evaporado a 35°C (Evaporador rotativo, Büchi R-210), os resíduos extraídos foram re-dissolvidos em água acidificada (pH de 3, ajustado com ácido cítrico) e a solução foi posteriormente filtrada com um filtro de seringa (nylon, 0,22 µm).

3.3. Identificação e quantificação de antocianinas

As antocianinas foram analisadas usando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Dionex UltiMate 3000 UPLC, Thermo Scientific) com uma bomba quaternária, um injetor automático (a 5°C), um degasificador e um compartimento de coluna com termostato automatizado. A separação foi feita com uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 µm, 4,6 mm x 150 mm) a 35°C. Os solventes utilizados foram 0,1% ácido trifluoroacético (ATF) em água (A) e acetonitrilo (B). A eluição em modo gradiente seguiu os seguintes parâmetros: 10% B por 3 min, de 10 a 15% B por 12 min, 15% B por 5 min, de 15 a 18% B por 10 min, de 18 a 30% B por 20 min, de 30 a 35% B por 5 min e 35 a 10% B por 10 min. O tempo total de análise foi de 60 minutos, seguido do condicionamento da coluna durante 10 min, a um caudal de 0,5 mL/min. A detecção foi realizada com um detetor de diodos (DAD), utilizando como o comprimento de onda principal 520 nm, e com espectroscopia de massa (EM) ligada em série através da saída da célula DAD. A detecção EM foi realizada em modo positivo utilizando um espectrômetro de massa Linear Ion Trap LTQ XL (Thermo Finnigan) equipado com uma fonte ESI. O azoto foi utilizado como gás de revestimento (50 psi); e o sistema foi operado com uma tensão de pulverização de 4,8 kV, uma temperatura da fonte de 320°C e uma tensão capilar de 14 V. O deslocamento da lente do tubo foi mantido a uma tensão de 75 V. O varrimento abrangeu uma amplitude de massa de m/z 100 a 1500. A energia de colisão utilizada foi de 20 (unidades arbitrárias). A aquisição de dados foi realizada com

o sistema de dados Xcalibur® (Thermo Finnigan). A análise quantitativa foi realizada com base numa curva de calibração de 5 níveis obtida a partir da injeção de padrões com concentrações conhecida de cianidina-3-rutinósido ($y = 146924x - 671583$; $R^2 = 0,9989$).

3.4. Desenho experimental, análise de modelos e avaliação estatística

3.4.1. Desenho experimental por MSR

Os ensaios foram conduzidos com base na análise individual das variáveis estabelecidas para cada uma das técnicas selecionadas. As variáveis que causaram efeitos significativos e as gamas de ação relevantes foram selecionadas para cada uma das técnicas estudadas (Tabela 4). O efeito combinado das três variáveis selecionadas para cada uma das técnicas (ver secção 3.2) foi estudado usando um delineamento composto central circunscrito (DCCC) com cinco níveis para cada uma (Heleno et al., 2016) e 28 combinações de respostas.

Tabela 4: Delineamento experimental e codificação das variáveis independentes usadas no desenho fatorial DCCC com 5 níveis.

VALORES CODIFICADOS	VALORES NATURAIS								
	HAE			UAE			MAE		
	<i>t</i> (min)	<i>T</i> (°C)	<i>S</i> (%)	<i>t</i> (min)	<i>P</i> (W)	<i>S</i> (%)	<i>t</i> (min)	<i>T</i> (°C)	<i>S</i> (%)
-1,68	5	20	0	5	100	0	5	40	0
-1	21,2	34,2	20,3	9,1	160,8	20,3	11,1	51,2	20,3
0	45	55	50	15	250	50	20	75	50
1	68,8	75,8	79,7	20,9	339,2	79,7	28,9	98,8	79,7
+1,68	85	90	100	25	400	100	35	115	100

3.4.2. Formatos dos valores de resposta para análise dos resultados

Os resultados da extração foram expressos em três formatos de valor de resposta (Y): Y_1 , mg de cianidina-3-rutinósido (C) obtidos por g resíduo extraído (R ; mg C/g R), que foi especificamente usado para avaliar a pureza de C nos extratos; Y_2 , em mg de C por g de casca de figo (P), em massa seca, (mg C/g P dw), especificamente utilizada para analisar os rendimentos de extração de C ; e Y_2/Y_1 (g R/g P dw), obtido dividindo as respostas Y_2 por Y_1 , que fornece informação quanto à quantidade de resíduo extraído por g de casca de figo.

3.4.3. Modelo matemático para gerar as respostas

Os dados da MSR foram ajustados por meio do cálculo de mínimos quadrados usando a seguinte equação polinomial de segunda ordem:

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

onde Y é a variável dependente (variável de resposta) a ser modelada, X_i e X_j definem as variáveis independentes, b_0 é um coeficiente constante, b_i o coeficiente de efeito linear, b_{ij} o coeficiente do efeito de interação, b_{ii} o coeficiente do efeito quadrático, e n o número de variáveis. O sinal aritmético marca a influência do efeito (linear, interativo ou quadrático) sobre o desempenho da resposta. Quando um fator tem um sinal positivo, a resposta aumenta à medida que os valores da variável envolvida aumentam, e quando o fator tem um sinal negativo, a resposta diminui. De forma geral, quanto maior o valor absoluto do coeficiente, maior a influência na variável resposta.

3.4.4. Procedimento para otimização das variáveis e maximização da resposta

Para maximização da resposta utilizou-se o método *simplex* para otimizar o modelo preditivo, resolvendo equações não-lineares, a fim de otimizar o rendimento da extração e a recuperação de compostos fenólicos (Vieira et al., 2017). Certas limitações foram impostas às variáveis codificadas (nomeadamente $t \geq 0$) para evitar variáveis com condições físicas não naturais.

3.5. Análise da dose-resposta da razão sólido/líquido

Após encontrar as condições ótimas (X_1 , X_2 e X_3) para cada método de extração pela MSR, a etapa de otimização seguinte consistiu em descrever o padrão da razão sólido/líquido (S/L ou X_4 , expresso em g/L) visando alcançar processos mais produtivos, portanto de maior interesse para aplicações industriais. Para descrever o efeito da resposta em função da variação da razão S/L , foi utilizada a equação de Weibull (W) (Prieto et al., 2015) para aumentar (\uparrow) e diminuir (\downarrow) as respostas (com algumas modificações paramétricas para ajustar às finalidades em estudo):

$$\begin{aligned} \uparrow W(X_4) &= K \exp \left[\ln(1 - n/100) \left(\frac{X_4}{m_n} \right)^a \right] \text{ ou} \\ \downarrow W(X_4) &= K \left\{ 1 - \exp \left[\ln(1 - n/100) \left(\frac{X_4}{m_n} \right)^a \right] \right\} \end{aligned} \quad (2)$$

onde K é o valor máximo para a extração (apresentado nas unidades do critério de resposta utilizado, ou seja, se for Y_2 , a unidade seria mg C/g P dw); a é um parâmetro de forma relacionado com o declive máximo da resposta; n é qualquer nível da resposta a alcançar, entre 0 e 100% da resposta (Y_1 , Y_2 e Y_2/Y_1); e m_n seria o valor de S/L (X_4) para tal nível n de resposta selecionado (m_{10} , m_{25} , m_{75} , m_{95} , etc.). Por exemplo, se selecionarmos o valor de n como 99%, o parâmetro m_n exibirá o valor S/L necessário para atingir os 99% da resposta avaliada ($m_{99\%}$). Quando a resposta mostra padrões crescentes (\uparrow), a equação de Weibull que será usada para descrever a resposta apresentará um parâmetro m_n com $n=99\%$. Quando a resposta mostra padrões decrescentes (\downarrow), um parâmetro m_n com $n=50\%$ será usado. Esses níveis de resposta diferentes, em função de seus padrões crescentes ou decrescentes, são relações lógicas das soluções intrínsecas para fins industriais. Quando a resposta aumenta, é lógico conhecer o valor máximo de S/L necessário para atingir os 99% da resposta avaliada ($m_{99\%}$). No entanto, quando a resposta diminui, o valor de $m_{99\%}$ tenderá para zero, portanto, parece ser lógico procurar valores que não diminuam a resposta mais do que a metade do seu máximo (como $m_{50\%}$). Se outro m_n for requerido, a Eq. (2) pode ser modificada para produzir qualquer outro resultado desejável. Portanto, os valores dos parâmetros selecionados para K e m_n fornecem informação importante relacionada com o padrão da resposta para avaliar o efeito da razão S/L .

3.6. Métodos numéricos, análises estatísticas e ilustrações gráficas

Os procedimentos de ajuste, estimativa de coeficientes e cálculos estatísticos foram obtidos, tal como descrito anteriormente, por outros autores (Prieto & Vázquez, 2014). Em resumo: a) a determinação dos parâmetros foi realizada utilizando-se o algoritmo quasi-Newton (mínimos quadrados), executando a função integrada 'Solver' no Microsoft Excel minimizando as diferenças entre os valores observados e previstos; b) a significância do coeficiente foi avaliada usando a função 'SolverAid' para determinar seus intervalos ($\alpha=0,05$); e c) a consistência do modelo foi verificada por meio de vários critérios estatísticos: ci) o teste F de Fisher ($\alpha=0,05$) foi utilizado para a avaliação da adequação dos modelos para descrever os dados observados; cii) a macro 'SolverStat' foi usada para a avaliação das incertezas de previsão de parâmetros e modelos (Murado & Prieto, 2013); e ciii) o valor de R^2 foi interpretado como a quantidade de variabilidade da variável dependente que é explicada pelo modelo.

3.7. Preparação do extrato de casca de figo nas condições otimizadas e avaliação do seu poder corante

O extrato de casca de figo foi obtido por UAE, tendo por base o método e condições de extração que produziram a melhor resposta global na obtenção de cianidina-3-rutinósido. As condições utilizadas foram: 21 min, 311 W, 100% de etanol e uma razão sólido/liquído de 183 g/L. Após obtenção do extrato, o etanol foi completamente evaporado a 35°C num evaporador rotativo (Büchi R-210) de forma a obter o extrato seco.

O poder corante do extrato foi avaliado com auxílio de um colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc.). Utilizou-se o iluminar C e uma abertura de diafragma de 8 mm, previamente calibrada relativamente a um azulejo branco padrão. Os valores de espaço de cor CIE L^* (luminosidade), a^* (verde/vermelho) e b^* (azul/amarelo) foram registados através de um software de dados “Spectra Magic Nx” (versão CM-S100W 2.03.0006).

O poder corante foi também avaliado através da quantificação cromatográfica da cianidina-3-rutinósido (composto antociânico maioritário no extrato), por HPLC-DAD, de acordo com a metodologia descrita na secção 3.3.

O extrato foi posteriormente armazenado nas melhores condições (ausência de luz e oxigénio) até realização das análises subseqüentes.

3.8. Avaliação das propriedades bioativas do extrato da casca do figo

3.8.1. Avaliação da atividade antioxidante: inibição da peroxidação lipídica (TBARS)

Para a realização do método foi necessária a preparação de uma suspensão de células de cérebro de porco (obtido de animais oficialmente abatidos) a partir da sua homogeneização em solução tampão Tris-HCl (20mM, pH 7,4) na razão 1:2 (*m/v*) e posterior centrifugação (5400 rpm, 10 min).

Num eppendorf, foram adicionados 200 μ L das diferentes diluições dos extratos etanólicos da casca do figo (ou o solvente de extração, no caso do controlo), 100 μ L de ácido ascórbico (0,1 mM), 100 μ L de sulfato de ferro (10 mM) e 100 μ L de sobrenadante da suspensão de cérebro previamente preparada. Os eppendorfs foram incubados a 37°C por 1 hora e, posteriormente, a reação foi interrompida pela adição de 500 μ L de ácido tricloroacético (28%). Adicionaram-se 380 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA; 2%) e a mistura foi mantida a 80°C por 20 minutos. O precipitado presente no eppendorf foi separado por centrifugação (Microfuge 16, Beckman Coulter; 60000 rpm, 5 min) e a

intensidade da cor do sobrenadante foi medida por espectrofotometria a 532 nm (Barros et al., 2010). A percentagem de inibição da peroxidação lipídica de cada concentração de extrato foi calculada a partir da Eq. (3).

$$\text{Percentagem de inibição (\%)} = \left[\frac{AC-AE}{AC} \right] \times 100 \quad (3)$$

onde AC é a absorbância do controlo e AE a absorbância da solução de extrato. O valor de EC₅₀, isto é, a concentração de extrato que possibilita a inibição de 50% da peroxidação lipídica, foi determinado a partir da curva que melhor se ajusta aos pontos obtidos através da equação.

3.8.2. Avaliação da atividade antioxidante: inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA)

Para a realização deste método, foi efetuada uma colheita de sangue de ovelha. A amostra de sangue foi centrifugada (Multifuge X1R, Thermo Fisher Scientific; 2900 rpm, 5 min, 10°C) e o sobrenadante foi descartado de modo a recuperar apenas os eritrócitos. Estes foram submetidos a uma primeira lavagem com NaCl (150 mM) seguida de três lavagens com tampão fosfato-salino (PBS; pH 7,4), com centrifugação e remoção do sobrenadante a cada lavagem (Evans et al., 2013). Preparou-se, então, uma solução de eritrócitos a 2,8% (v/v), ressuspendendo em PBS. Em microplacas de 48 poços foram adicionados 200 µL da solução de eritrócitos a 400 µL de PBS (controlo), de água (hemólise completa) ou de extrato de casca de figo dissolvido em PBS (20 a 0,625 mg/mL). As microplacas foram submetidas a pré-incubação com agitação (37°C, 10 min) para posterior adição de 200 µL de dicloridrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH; 160 mM). Após medição da densidade óptica a 690 nm, as microplacas foram novamente incubadas nas mesmas condições, com medições a cada 10 min (Takebayashi et al., 2012). A percentagem da população de eritrócitos que permaneceu intacta (PE) foi calculada da seguinte forma:

$$\text{PE (\%)} = (S_t - CH_0 / S_0 - CH_0) \times 100 \quad (4)$$

onde S_t e S₀ correspondem à densidade óptica da amostra nos instantes t e 0 min, respectivamente, e CH₀ é a densidade óptica da hemólise completa a 0 min. Os resultados foram expressos como tempo de atraso da hemólise (Δt), que foi calculado da seguinte forma:

$$\Delta t \text{ (min)} = H_{t80} \text{ (amostra)} - H_{t80} \text{ (controlo)} \quad (5)$$

onde Ht_{80} é o tempo correspondente a 80% de hemólise (min) obtido graficamente a partir da curva de hemólise para cada concentração de amostra antioxidante.

Posteriormente, foram estabelecidas correlações lineares entre os valores de Δt e as diferentes concentrações de amostra (Takebayashi et al., 2012). A partir das mesmas, foi calculada a concentração capaz de retardar a hemólise em 60 min ($EC_{80(60\text{ min})}$, mg/mL) e 120 min ($EC_{80(120\text{ min})}$, mg/mL).

3.8.3. Citotoxicidade em linhas celulares tumorais humanas

Para avaliar o potencial citotóxico dos extratos da casca do figo, realizou-se o ensaio da Sulforodamina B (SRB) de acordo com o procedimento previamente descrito por (Abreu et al., 2011). Para isso foram analisadas quatro linhas celulares tumorais: MCF-7 (carcinoma mamário), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular), obtidas no DSMZ – Leibniz – *Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ECACC (European Collection of Cell Cultures)*.

As linhas celulares foram mantidas como culturas aderentes em meio RPMI-1640 contendo FBS (10%) inativado pelo calor, suplementado com glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$), numa incubadora a 37°C com ar humidificado e 5% de CO_2 .

Foram adicionados 190 μL de cada linha celular previamente preparada com densidade apropriada ($1,0 \times 10^4$ células/poço), em poços contendo 10 μL das diferentes diluições do extrato (400 a 1,5 $\mu\text{g/mL}$), tendo sido estas incubadas por 48 horas.

Após o período de incubação, as células aderentes foram fixadas pela adição de 100 μL de ácido tricloroacético (TCA; 10%) previamente refrigerado e mantidas a 4°C por 60 minutos. Em seguida, as microplacas foram lavadas com água deionizada e secas ao ar. Foram adicionados 100 μL da solução SRB (0,1% em 1% de ácido acético) em todos os poços da microplaca e incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente. O excesso de SRB foi removido através da lavagem das microplacas com ácido acético a 1% e estas foram novamente secas. A SRB ligada foi solubilizada com 200 μL de Tris-HCl (10 mM) e a absorbância foi medida a 540 nm num leitor de microplacas (Biotek Elx800). A elipticina foi utilizada como controlo positivo.

As curvas de dose-resposta que relacionam a concentração do extrato utilizada com a porcentagem de inibição do crescimento celular foram obtidas e o valor de GI₅₀, que corresponde à concentração de extrato que inibe 50% do crescimento celular, calculado.

3.8.4. Citotoxicidade numa cultura primária não tumoral

Neste teste foi utilizado fígado de porco, obtido num matadouro local, de forma a obter uma cultura celular não tumoral designada por PLP2 (cultura primária de células de fígado de porco). O tecido de fígado foi lavado com solução Hank's contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e dividido em explantes de aproximadamente 1 mm³.

Alguns destes explantes foram colocados em frascos de 25 cm² contendo meio DMEM suplementado com FBS (10%), aminoácidos não essenciais (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Os frascos foram incubados a 37°C com atmosfera humidificada e 5% de CO₂. O meio foi substituído a cada dois dias de incubação e o crescimento celular foi monitorizado por observação com um microscópio de contraste de fase.

Foram transferidos para microplacas de 96 poços 190 µL da cultura celular com densidade adequada (1,0x10⁴ células/poço), juntamente com 10 µL das diferentes diluições do extrato (400 a 1,5 µg/mL), incubando-se a 37°C por 48 horas. Em seguida, efetuou-se o ensaio SRB anteriormente descrito (índice 3.8.3.). A elipticina foi utilizada como controlo positivo e os resultados foram expressos em GI₅₀.

3.8.5. Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi avaliada segundo metodologia descrita por Corrêa et al. (2015). A linha celular de macrófagos de rato RAW 246.7, foi mantida em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor, 1% de L-glutamina, 1% de aminoácidos não-essências e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina) a 37°C, 5% de CO₂ e atmosfera humidificada.

Para o ensaio foram preparadas suspensões celulares com uma densidade de 5x10⁵ células/mL. A viabilidade celular foi calculada pelo teste da exclusão de Azul de tripano, onde se verificou ser inferior a 5%. Em seguida as células foram transferidas em microplacas de 96 poços com 150000 células/poço, e foram incubadas durante 24 h a 37°C com 5% de CO₂.

Após incubação, os macrófagos foram tratados com diferentes concentrações do extrato da casca do figo (400 a 1,56 µg/mL) durante 1 hora. De seguida procedeu-se à estimulação celular pela adição de lipopolisacarídeos (LPS; 1 µg/mL) aos poços, durante 24 horas. Foram realizados controlos na ausência de LPS para observar se estes induziam alterações a níveis basais de óxido nítrico (NO). As amostras e o LPS foram preparados em DMEM suplementado e a dexametasona foi utilizada como controlo positivo.

A presença de óxido nítrico foi determinada através da utilização do Kit de Reagentes *Griess*, que contém sulfanilamida, hidrócloro de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) e soluções nitradas. Para isso, 100 µL do sobrenadante da cultura celular foram transferidos para outra placa e misturados com sulfanilamida e soluções NED e mantidos em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente. O óxido nítrico produzido foi determinado através da absorbância a 540 nm (leitor de microplacas Biotek ELX800) e comparado com a curva de calibração padrão ($y = 0,007x + 0,1328$, $R^2 = 0,9982$). O valor de EC₅₀ foi calculado a partir do gráfico que descreve a percentagem de inibição da produção de NO *versus* a concentração da amostra.

3.8.6. Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada utilizando microrganismos provenientes de isolados clínicos (Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal). Foram usadas nove bactérias:

Bactérias Gram-positivo: *Enterococcus faecalis* (isolado de urina); *Listeria monocytogenes* (isolada de líquido cefalorraquidiano); *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina - MRSA (isolado de expetoração); *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina - MSSA (isolados de exsudado de ferida);

Bactérias Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* (isoladas de expetoração), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Morganella morganii* (isoladas de urina).

A identificação dos microrganismos e os testes de suscetibilidade foram feitos utilizando painéis MicroScan (MicroScan®; Siemens Medical Solutions Diagnostic) pelo método de microdiluição em placa. Os critérios de interpretação foram baseados em Breakpoints Interpretativos, conforme indicado no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) e no *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2013).

Para determinar a atividade antimicrobiana do extrato foi utilizado o método de microdiluição em microplaca por ensaio colorimétrico utilizando o corante cloreto de *p*-iodonitrotetrazóico (INT) segundo o protocolo de Kuete et al. (2011) com algumas modificações. Foi preparada uma solução padrão a partir do extrato alcoólico liofilizado da casca do figo dissolvendo 100 mg em 1,5 mL de meio de cultura MHB ou TSB de acordo com o tipo de bactéria e 500 µL de DMSO. Preparou-se a partir desta solução padrão uma concentração inicial de 20 mg/mL de extrato. Desta solução foram colocados 190 µL no primeiro poço de uma microplaca de 96 poços. Os restantes poços foram preenchidos com 90 µL de meio de cultura TSB ou MHB. Posteriormente foram feitas diluições sucessivas retirando 90 µL do primeiro poço para o segundo e assim sucessivamente até a obtenção de uma concentração de 0,156 mg/mL.

Foram adicionados 10 µL de inócuo bacteriano a cada poço da microplaca, após sua preparação previa com turvação correspondente a 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). As microplacas foram incubadas a 37°C durante 24 horas numa estufa (Jouan). Os ensaios foram realizados em duplicado. Foram realizados 3 controlos negativos. O primeiro apenas com meio de cultura (MHB/TSB) com 5% de DMSO, o segundo com meio de cultura (MHB/TSB), bactéria e antibiótico e o terceiro o extrato sozinho. Para as bactérias Gram positivo o antibiótico utilizado foi a Vancomicina e Ampicilia. Para as bactérias Gram negativo foi usada a Ampicilia e o Imipenem. Foi ainda realizado um controlo positivo com bactéria e meio de cultura (MHB/TSB) com 5% de DMSO.

Decorridas as 24 horas foram adicionados 40 µL cloreto de *p*-iodonitrotetrazóico (INT) (0,2 mg/mL) em todos os poços com posterior incubação por 30 minutos a 37°C. Os organismos viáveis provocaram uma alteração na cor de amarelo para cor-de-rosa. A CMI foi definida como sendo a menor concentração de extrato para inibir o crescimento bacteriano e a CMB como sendo a menor concentração capaz de produzir um efeito bactericida.

3.9. Aplicação do extrato corante da casca do figo num produto alimentar: cobertura para donuts

3.9.1. Preparação da cobertura para donuts (glacê)

A cobertura, aqui também referida de glacê, foi preparada em banho-maria adicionando chocolate branco que foi homogeneizado com natas na proporção 3:1 *m/m* (560 g de chocolate para 186,6 g de natas). Ainda sob aquecimento, adicionou-se ácido

cítrico na proporção 1:200 *m/m* (2,8 g), relativamente ao chocolate (abaixo do valor máximo de 5 g/kg estipulado pela legislação (Parlamento Europeu, 2011)). O preparado foi então dividido em duas porções, numa porção foram adicionados extrato corante de casca de figo (0,7% em relação à massa total do glacê), enquanto na outra não se fez qualquer adição (controlo). Cada uma destas porções foi ainda dividida em duas partes para posterior análise físico-química e nutricional em diferentes tempos de armazenamento (0 e 1 dias).

3.9.2. Avaliação da cor, pH e textura ao longo do tempo de armazenamento

A cor das amostras foi medida com o auxílio de um colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc.), conforme especificações apresentadas na secção 3.7.

O pH das amostras foi medido utilizando um medidor de pH HI 99161 (Hanna Instruments).

A textura foi determinada utilizando um equipamento TA. XT. Plus Texture Analyser (Stable Micro System) de forma a medir os seguintes parâmetros: firmeza, consistência, coesão e o índice de viscosidade da cobertura, utilizando uma sonda de extrusão invertida de 45 mm de diâmetro, num copo de medição com 7 mm de altura e 48 mm de diâmetro interno contendo 58 g de amostra, o que representou uma altura de 25 mm. A velocidade de subida e descida da sonda foi mantida constante a 2 mm/s.

As determinações foram realizadas em triplicado para cada amostra, com excessão dos parâmetros reológicos, nos quais se efetuou uma medição por amostra.

3.9.3. Avaliação dos macronutrientes e valor energético ao longo do tempo de armazenamento

Para determinar a composição química das diferentes amostras de cobertura preparadas analisou-se o teor de humidade, cinzas, proteínas, gordura e hidratos de carbono, segundo os procedimentos descritos pela AOAC (2016). A humidade foi determinada pela diferença de massa do glacê antes e após liofilização (FreeZone 4.5, Labconco). As cinzas foram determinadas por diferença de massa através de incineração em mufla (Optic ivymen system) a $660\pm 15^{\circ}\text{C}$. As proteínas totais foram estimadas pela técnica macro-Kjeldahl em equipamento específico (Pro-Nitro A, Selecta) através da determinação do azoto total presente na amostra ($\text{Nx}6,25$). A gordura total foi determinada após extração e secagem de uma massa conhecida da amostra com éter de

petróleo, utilizando para o efeito um aparelho de Soxhlet. O teor de hidratos de carbono (g/100 g pf) foi calculado por diferença através da Eq. (6) e a energia total (Kcal/100 g pf) foi determinada de acordo com a Eq. (7).

$$\text{MHC} = 100 - (\text{MP} + \text{MG} + \text{MC}) \quad (6)$$

$$\text{Energia} = 4 \times (\text{MP} + \text{MHC}) + 9 \times \text{MG} \quad (7)$$

onde MHC é a massa de hidratos de carbono (g/100 g pf), MP é a massa de proteínas (g/100 g pf), MG é a massa de gordura (g/100 g pf) e MC é a massa de cinzas (g/100 g pf).

Os açúcares livres presentes nas diferentes amostras de glacê foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), conforme descrito por Barros et al. (2013), com algumas modificações. A amostra (1 g) foi enriquecida com 1 mL de melezitose como padrão interno (PI; 25 mg/mL) e sujeita a extração com 40 mL de uma mistura etanol:água (80:20 v/v), a 80°C durante 90 min. A suspensão resultante foi centrifugada (centrífuga refrigerada Centorion) a 600 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi filtrado e concentrado a 40°C sob pressão reduzida e os vestígios de gordura foram removidos em três lavagens sucessivas com 10 mL de éter etílico. Após concentração e lavagem, os resíduos sólidos foram dissolvidos em água para um volume final de 5 mL. Os açúcares foram determinados por HPLC (Knauer, sistema Smartline) a 35°C. O sistema HPLC utilizado está equipado com um detetor de RI (Knauer Smartline 2300) e com uma coluna 100-5 NH₂ Eurospher (4,6×250 mm, 5 mm, Knauer). A fase móvel utilizada foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um caudal de 1 mL/min. A identificação dos açúcares detetados em cada amostra foi feita com base no tempo de retenção, por comparação com padrões. A quantificação dos mesmos foi efetuada pelo método do padrão interno utilizando o Software Clarity 2.4 (DataApex), sendo os resultados expressos em g por 100 g de produto fresco (pf).

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID), como descrito anteriormente por Barros et al. (2013). A massa obtida por extração em Soxhlet foi submetida a um processo de trans-esterificação adicionando 5 mL de metanol/ácido sulfúrico/tolueno 2:1:1 (v/v/v), durante pelo menos 12 horas a 50°C e 160 rpm; de seguida, adicionaram-se 3 mL de água desionizada para obter uma separação de fases. Os ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) foram recuperados com 3 mL de éter dietílico com agitação em *vortex*; fazendo-se

posteriormente passar o sobrenadante através de uma microcoluna de sulfato de sódio anidro, com o objetivo de eliminar os resíduos de água. A amostra foi filtrada com um filtro de nylon 0,2 µm Milipore, diluída em éter dietílico filtrado na proporção 1:10 (v/v) e recuperada para um *vial* com tampa contendo uma membrana de teflon. O perfil de ácidos gordos foi obtido num GC modelo DANI 1000 equipado com um injetor *split/splitless*, detetor de ionização de chama (FID) e uma coluna Macherey Nagel (30 m×0,32 mm×0,25 µm). O programa de temperatura do forno foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna foi 50°C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 30°C/min até 125°C, 5°C/min até 160°C, 20°C/min até 180°C, 3°C/min até 200°C, e 20°C/min até 220°C, mantendo-se durante 15 min. O caudal do gás de transporte (hidrogénio) foi de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50°C. A injeção *split* (1:40) foi realizada a 250°C. Para cada análise, injetou-se 1 µL da amostra. A identificação de ácidos gordos foi feita com base no tempo de retenção, por comparação com padrões. Os resultados foram obtidos através do software CSW 1,7 (DataApex 1,7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

3.10. Análise estatística dos parâmetros físico-químicos e reológicos do glacê

Foram analisadas três amostras independentes de glacê e cada amostra caracterizada em triplicado. Os dados foram expressos como média±desvio padrão. Os testes estatísticos foram aplicados considerando um valor de $\alpha=0,05$ (95% de confiança), utilizando o software IBM SPSS Statistics for Windows, versão 22.0. (IBM Corp.).

Foi feita uma análise de variância (ANOVA), com base no teste de Tukey (quando se verificou homoscedasticidade das distribuições) ou no teste de Tamhane's T2 (distribuições heteroscedásticas) para conseguir classificar as diferenças estatísticas entre os diferentes parâmetros avaliados em cada um dos glacês. O cumprimento dos requisitos da ANOVA, especificamente a normalidade da distribuição dos resultados e a homogeneidade das variâncias, foi verificado através de um teste de Shapiro Wilk e um teste de Levene, respetivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Otimização da análise da MSR utilizando as 3 variáveis relevantes para cada método de extração

4.1.1. Ensaios preliminares para seleção das variáveis e gamas relevantes para delinear uma MSR apropriada

A extração de compostos alvo a partir de matrizes naturais requer considerações específicas devido às características intrínsecas e estabilidade dos mesmos, fazendo com que tal análise não possa ser extrapolada a partir de estudos similares. Para que a extração de um composto a partir de uma matriz natural seja bem-sucedida, é necessário realizar um estudo detalhado para determinar o melhor método de extração sólido-líquido e as suas condições de operação, caso contrário, os resultados podem levar a conclusões errôneas.

O perfil de antocianinas dos extratos de casca do figo produzidos foi obtido por HPLC-DAD-ESI/MS. Entre os componentes, foi identificada a cianidina-3-rutinósido ($[M+H]^+$ em m/z 595) (Figura 5), que é a molécula responsável pela sua capacidade corante. Para maximizar a extração de cianidina-3-rutinósido (C), é indispensável identificar os efeitos das variáveis de extração nas respostas. De uma forma geral pretende-se um consumo mínimo de tempo, energia e solvente, de forma a alcançar um sistema de extração mais verde e rentável (Dai & Mumper, 2010). A utilização da MSR permite otimizar todas as variáveis testadas simultaneamente, considerando seus efeitos interativos e prevendo as condições mais eficientes. Tal é conseguido a partir de modelos polinomiais de segunda ordem que permitem identificar interações entre variáveis que são capazes de descrever e maximizar os critérios de resposta selecionados, com base na faixa experimental testada (Bezerra et al., 2008; Ferreira et al., 2007; Kalil et al., 2000). No entanto, para determinar as variáveis relevantes no processo de extração e sua gama experimental de trabalho, é necessário realizar testes laboratoriais preliminares utilizando o método de um fator de cada vez (mantendo as outras variáveis constantes). As variáveis inicialmente testadas foram t , T , P , S e S/L , de acordo com a adequação ao método. Uma vez que essas análises preliminares foram concluídas (dados não incluídos), os fatores selecionados para a aplicação de MSR foram t , T e S para os sistemas HAE e MAE, e t , P e S para o sistema UAE. Resultados semelhantes foram também reportados por outros autores ao realizar estudos de otimização da extração com matrizes naturais (Albuquerque et al., 2017; Caleja et al., 2017).

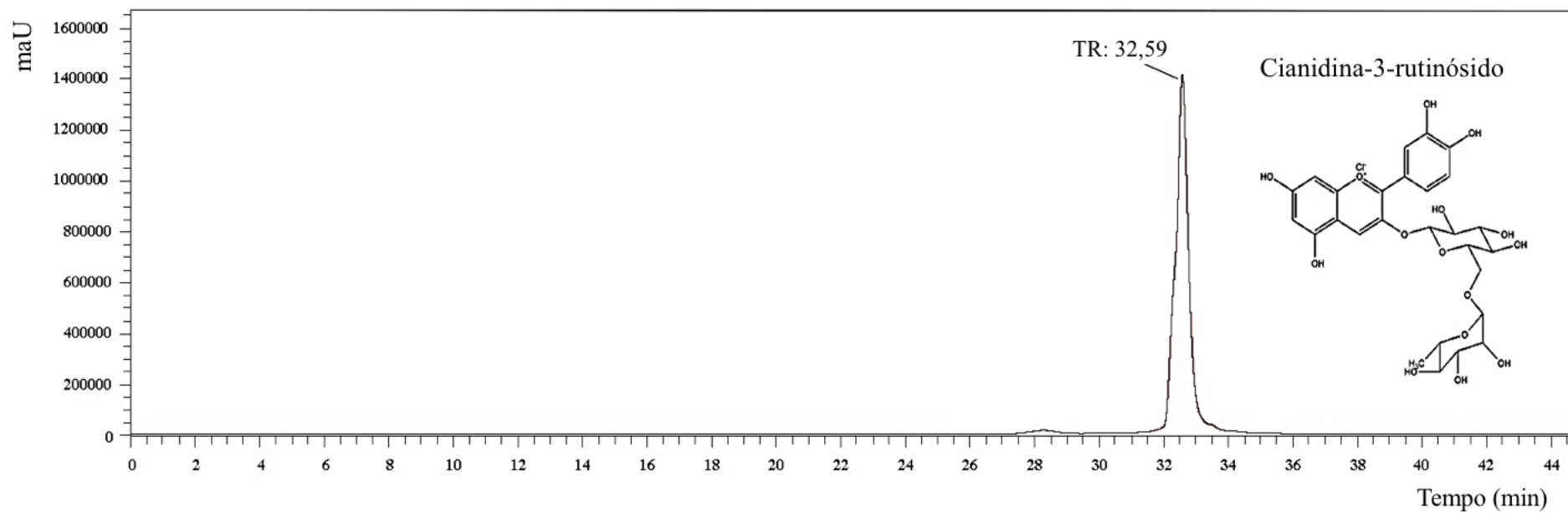


Figura 5: Representação do perfil de antocianinas do extrato de casca de figo obtido por HPLC-DAD e registrado a 520 nm. O tempo de retenção (TR) é apresentado junto ao pico.

Uma descrição detalhada de todos os valores testados para cada técnica está apresentada na Tabela 4. Pelo fato de as antocianinas serem pigmentos com características polares, o solvente empregado para extração foi uma solução hidroalcoólica (mistura etanol/água). Para todas as técnicas o teor de etanol foi testado na gama compreendida entre 0 a 100%, e seu impacto foi confirmado como significativo no rendimento de extração em antocianinas. A fim de manter a estabilidade das antocianinas, adicionou-se ácido cítrico ao solvente de extração, mantendo o pH num valor em torno de 3. Para o estudo da MSR, a variável *S/L* foi mantida constante (50 g/L).

4.1.2. Modelos matemáticos derivados da MSR para um DCCC com três variáveis e sua avaliação estatística

Os resultados obtidos pelo DCCC estatístico são mostrados na Tabela 5. Ao ajustar o modelo polinomial de segunda ordem descrito na Eq. (1) para as respostas obtidas experimentalmente (Tabela 5), utilizando estimativas não-lineares de mínimos quadrados, os valores paramétricos são obtidos e apresentados na Tabela 6.

Os coeficientes da Tabela 6 que apresentaram valores de intervalo de confiança ($\alpha=0,05$) maiores do que o valor do parâmetro, foram considerados como não-significantes (*ns*), e não foram utilizados para o desenvolvimento do modelo. Em termos estatísticos, os parâmetros *ns* das abordagens da MSR não melhoram as soluções alcançadas nos modelos, mas aumentam as incertezas de todos os parâmetros significativos e, além disso, resultam na distorção das soluções previstas para as condições não testadas. Este fato já foi descrito por outros autores (Ranic et al., 2014), e tem sido sugerido como um passo obrigatório para evitar irregularidades na análise matemática, e previsões imprecisas dos resultados de condições de operação não testadas.

Portanto, com base nos resultados apresentados na Tabela 6 - parte A, os modelos finais resultantes para cada técnica de extração avaliada foram os seguintes:

Para o formato de resposta Y_1 (mg C/g R):

$$\text{para HAE: } Y_{\text{HAE}}^{Y_1} = 3,71 - 0,22t + 0,22T + 1,3S - 0,17t^2 - 0,06T^2 + 0,17tT - 0,08TS \quad (8)$$

$$\text{para UAE: } Y_{\text{UAE}}^{Y_1} = 5,51 + 0,21t + 0,61P + 2,05S - 0,63P^2 + 0,27S^2 + 0,19tS \quad (9)$$

$$\text{para MAE: } Y_{\text{MAE}}^{Y_1} = 6,17 - 0,36t - 0,52T + 1,58S - 0,49T^2 - 0,35S^2 - 0,31tT - 0,36TS \quad (10)$$

Para o formato e resposta Y_2 (mg C/g P dw):

$$\text{para HAE: } Y_{\text{HAE}}^{Y_2} = 14,74 - 0,86t - 1,36T + 3,89S - 0,98T^2 - 0,91S^2 - 0,74tT - 0,9TS \quad (11)$$

$$\text{para UAE: } Y_{\text{UAE}}^2 = 4,24 + 0,11t + 0,42P + 0,88S - 0,07t^2 - 0,39P^2 - 0,26S^2 + 0,09tS - 0,07PS \quad (12)$$

$$\text{para MAE: } Y_{\text{MAE}}^2 = 4,46 - 0,28t - 0,36T + 1,09S - 0,39T^2 - 0,23S^2 - 0,24tT - 0,24TS \quad (13)$$

Para o formato de resposta Y_2/Y_1 (g R/g P dw):

$$\text{para HAE: } Y_{\text{HAE}}^{Y_2/Y_1} = 0,69 + 0,02t + 0,02T - 0,01tT + 0,01tS + 0,01TS \quad (14)$$

$$\text{para UAE: } Y_{\text{UAE}}^{Y_2/Y_1} = 0,78 + 0,01t + 0,01P - 0,09S - 0,01t^2 - 0,05S^2 \quad (15)$$

$$\text{para MAE: } Y_{\text{MAE}}^{Y_2/Y_1} = 0,72 - 0,01S - 0,01T^2 + 0,01S^2 - 0,01tS \quad (16)$$

As variáveis independentes das Eqs. (8) a (16) são derivadas da Eq. (1) onde X_1 (t , min), X_2 (T , °C ou P , W) e X_3 (S , %), enquanto a variável dependente Y é a própria resposta, no qual seu sub-índice indica a técnica aplicada e o super-índice o critério de resposta utilizado (Y_1 , Y_2 ou Y_2/Y_1). Portanto, as Eqs. (8) a (16) traduzem os padrões de resposta, mostrando uma complexidade relativamente alta (superior a 6 parâmetros) dos cenários possíveis para os formatos de valor Y_1 e Y_2 e soluções relativamente simples para o formato do valor de resposta Y_2/Y_1 (inferior a 6 parâmetros).

Como o plano experimental é baseado em valores codificados das variáveis, os coeficientes do modelo obtidos são empíricos e não podem ser associados à significância física ou química. No entanto, seus valores numéricos podem ser usados para comparações diretas. De facto, quanto maior o valor absoluto do coeficiente, mais importante será o peso da variável correspondente.

A informação paramétrica apresentada na Tabela 6A fornece um resumo completo dos efeitos que cada uma das variáveis definidas para o estudo causa nas formas de resposta para cada técnica de extração. Para avaliar a proficiência dos modelos obtidos nas Eqs. (8) a (16), vários testes estatísticos foram utilizados e os resultados são apresentados na Tabela 6 - parte B. Em geral, para todos os modelos desenvolvidos, os testes estatísticos convergem para a mesma conclusão: podem ser aplicados de forma eficaz em etapas subsequentes de previsão. De facto, e comparativamente aos critérios estatísticos mais comuns apresentados na Tabela 6B, os coeficientes R^2 e R^2_{adj} , em todos os casos, e para todos os formatos de resposta, apresentaram resultados superiores a 0,8, o que indica uma boa concordância entre os valores experimentais e os previstos. Isto sugere que a variação dos resultados experimentais pode ser explicada pelas variáveis independentes do processo, utilizando os valores paramétricos específicos apresentados na Tabela 6A, que valida os modelos de Eqs. (8) a (16) e permite passar à interpretação

dos efeitos das variáveis independentes e à determinação das condições ótimas que maximizam as respostas.

Tabela 5: Resultados experimentais da MSR para o DCCC para a otimização das três principais variáveis envolvidas (X_1 , X_2 e X_3) na HAE, UAE e MAE para os três formatos de respostas avaliados (Y_1 , Y_2 e Y_2/Y_1). As variáveis, valores naturais e intervalos são apresentados na Tabela 4.

VARIÁVEIS CODIFICADAS			RESPOSTAS EXPERIMENTAIS								
X_1	X_2	X_3	HAE			UAE			MAE		
			Y_1	Y_2	Y_2/Y_1	Y_1	Y_2	Y_2/Y_1	Y_1	Y_2	Y_2/Y_1
-1	-1	-1	1,031	0,709	0,688	1,783	1,304	0,731	2,997	2,376	0,793
-1	-1	1	6,731	5,137	0,763	8,272	5,820	0,704	7,993	5,623	0,704
-1	1	-1	1,753	1,072	0,612	3,537	2,591	0,732	3,738	2,908	0,778
-1	1	1	5,944	4,660	0,784	6,932	5,002	0,722	7,602	5,413	0,712
1	-1	-1	1,016	0,682	0,671	2,265	1,635	0,722	3,213	2,384	0,742
1	-1	1	5,042	3,792	0,752	9,915	7,333	0,740	7,702	5,357	0,695
1	1	-1	2,622	1,869	0,713	2,091	1,606	0,768	3,159	2,477	0,784
1	1	1	6,163	4,738	0,769	8,585	6,112	0,712	6,267	4,393	0,701
-1,68	0	0	3,702	1,782	0,661	4,865	3,604	0,741	5,994	4,501	0,751
1,68	0	0	2,326	1,570	0,675	5,574	3,880	0,696	6,324	4,522	0,715
0	-1,68	0	3,489	2,325	0,666	2,647	1,885	0,712	6,351	4,576	0,720
0	1,68	0	3,206	2,133	0,665	5,096	3,767	0,739	2,498	1,706	0,683
0	0	-1,68	0,999	0,688	0,689	2,299	1,749	0,760	2,531	1,982	0,761
0	0	1,68	6,051	4,345	0,718	10,307	4,576	0,444	7,209	5,324	0,739
-1,68	-1,68	-1,68	1,098	0,765	0,696	0,576	0,406	0,705	1,449	0,948	0,655
-1,68	-1,68	1,68	6,777	2,405	0,355	4,875	1,936	0,397	7,834	5,546	0,708
-1,68	1,68	-1,68	2,665	1,864	0,699	3,140	2,417	0,770	2,775	1,930	0,696
-1,68	1,68	1,68	4,975	3,716	0,747	7,648	3,273	0,428	6,757	5,142	0,761
1,68	-1,68	-1,68	0,773	0,518	0,670	0,421	0,348	0,827	1,066	0,841	0,788
1,68	-1,68	1,68	3,553	2,636	0,742	6,213	2,443	0,393	8,641	5,958	0,689
1,68	1,68	-1,68	2,128	1,551	0,729	2,623	2,302	0,878	0,488	0,360	0,739
1,68	1,68	1,68	5,747	4,234	0,737	9,145	4,324	0,473	1,973	1,505	0,762
0	0	0	2,428	1,639	0,675	4,734	3,496	0,738	6,720	4,882	0,726
0	0	0	2,558	1,669	0,652	5,751	4,654	0,809	6,251	4,591	0,734
0	0	0	2,510	1,657	0,660	5,256	4,165	0,792	6,065	4,212	0,695
0	0	0	3,049	2,090	0,686	5,340	4,449	0,833	6,063	4,244	0,700
0	0	0	2,558	1,733	0,678	5,177	4,020	0,776	5,863	4,233	0,722
0	0	0	2,555	1,725	0,675	5,907	4,652	0,788	6,747	2,376	0,684

Tabela 6: Resultados paramétricos da equação polinomial de segunda ordem da Eq. (1) para as técnicas de extração HAE, UAE e MAE avaliadas e em termos do comportamento de extração dos três formatos de valores de resposta (Y_1 , Y_2 e Y_2/Y_1), de acordo com DCCC, com 5 níveis de alcance. O subscrito paramétrico 1, 2 e 3 representa as variáveis envolvidas t (X_1), T ou P (X_2) e S (X_3), respectivamente. Análises de significância dos parâmetros ($\alpha=0,05$) são apresentadas em valores codificados. Além disso, a informação estatística do procedimento de adaptação ao modelo é apresentada.

RESPOSTAS PARAMÉTRICAS PARA O DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA CADA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO										
COEFICIENTES		HAE			UAE			MAE		
		Y_1	Y_2	Y_2/Y_1	Y_1	Y_2	Y_2/Y_1	Y_1	Y_2	Y_2/Y_1
A) Coeficientes de ajuste obtidos										
Ordenada na origem	b_0	3,706±0,333	14,744±0,837	0,687±0,009	5,509±0,442	4,244±0,478	0,775±0,029	6,173±0,322	4,461±0,222	0,724±0,005
Efeito linear	b_1	-0,224±0,188	-0,859±0,471	0,020±0,006	0,206±0,162	0,114±0,262	0,012±0,010	-0,355±0,181	-0,278±0,125	<i>ns</i>
	b_2	0,216±0,188	-1,361±0,471	0,021±0,006	0,613±0,162	0,421±0,262	0,013±0,010	-0,518±0,181	-0,361±0,125	<i>ns</i>
	b_3	1,297±0,187	3,894±0,470	<i>ns</i>	2,047±0,162	0,884±0,262	-0,086±0,010	1,580±0,181	1,094±0,125	-0,007±0,005
Efeito quadrático	b_{11}	-0,171±0,102	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-0,067±0,345	-0,009±0,007	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
	b_{22}	-0,057±0,030	-0,980±0,573	<i>ns</i>	-0,626±0,162	-0,393±0,345	<i>ns</i>	-0,485±0,220	-0,386±0,152	-0,008±0,005
	b_{33}	<i>ns</i>	-0,908±0,573	<i>ns</i>	0,274±0,162	-0,261±0,345	-0,050±0,010	-0,348±0,220	-0,226±0,152	0,010±0,005
Efeito interativo	b_{12}	0,171±0,135	-0,738±0,339	-0,012±0,002	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-0,310±0,130	-0,241±0,090	<i>ns</i>
	b_{13}	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,013±0,002	0,189±0,162	0,092±0,189	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-0,007±0,005
	b_{23}	-0,084±0,049	-0,904±0,338	0,014±0,001	<i>ns</i>	-0,066±0,188	<i>ns</i>	-0,360±0,130	-0,235±0,090	<i>ns</i>
B) Informações estatísticas da análise										
<i>Obs</i>		28	28	28	28	28	28	28	28	28
R^2		0,9478	0,9129	0,8155	0,9359	0,9206	0,9194	0,9263	0,9352	0,9135
R^2_{adj}		0,9056	0,8933	0,8022	0,9005	0,8954	0,8924	0,9016	0,8974	0,9036

ns: coeficiente não significativo; *Obs*: número de observações; R^2 : coeficiente de determinação; R^2_{adj} : coeficiente de determinação ajustado para o modelo.

4.1.3. Efeito das variáveis independentes nas respostas e condições ótimas de extração

O modelo polinomial de segunda ordem representado na Eq. (1), que provou sua adequação na secção anterior, descreve dois tipos de efeitos (lineares e não lineares) para cada variável e um efeito interativo entre dois pares de variáveis. Os padrões da extração podem ser explicados por meio dos valores paramétricos dos modelos polinomiais de segunda ordem mostrados na Tabela 6A ou Eqs. (8) a (16), como descrito acima, e podem ser ilustrados por representações gráficas. A este respeito, as Figuras 6, 7 e 8 mostram os resultados da extração para os três formatos de critérios de resposta para cada técnica avaliada, respectivamente. As figuras estão divididas em três colunas, cada uma mostrando os resultados da resposta (Y_1 , Y_2 e Y_2/Y_1) para cada uma das técnicas testadas. Adicionalmente, cada coluna está dividida em duas seções (A e B):

A secção A mostra os gráficos de superfície 3D para as três possíveis combinações de variáveis produzidas pelas Eqs. (8) a (16). Estes gráficos mostram uma forma alternativa de visualizar os efeitos das variáveis independentes nas respostas estudadas, desenhando as respostas geradas pelos modelos. Os gráficos foram construídos variando duas variáveis dentro da faixa experimental e mantendo a variável excluída constante no centro de seu domínio experimental (Tabela 4). Pode-se observar (de forma numérica na Tabela 6) que o efeito linear da variável S é o mais representativo dos efeitos analisados, o que significa que a pureza do extrato em C e o rendimento de extração (Y_1 e Y_2 , respectivamente) são altamente dependentes da variável S , para todos os métodos de extração testados. Para a técnica UAE, o efeito da variável P também é considerável, embora não tão significativo quanto o efeito de S . A análise dos gráficos 3D apresentados mostra ainda uma influência mais representativa da variável T nas respostas obtidas com os métodos HAE e MAE, comparativamente com a variável t . Os efeitos quadráticos e interativos das variáveis foram considerados importantes na HAE e MAE, enquanto o efeito quadrático apresentou-se mais importante do que o interativo na técnica UAE.

A secção B ilustra a capacidade do modelo em prever os resultados obtidos e a distribuição dos resíduos (diferença entre os valores previstos e observados) em função de cada uma das variáveis consideradas. A distribuição gráfica mostra os dados experimentais *versus* os previstos pelo modelo com arranjo linear, comprovando a consistência dos modelos MSR. A distribuição dos resíduos foi sempre aleatoriamente distribuída em torno de zero, e não se observaram dados agrupados e auto correlações.

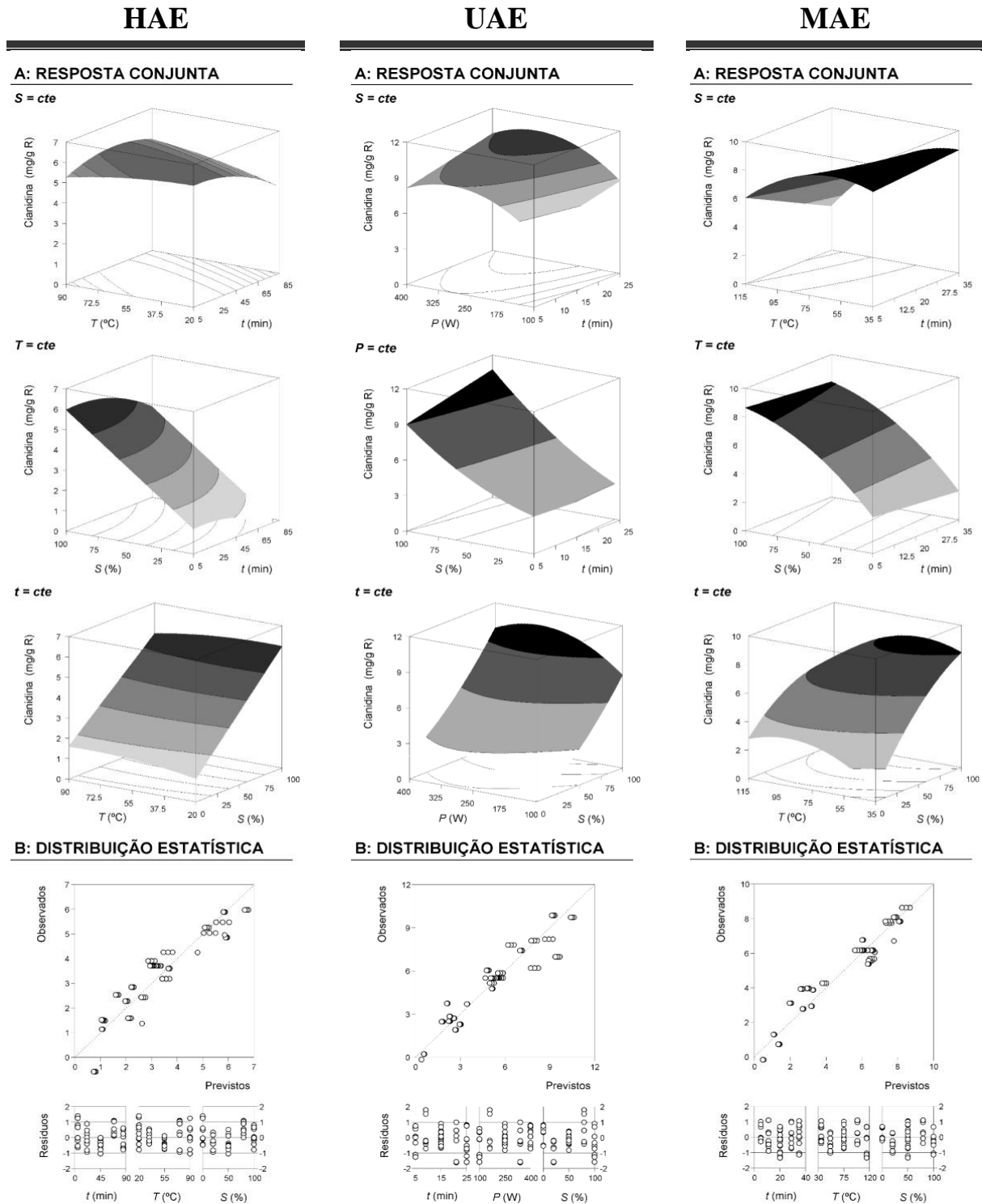


Figura 6: Parte A: Análise gráfica conjunta em 3D em termos do comportamento de extração para a resposta Y_1 para a otimização das três principais variáveis envolvidas (X_1 , X_2 e X_3) no HAE, UAE e MAE. Cada uma das superfícies da rede representa a superfície de resposta tridimensional teórica prevista com o polinômio de segunda ordem da Eq. (1). As ações binárias entre as variáveis são apresentadas quando a variável excluída é posicionada no centro do domínio experimental. Parte B: Adequação do ajuste segundo dois critérios gráficos básicos de estatística: a capacidade de simular as mudanças da resposta entre os dados previstos e observados; e a distribuição residual em função de cada uma das variáveis.

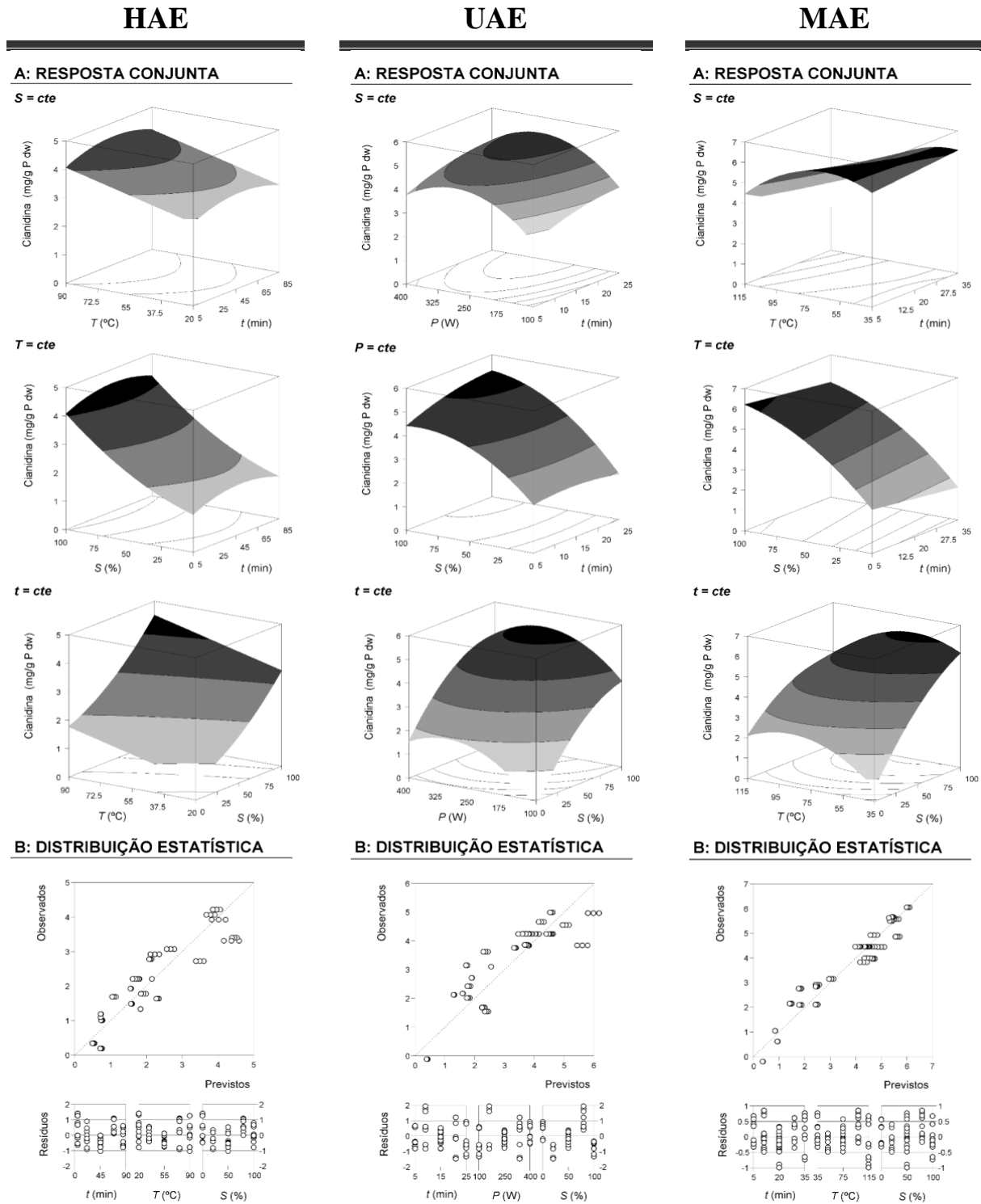


Figura 7: Parte A: Análise gráfica conjunta em 3D em termos do comportamento de extração para a resposta Y_2 para a otimização das três principais variáveis envolvidas (X_1 , X_2 e X_3) no HAE, UAE e MAE. Cada uma das superfícies da rede representa a superfície de resposta tridimensional teórica prevista com o polinômio de segunda ordem da Eq. (1). As ações binárias entre as variáveis são apresentadas quando a variável excluída é posicionada no centro do domínio experimental. Parte B: Adequação do ajuste segundo dois critérios gráficos básicos de estatística: a capacidade de simular as mudanças da resposta entre os dados previstos e observados; e a distribuição residual em função de cada uma das variáveis.

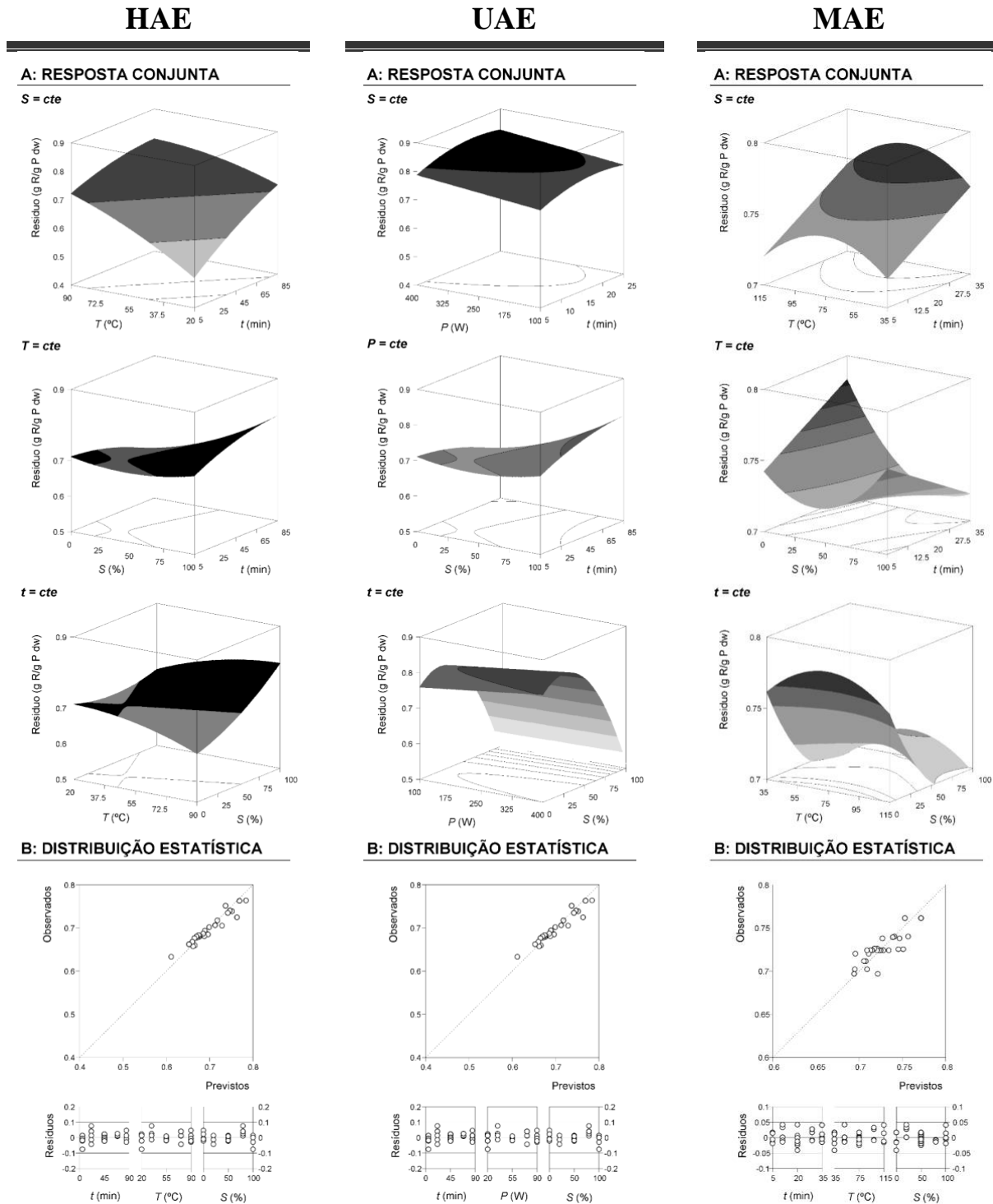


Figura 8: Parte A: Análise gráfica conjunta em 3D em termos do comportamento de extração para a resposta Y_2/Y_1 para a otimização das três principais variáveis envolvidas (X_1 , X_2 e X_3) no HAE, UAE e MAE. Cada uma das superfícies da rede representa a superfície de resposta tridimensional teórica prevista com o polinômio de segunda ordem da Eq. (1). As ações binárias entre as variáveis são apresentadas quando a variável excluída é posicionada no centro do domínio experimental. Parte B: Adequação do ajuste segundo dois critérios gráficos básicos de estatística: a capacidade de simular as mudanças da resposta entre os dados previstos e observados; e a distribuição residual em função de cada uma das variáveis.

4.1.4. Condições ótimas numéricas que maximizam a extração de antocianinas e verificação dos modelos preditivos

Uma vez tendo os modelos estatisticamente e graficamente validados, a otimização das variáveis para maximizar os valores de resposta (ou minimizar, dependendo dos requisitos) foi realizada por análise numérica usando o procedimento *simplex*. As restrições aos intervalos das variáveis experimentais foram aplicadas e as condições ótimas que maximizam os critérios das respostas foram determinadas para cada uma das técnicas utilizadas. A Tabela 7 - parte A mostra as condições das variáveis que otimizam as três formas de resposta (Y_1 , Y_2 e Y_2/Y_1) individualmente, enquanto a parte B apresenta os resultados da otimização de forma global dessas respostas.

Com os valores numéricos das condições ótimas e as respostas máximas alcançados, as tendências de cada resposta foram avaliadas e estão representadas na Figura 9. As ilustrações gráficas permitem a seleção visual das condições mais favoráveis, considerando simultaneamente todas as respostas quando a variável excluída é posicionada no seu valor ótimo individual (Tabela 7A). A Figura 9 apresenta as projeções de isolinhas para a combinação das três principais variáveis envolvidas (X_1 , X_2 e X_3) para as técnicas HAE, MAE e UAE, e considerando os três formatos de valores de resposta (Y_1 , Y_2 e Y_2/Y_1). As isolinhas apresentadas no plano XY são derivadas das respostas tridimensionais obtidas a partir da equação polinomial de segunda ordem representada nas Eqs. (8) a (16). A sua análise é importante para a tomada de decisão ao escolher as melhores condições para realizar a extração.

Por último, a Figura 10 - parte A mostra uma ilustração gráfica 2D para a análise simples das condições ótimas individuais das variáveis estudadas, para cada técnica de extração escolhida e para cada uma das formas de resposta avaliadas. As linhas indicadas no gráfico mostram a resposta prevista pelos modelos descritos nas Eqs. (8) a (16), quando as outras variáveis são fixadas nos seus valores ótimos. Os eixos de resposta (Y) foram mantidos na mesma escala para facilitar a comparação entre as técnicas de extração utilizadas. Os pontos (⊙) apresentados ao longo da linha destacam a localização do valor ótimo (Tabela 7A).

Para a resposta Y_1 , segundo o modelo, a técnica de UAE produz os melhores resultados, pois o aumento de t e S levou à obtenção de um resíduo com maior pureza em cianidina-3-rutinósido. Em relação à resposta Y_2 , a técnica de MAE origina os valores mais elevados; no entanto, o aumento do valor da variável T levou à degradação do

composto de antocianina. A técnica de UAE conduziu a valores inferiores de Y_2 , mas a extração seria favorecida no caso de se utilizar valores de t superiores com S mantido no seu valor máximo (100%). A técnica de HAE garantiu valores para o rendimento superiores para condições de S e T elevados, mas o aumento de T levou à diminuição da pureza em C no extrato. Para todos os casos, e considerando as condições ótimas globais, o valor da variável X_3 que otimiza a extração com cianidina-3-rutinósido foi de 100%.

Tabela 7: Condições das variáveis, em valores naturais, que levam a valores ótimos da resposta para MSR utilizando DCCC para cada uma das técnicas estudadas (HAE, UAE e MAE), para os três formatos de resposta individuais (Y_1 , Y_2 e Y_2/Y_1) e para condições ótimas globais.

CRITÉRIO	CONDIÇÕES ÓTIMAS DAS VARIÁVEIS			RESPOSTAS ÓTIMAS	
	X_1 : t (min)	X_2 : T (°C) ou P (W)	X_3 : S (%)		
A) Condições das variáveis para respostas ótimas individuais					
HAE	Y_1	14,24±0,16	28,26±2,83	100,00±2,12	5,99±0,60 mg C/g R
	Y_2	49,25±2,48	90,00±8,10	100,00±2,83	4,50±0,27 mg C/g P dw
	Y_2/Y_1	85,00±8,50	90,00±3,60	100,00±1,43	0,80±0,08 g R/g P dw
UAE	Y_1	21,00±1,89	309,53±3,10	100,00±10,00	9,56±0,48 mg C/g R
	Y_2	25,00±1,75	285,07±19,95	100,00±2,00	5,32±0,37 mg C/g P dw
	Y_2/Y_1	23,61±1,18	394,76±3,95	19,96±1,00	0,84±0,08 g R/g P dw
MAE	Y_1	5,00±0,10	60,27±4,22	100,00±5,00	8,63±0,69 mg C/g R
	Y_2	5,00±0,05	64,21±1,28	100,00±2,00	6,21±0,56 mg C/g P dw
	Y_2/Y_1	35,00±1,05	75,00±6,75	0,00±1,00	0,78±0,02 g R/g P dw
B) Condições das variáveis para respostas ótimas globais					
HAE	Y_1				5,78±0,12 mg C/g R
	Y_2	13,74±1,91	35,64±7,98	100,00±1,36	4,03±0,22 mg C/g P dw
	Y_2/Y_1				0,56±0,02 g R/g P dw
UAE	Y_1				9,01±0,76 mg C/g R
	Y_2	21,34±0,55	310,58±25,89	100,00±2,00	4,32±0,14 mg C/g P dw
	Y_2/Y_1				0,51±0,21 g R/g P dw
MAE	Y_1				7,43±0,78 mg C/g R
	Y_2	5,00±0,30	62,41±0,57	100,00±9,00	4,11±0,37 mg C/g P dw
	Y_2/Y_1				0,76±0,04 g R/g P dw

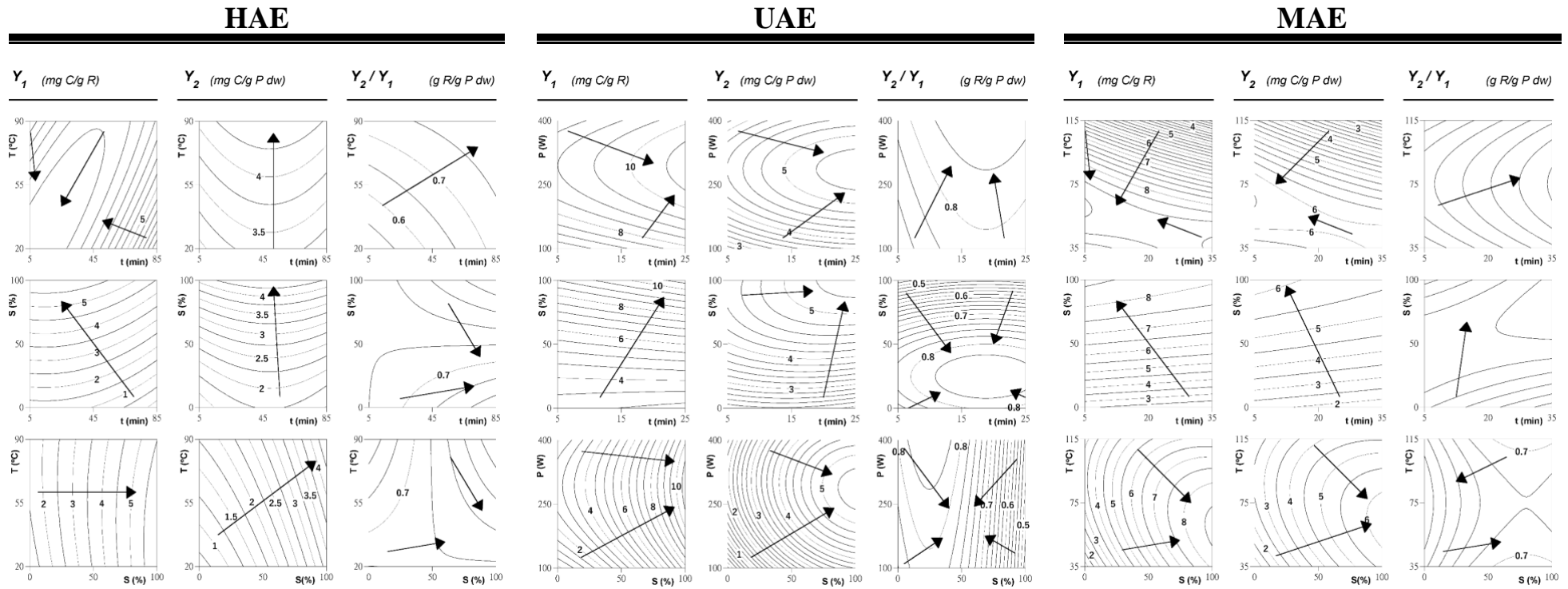
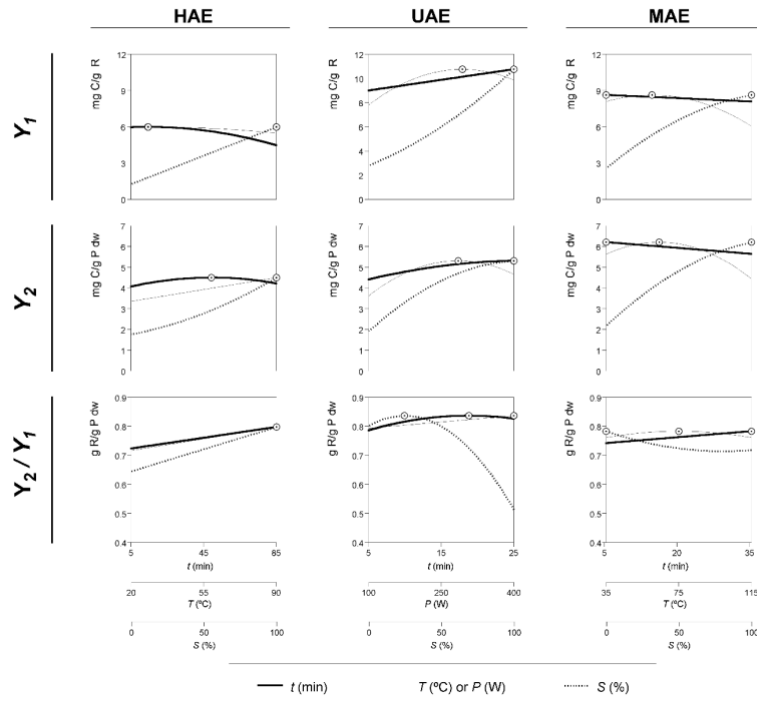


Figura 9: Projeção das isolinhas otimizadas para as três principais variáveis otimizadas (X_1 , X_2 e X_3) no HAE, UAE e MAE nos três formadores de valores de respostas (Y_1 , Y_2 e Y_2/Y_1) para descrever visualmente as tendências de cada resposta e guiar a seleção das condições mais favoráveis, levando em conta simultaneamente todas as respostas. Cada um dos gráficos de contorno representa a projeção no plano XY da superfície de resposta tridimensional teórica prevista pelo polinômio de segunda ordem da Eq. (1).

A: Ilustração da interação entre variáveis



B: Relação sólido-líquido

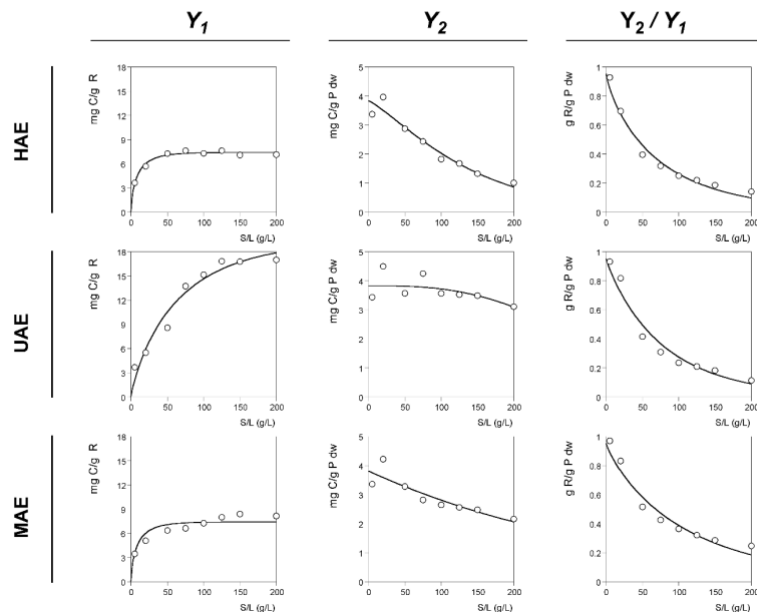


Figura 10: Resumo final dos efeitos de todas as variáveis avaliadas para sistemas HAE, UAE e MAE. Parte A: Mostra as respostas 2D individuais em todos os formatos de respostas estudados e em função de todas as variáveis avaliadas. As variáveis em cada um dos gráficos 2D foram posicionadas nos valores ótimos individuais das outras. Os pontos (\odot) apresentados ao longo de cada linha destacam a localização do valor ótimo. Linhas e pontos são gerados pelos modelos polinomiais teóricos de segunda ordem derivados da Eq. (1). Parte B: Mostra a resposta da dose de S/L aos valores ótimos globais das outras três variáveis (X_1 , X_2 e X_3). Resultados experimentais são representados por pontos (o), enquanto as linhas são o padrão previsto pela Eq. (2).

4.2. Análise dose-resposta do efeito da razão sólido/líquido nas condições ótimas

Como já descrito na bibliografia, a razão sólido/líquido ideal deve ser a que permita que o solvente penetre adequadamente na estrutura da matriz sólida (Pinela et al., 2017), mas também a que permita que o solvente dissolva os compostos alvo adequadamente (Albuquerque et al., 2017). Portanto, um estudo com o objetivo de avaliar o efeito da razão *S/L* foi realizado nas condições ótimas globais previstas pelos modelos polinomiais obtidos para as técnicas de HAE, UAE e MAE.

As experiências preliminares indicaram para limite máximo de *S/L* um valor próximo de 200 g/L. Portanto, o processo de análise dose-resposta foi projetado para analisar a razão *S/L* numa gama compreendida entre 5 a 200 g/L.

Os resultados da análise dose-resposta para o efeito da razão *S/L* para os três formatos de valores de resposta (Y_1 , Y_2 e Y_2/Y_1), e para as três técnicas de extração estudadas, foram avaliados de acordo com o modelo da Eq. (2), na sua forma crescente ou decrescente. Os valores paramétricos estimados (Tabela 8) foram produzidos através do ajuste às respostas utilizando o algoritmo de mínimos quadrados não lineares.

Tabela 8: Resultados paramétricos da equação polinomial de segunda ordem da Eq. (2) para as técnicas de extração HAE, UAE e MAE, avaliadas em termos da variação da relação *S/L*.

	VALORES PARAMÉTRICOS			ESTATÍSTICA
	<i>K</i>	$m_{50\%}$ ou $m_{99\%}$	<i>a</i>	R^2
<i>Y₁ (mg C/g R)</i>				
HAE	7,41±0,59	43,58±0,11	0,68±0,04	0,9623
UAE	19,40±0,77	302,48±3,48	0,85±0,02	0,9585
MAE	7,21±1,37	53,26±8,91	0,49±0,03	0,9814
<i>Y₂ (mg C/g P dw)</i>				
HAE	3,83±0,36	107,39±9,67	1,23±0,06	0,9432
UAE	3,83±0,07	302,46±27,22	2,85±0,08	0,8831
MAE	3,81±0,07	225,07±2,25	1,01±0,07	0,8851
<i>Y₂/Y₁ (g R/g P dw)</i>				
HAE	0,95±0,02	47,32±1,89	0,82±0,07	0,9764
UAE	0,95±0,08	53,32±0,53	0,92±0,07	0,9465
MAE	0,95±0,06	74,41±1,49	0,87±0,06	0,9596

A análise dos resultados pode ser interpretada por meio dos dois principais parâmetros *K* e m_n (a 50% ou 99% da resposta). O parâmetro *K* mostra o valor máximo

da resposta que pode ser obtido em função da resposta à razão S/L . Adicionalmente, quanto menores forem os valores de m_n , maiores são os níveis de extração alcançados em valores de dose-resposta decrescente, e quanto maiores os valores de m_n , maiores são os níveis de extração alcançados em valores de dose-resposta crescentes. Dadas essas considerações, ambos os valores são importantes para entender as tendências dose-resposta ao efeito da razão S/L .

Os efeitos causados pela razão S/L nos formatos de valores de resposta são mostrados graficamente na Figura 10 - parte B (secção 4.1.4.) para as três técnicas estudadas. A Figura 10B mostra os resultados experimentais (pontos) e respectivas previsões feitas pelo modelo matemático representado pela Eq. (2) (linhas). Em geral, um efeito não linear pode ser observado para todas as respostas à medida que a razão S/L aumenta, causando, na maioria dos casos, um efeito crescente de saturação (\uparrow) para o formato de resposta Y_1 (mg C/g) e um efeito decrescente de saturação (\downarrow) para formatos de resposta Y_2 (mg C/g P dw) e Y_2/Y_1 (g R/g P dw).

Ainda, a Figura 11 apresenta uma forma útil e simplificada para a tomada de decisão quanto ao melhor método de extração para cada formato de resposta em função da variação da razão S/L quando as demais variáveis (X_1 , X_2 e X_3) são posicionadas em condições ótimos globais. Com base na informação contida na figura, torna-se claro identificar que a UAE é a melhor técnica de extração para o caso em estudo, seguida de perto pela MAE, e a HAE, que se mostrou ser a solução menos eficaz. Estes resultados provam que a utilização de métodos alternativos de extração sólido-líquido (UAE e MAE) são adequados e conduzem a resultados superiores aos obtidos por técnicas convencionais como a HAE, para a extração de cianidina-3-rutinósido a partir da casca do figo. Portanto, o método *simplex* utilizado para maximizar todas as respostas previstas pelo modelo determinou um valor ótimo de S/L de $183,01 \pm 22,82$ g/L para a técnica UAE que, associado aos demais valores ótimos globais para a técnica, foi capaz de obter $17,0 \pm 0,2$ mg C/g R, $3,11 \pm 0,05$ mg C/g P dw e $0,19 \pm 0,001$ g R/g P dw.

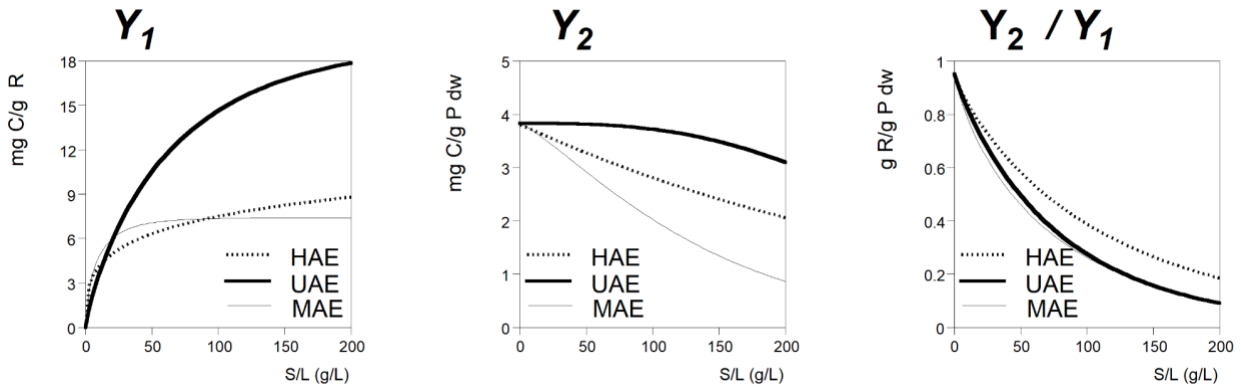


Figura 11: Resposta projetada pelo modelo MSR da relação da dose de S/L nos três formatos de respostas estudados (Y_1 , Y_2 e Y_3) quando as demais variáveis estudadas (X_1 , X_2 e X_3) são posicionadas em seus valores ótimos globais.

4.3. Comparação com outros estudos envolvendo extração de antocianinas

Para recuperar antocianinas da casca da infrutescência de *Ficus carica* L. com o objetivo de utilizá-las como corantes alimentares naturais, a otimização do processo de extração é uma das etapas cruciais para a sua implementação industrial. No entanto, além da escassez de estudos sobre a avaliação do conteúdo de antocianinas em *F. carica* (seja na infrutescência como um todo, ou na polpa ou casca), nenhum dos estudos existentes otimizou previamente a sua extração a partir dessas matrizes, dificultando a comparação de resultados para esta fonte particular. Assim, o teor total de antocianinas obtido da casca do figo no presente estudo será comparado com os valores relatados por outros autores envolvidos em trabalhos onde toda a infrutescência foi utilizada, bem como com demais matrizes reportadas como fontes naturais de antocianinas.

Estudos anteriores mostraram que os figos contêm níveis elevados de antocianinas comparativamente a outras fontes naturais como, por exemplo, mirtilos e amoras (Harzallah et al., 2016; Vallejo et al., 2012). Num estudo recente realizado por Wojdyło et al. (2016), onde foram investigadas diferentes variedades de figo, utilizando UAE com metanol como solvente, foi possível recuperar valores entre 0,01 a 1,2 mg de antocianinas por g de toda a infrutescência dw. Esses valores são inferiores comparativamente aos obtidos neste estudo onde se utilizou apenas para a casca do figo nas condições ótimas de extração estabelecidas (~3,1 mg/g P dw). Este resultado superior para a recuperação de antocianinas pode ser atribuído a distintos fatores, entre eles ao processo de otimização realizado neste estudo, que levou ao aumento da eficiência da extração e, conseqüentemente, do rendimento de antocianinas quando comparado com os resultados relatados onde se utiliza a infrutescência total (Wojdyło et al., 2016). As diferenças de

resultados obtidas nos estudos poderiam também ser explicadas pela utilização de diferentes solventes extratores (misturas etanol-água *versus* metanol). É reconhecido, de facto, que o metanol apresenta um elevado poder de extração, principalmente de moléculas polares, como são os compostos fenólicos. Entretanto, o seu uso para a extração de antocianinas é irrealista quando se visa uma aplicação alimentar, dado a sua toxicidade. Por outro lado, a mistura hidroalcoólica água-etanol pode ser considerada uma alternativa de bio-solvente para a indústria alimentar, quando devidamente removida no final do processo, levando a uma maior recuperação de antocianinas (Bosiljkov et al., 2017). A diferença dos teores de antocianinas contidos na infrutescência total, comparativamente aos teores determinados apenas para a casca, podem ser explicados pelo facto de que, dependendo da variedade, estes compostos tendem a acumular-se nas partes externas da infrutescência, como é o caso das cascas, nos estágios de maturação escolhidos para colheita. Este facto é bem conhecido e tem sido investigado para outras fontes de bio-resíduos, tais como a casca de manga e cana-de-açúcar que, quando investigados, apresentaram um teor de antocianinas de aproximadamente 0,1 mg/g P dw (Lopes et al., 2016; Zhao et al., 2018). Contudo, a concentração de antocianinas detectada nessas matrizes é muito inferior à encontrada nas cascas do figo avaliados no presente estudo. Dado o facto de que em quase todos os processos industriais que envolvem o processamento de figos estes são usados em estágios de maturação elevada, as partes descartadas, incluindo as cascas, podem se tornar subprodutos relevantes se recuperadas para a extração de antocianinas, compostos com propriedades naturais de coloração que poderiam ser aplicados como aditivos naturais.

Algumas das fontes ricas em antocianinas mais comuns são *Oryza sativa* L. (variedade Glutinosa), apresentando 42 mg/g dw (Chen et al., 2017), *Phaseolus vulgaris* L. (feijão comum), com 32 mg/g dw (Mojica et al., 2017) e *Rubus fruticosus* L. (amoras), com 17,10 mg/g dw (Elisia et al., 2006). Embora esses valores sejam consideravelmente superiores aos determinados na casca do figo, estas fontes têm um valor comercial já reconhecido para outros fins, o que não ocorre com a casca do figo. Considerando que outras matrizes como casca de berinjela (0,6 mg/g dw) (Todaro et al., 2009) ou a casca de uva (1 mg/g dw) (Chen et al., 2015), por exemplo, são atualmente utilizadas como fontes comuns de antocianinas, mesmo apresentando uma concentração menor do que a encontrada em cascas de figo, tal reforça o interesse desta matriz como um subproduto promissor a ser explorado para fins de aplicação industrial de corantes.

4.4. Poder corante do extrato rico em antocianinas obtido a partir da casca de figo

O extrato rico em antocianinas foi obtido através da técnica de UAE ($21,34 \pm 0,55$ min, $310,58 \pm 25,89$ W, etanol a 100% e $183,01 \pm 22,82$ g/L), sendo a cianidina-3-rutinósido o composto responsável pelo poder corante do extrato. Assim, obtiveram-se as seguintes respostas: $17,0 \pm 0,2$ mg C/g R, $3,11 \pm 0,05$ mg C/g P dw e $19,2 \pm 0,1\%$ de resíduo.

A Tabela 9 apresenta os valores de espaço de cor CIE L^* (luminosidade), a^* (verde/vermelho) e b^* (azul/amarelo), obtidos a partir da análise de um colorímetro do poder corante do extrato. Os valores CIE foram convertidos em valores RGB através de um programa (<http://www.easyrgb.com/en/convert.phpRGB>), tendo-se conseguido visualizar que o extrato apresentava uma cor equivalente à da berinjela.

Tabela 9: Parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) e quantidade de cianidina-3-rutinósido (mg/g R) do extrato otimizado de casca de figo.

L^*	a^*	b^*	COR DA CONVERSÃO EM VALORES RGB	QUANTIFICAÇÃO DE C (mg C/g R)
$25,5 \pm 0,9$	19 ± 2	$6,0 \pm 0,7$		$17,0 \pm 0,2$

4.5. Avaliação das propriedades bioativas do extrato da casca do figo

4.5.1. Avaliação da atividade antioxidante

O potencial antioxidante do extrato etanólico de casca de figo foi avaliado através de dois métodos distintos, cujos resultados se apresentam na Tabela 10. Mediu-se a capacidade de prevenir a peroxidação lipídica de uma emulsão preparada a partir de tecido cerebral de porco, onde o nível de peroxidação foi determinado pela reação entre o malondialdeído (MDA, produto da reação de oxidação) e o ácido tiobarbitúrico (TBA), da qual resultam compostos de coloração rosada, denominados espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Por sua vez, através do ensaio OxHLIA mediu-se a capacidade de inibição da hemólise oxidativa em eritrócitos de ovelha.

A concentração de extrato capaz de causar uma inibição de 50% da peroxidação lipídica no método TBARS (EC_{50}) é apresentada na Tabela 10. Entretanto, no método OxHLIA, os resultados obtidos não permitiram estabelecer valores de EC_{50} uma vez que as diferentes concentrações de extrato apresentaram comportamentos antioxidantes distintos. Estes efeitos encontram-se evidenciados na Figura 12, onde é possível observar a sobreposição e/ou cruzamento das linhas correspondentes aos diferentes tempos

hemolíticos (Ht) de cada uma das concentrações. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores, levando ao mesmo tipo de conclusões (Takebayashi et al., 2012). Determinou-se, assim, o valor de EC₈₀, correspondente à concentração capaz de retardar a hemólise, em 80%, em 60 min (EC₈₀ (60 min)) e em 120 min (EC₈₀ (120 min)), que são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Resultados da atividade antioxidante do extrato de casca de figo para os métodos OxHLIA e TBARS. Trolox foi utilizado como controlo positivo em ambos os casos.

	OxHLIA		TBARS
	EC ₈₀ (60 min)	EC ₈₀ (120 min)	EC ₅₀
Extrato	0,52 ± 0,03	1,62 ± 0,06	2,447 ± 0,002
Trolox	0,022 ± 0,007	0,0449 ± 0,0008	0,023 ± 0,001

Valores de EC₈₀ e EC₅₀ apresentados em mg/mL

O trolox foi utilizado como controlo positivo em ambos os métodos de análise da atividade antioxidante. Os valores superiores de EC₅₀ e EC₈₀ do extrato de casca de figo eram esperados, visto que o trolox é um dos antioxidante sintéticos mais poderosos. No entanto, deve ser realçado que o trolox é um composto antioxidante puro, ao contrário do extrato, que é uma mistura de vários compostos, nomeadamente pigmentos como antocianinas (cianidina-3-rutinósido) (assim, a concentração de cada um destes compostos no extrato é muito inferior às ECs obtidas).

Estes valores indicam que a casca de figo apresenta uma atividade antioxidante considerável, embora os resultados obtidos não possam ser diretamente comparados com os de outros autores, uma vez que os métodos de atividade antioxidante aplicados foram diferentes. Como exemplo, Harzallah et al. (2016) determinaram valores de EC₅₀ de 9,71 e 4,52 mg/mL para a casca de figo de variedade roxa e preta, respetivamente, através do método de avaliação da capacidade de captação de radicais livres DPPH. Estes valores são semelhantes aos obtidos no presente estudo uma vez que se trata da casca da infrutescência, e o facto de a variedade preta apresentar melhores resultados corrobora a atividade antioxidante das antocianinas presentes em maior concentração nesta variedade. Esta diferença de concentração de antocianinas, também observada em distintas partes da infrutescência, pode ter contribuído para o facto de as polpas destas variedades de figo, também estudadas pelos autores, terem revelado uma menor atividade antioxidante, com

valores de EC₅₀ de 12,99 e 15,45 mg/mL, respetivamente. Por sua vez, Oliveira et al. (2009) obtiveram valores de EC₂₅ de 2,95 mg/mL para a casca de figo da variedade “Pingo de Mel”, enquanto a polpa do mesmo não apresentou capacidade de captação de radicais DPPH numa concentração de 5,56 mg/mL. Solomon et al. (2006) avaliaram a atividade antioxidante de diferentes variedades de figo pelo método ABTS, apresentando resultados em equivalente de trolox (ET) por 100g de massa fresca. As variedades de coloração mais escura foram as que apresentaram melhores resultados, variando de 716 µmol/100 g a 25 µmol/100 g. Independentemente da variedade de figo ou do método de avaliação da atividade antioxidante, todos estes estudos apresentaram evidências de que a casca apresenta maior atividade que a polpa, o que valida o facto de no presente trabalho, esta ter sido a parte escolhida para recuperação de antocianinas.

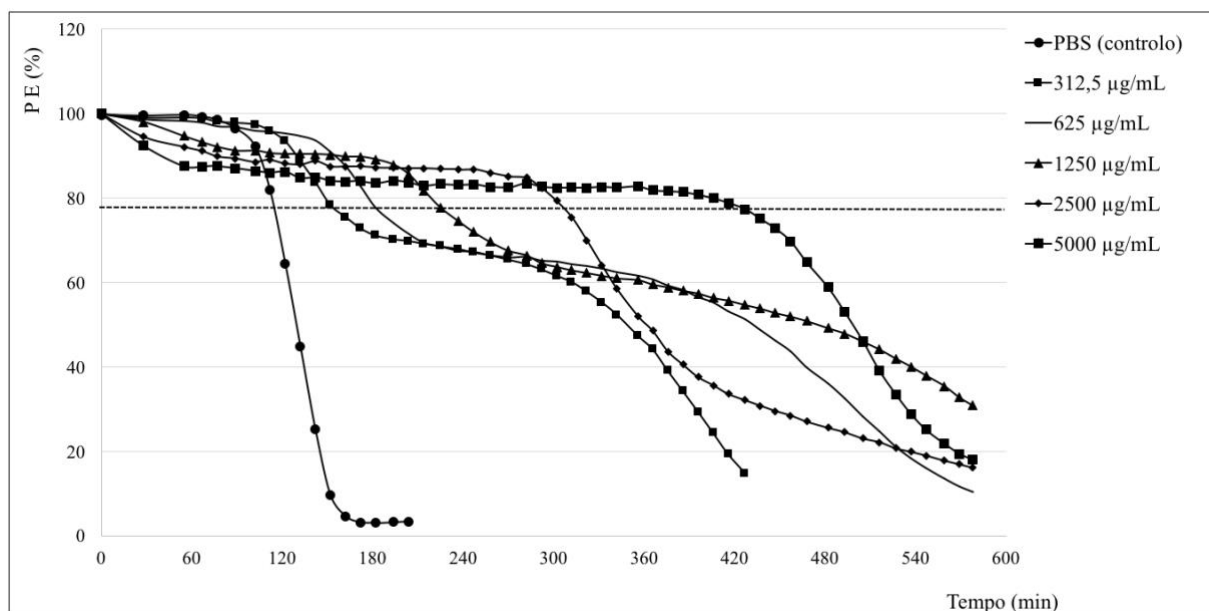


Figura 12: Comportamento da população de eritrócidos ao longo do tempo expostos a diferentes concentrações do extrato de casca de figo.

Como o extrato de casca de figo apresentou comportamento diferenciado (Figura 12) e não permitiu o cálculo do valor de EC₅₀ pelo método OxHLIA, estes dados não puderam ser utilizados para comparação direto com outros estudos, visto que a forma de apresentação da resposta (EC₈₀) foi distinta.

Comparativamente a outras matrizes naturais ricas em compostos fenólicos investigadas pelo método de TBARS, o valor de EC₅₀ obtido neste estudo para o extrato de casca de figo é superior ao reportado para a amora preta (*Aristotelia chilensis*; 0,024 mg/mL) (Céspedes et al., 2008) e para o azeite (*Olea europaea*; 44,71 µg/mL) (Khaliq et al., 2015), por exemplo. No entanto, apresentou uma atividade antioxidante

significativamente superior à de outras fontes alternativas de compostos fenólicos menos exploradas, nomeadamente as folhas de *Eucommia ulmoides* Oliv., uma erva cultivada na China (EC₅₀ de 16,74 mg/mL) (Luo et al., 2009) e o óleo essencial extraído de folhas de *Artemisia herba-alba* Asso, *Mentha pulegium* L. e *Origanum compactum* Benth (EC₅₀ de 985,94; 922,79 e 305,32 mg/mL, respetivamente) (Sbayou et al., 2016).

4.5.2. Citotoxicidade e atividade anti-inflamatória

A citotoxicidade foi avaliada como a capacidade do extrato inibir 50% do crescimento celular (GI₅₀). A partir dos ensaios realizados pode-se concluir que o extrato de casca do figo não apresentou atividade frente às células não tumorais, isto é, caracterizou-se como um extrato não tóxico às células hepáticas analisadas até à concentração máxima utilizada (400 µg/mL). Este resultado é importante para fazer uma primeira validação da utilização e incorporação deste extrato em matrizes alimentares sem que tal acarrete riscos para a saúde do consumidor. A mesma conclusão foi alcançada por Bakar et al. (2015), que descreveram o extrato de figo (infrutescência inteira) como uma matriz natural que não apresentou efeito citotóxico na linha celular normal investigada (célula epitelial de rato).

No que se refere à atividade do extrato frente às linhas celulares tumorais analisadas, este também não apresentou seletividade, de modo que não permitiu o cálculo dos valores de GI₅₀. O mesmo ocorreu com a atividade anti-inflamatória do extrato, sendo que este não foi capaz de inibir a formação de NO no processo de inflamação proporcionado pelo método usado, em nenhuma das concentrações utilizadas e, portanto, não revelou esta bioatividade.

4.5.3. Atividade antimicrobiana

Os resultados da atividade antimicrobiana do extrato de casca de figo encontram-se na Tabela 11. A amostra foi testada utilizando um conjunto de 9 estirpes de bactérias, Gram-positivo e Gram-negativo, com importância clínica.

Como se pode observar na Tabela 11, todas as bactérias foram de alguma forma inibidas, tornando possível obter os valores de concentração mínima inibitória (CMI). Nenhum grupo específico de bactérias apresentou maior sensibilidade ou resistência ao efeito antimicrobiano da amostra, visto que os resultados foram heterogêneos. Isto sugere que a amostra apresenta fitoquímicos com ampla atividade espectral, podendo atuar

contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo. Os melhores resultados de CMI, isto é, os menores valores de concentração necessários para inibir o crescimento dos microrganismos investigados, foram obtidos para uma bactéria Gram-negativo e duas bactérias Gram-positivo, nomeadamente *E. coli*, MRSA e MSSA, todas com CMI de 2,5 mg/mL. Este valor pode ser comparado com o obtido para outros resíduos frutícolas, nomeadamente a casca de toranja, analisada por Liu et al. (2017), que apresentou uma CMI de 4,5 mg/mL para a *E. coli* e a casca da maçã (variedade Fuji), estudada por Luo et al. (2016), que apresentou uma CMI de 5 mg/mL para *E. coli* e *L. monocythogenes*, por exemplo. Em ambos os casos o extrato de casca de figo apresentou atividade antimicrobiana superior à dos resíduos mencionados quando o microrganismo investigado foi *E. coli*, porém inferior para *L. monocythogenes*. A sua ação como um agente antimicrobiano ficou também comprovada pelos reduzidos valores de CMI em duas bactérias testadas, *Morganella morganii* e *Pseudomonas aeruginosa* (5 e 20 mg/mL, respectivamente), onde os resultados foram melhores que os obtidos com o antibiótico ampicilina (20 e >20 mg/mL, respetivamente).

Existem várias alternativas de matrizes naturais adequadas para a recuperação de compostos com atividade antimicrobiana, sendo algumas mais típicos do que outras. Os óleos essenciais, por exemplo, dependendo da fonte de proveniência, podem ser considerados matrizes de referência ricas em compostos antifúngicos e antimicrobianos. O estudo realizado por Diao et al. (2013) determinou uma CMI de 10 mg/mL para *E. coli* e 20 mg/mL para *P. aeruginosa*, utilizando o óleo essencial extraído de *Zanthoxylum schinifolium*, uma planta comestível comum da Ásia. Estes valores foram, respetivamente, inferiores e iguais aos determinados neste estudo para o extrato obtido a partir de casca de figo. Num outro estudo, Yao et al. (2011) verificaram que a Bayberry (*Myrica gale*), uma fruta muito consumida na China, apresentou CMI de 8,28 mg/mL para para a *E. coli*, valor este superior ao valor obtido para a casca do figo. Vieitez et al. (2018), que investigou extratos hidroetanólicos de cedro, revelaram uma CMI de 3,96 mg/mL em MSSA, o que se traduz numa atividade antimicrobiana inferior à verificada para os extratos avaliados no presente trabalho.

Para a gama de concentrações testadas, não foi verificada atividade bactericida do extrato para nenhuma das estirpes de bactérias estudadas, não sendo por isso possível obter valores de concentração mínima bactericida (CMB).

Tabela 11: Atividade antimicrobiana do extrato alcoólico de casca de *Ficus carica* L. e controlos positivos contra isolados hospitalares selecionados.

	CASCA DO FIGO		AMPICILINA		IMIPENEM		VANCOMICINA	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Bactérias Gram-negativo								
<i>Escherichia coli</i>	2,5	>20	<0,15	<0,15	<0,078	<0,078	nt	nt
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	>20	10	20	<0,078	<0,078	nt	nt
<i>Morganella morganii</i>	5	>20	20	>20	<0,078	<0,078	nt	nt
<i>Proteus Mirabilis</i>	10	>20	<0,15	<0,15	<0,078	<0,078	nt	nt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	>20	>20	>20	0,5	1	nt	nt
Bactérias Gram-positivo								
<i>Enterococcus faecalis</i>	20	>20	<0,15	<0,15	nt	nt	<0,078	<0,078
<i>Listeria monocytogenes</i>	20	>20	<0,15	<0,15	nt	nt	nt	nt
MRSA	2,5	>20	<0,15	<0,15	nt	nt	<0,078	<0,078
MSSA	2,5	>20	<0,15	<0,15	nt	nt	0,25	0,5

nt: não testado.

Valores de CMI e CMB são apresentados em mg/mL

4.6. Aplicação do extrato corante em um produto alimentar: Caracterização das diferentes formulações da cobertura para donuts (glacês)

Nesta etapa do trabalho foram preparadas duas formulações de glacê (Figura 13): a primeira foi elaborada segundo a receita tradicional e posteriormente avaliada no dia de preparação (GB0) e 1 dia após (GB1); a segunda formulação foi aditivada com extrato etanólico de figo (aproximadamente 0,7%) e avaliada também imediatamente após preparação (GF0) e decorridas 24h (GF1).

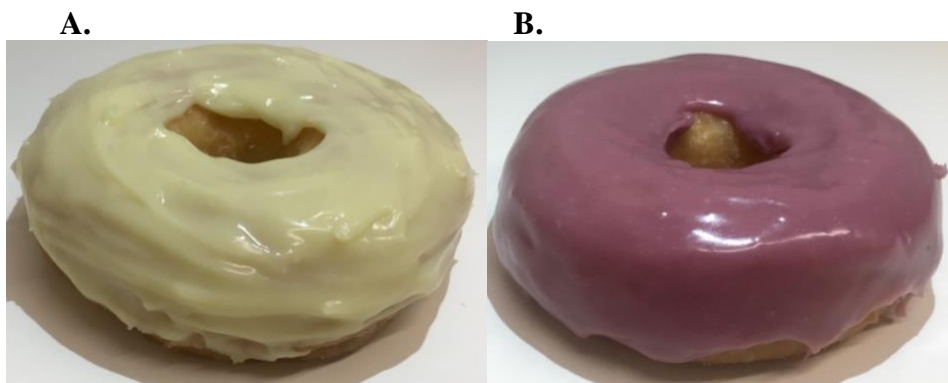


Figura 13: Diferentes formulações de cobertura. A. receita base (GB0), B. receita aditivada com extrato de figo (GF0), ambas referentes ao dia de preparação.

Com o objetivo de comparar as duas formulações de glacê, caracterizou-se a sua composição nutricional, perfil em açúcares livres e em ácidos gordos, os parâmetros de cor: L^* , a^* e b^* e também os parâmetros reológicos: firmeza, consistência, coesividade e viscosidade. Os resultados obtidos serão discutidos nas secções seguintes.

4.6.1. Composição nutricional

Na Tabela 12 são apresentados os valores médios, em g/100 g de produto fresco (pf), obtidos para a composição nutricional, açúcares livres e valor energético das formulações analisadas. Os hidratos de carbono foram o componente mais abundante (46,7 a 47,4 g/100 g pf), seguindo-se a gordura, presente em concentrações entre 32,7 a 32,9 g/100 g pf, o teor proteico (5,9 a 6,0 g/100 g pf) e a matéria mineral (1,15 a 1,17 g/100 g pf).

Entre os hidratos de carbono, os açúcares livres representaram uma importante percentagem, particularmente a sacarose e a lactose. Como é típico neste tipo de produtos, o valor energético é elevado (cerca de 507 kcal/100 g pf).

Em geral, os parâmetros analisados não demonstraram diferenças significativas, excetuando os casos da humidade e hidratos de carbono. Como poderia ser antecipado, a humidade foi quantificada em valores superiores nos casos de GB0 e GF0, revelando um ligeiro decréscimo após 24 horas (GB1 e GF1). Esta diferença acaba por explicar também a variação observada para os hidratos de carbono (relembrar que estes são calculadas como a diferença absoluta entre o somatório do conteúdo em proteínas, gordura, água e cinzas em 100 g de produto fresco), que tendencialmente registaram valores superiores em GB1 e GF1.

Em geral, pode afirmar-se que a incorporação do extrato de figo não causou alterações relevantes no perfil nutricional do glacê.

Tabela 12: Composição nutricional, açúcares livres (g/100 g pf) e valor energético (kcal/100 g pf) das diferentes formulações de glacê.

	Humidade	Gordura	Proteínas	Hidratos de carbono	Frutose	Glucose	Sacarose	Lactose	Açúcares totais	Cinzas	Energia
GB0	13,2±0,2 a	32,9±0,5	6,0±0,2	46,7±0,3 c	nd	nd	18,6±0,3 b	6,9±0,2 a	25,5±0,5 b	1,17±0,02	507±3
GB1	12,9±0,1 b	32,8±0,4	6,0±0,2	47,2±0,4 ab	nd	nd	18,6±0,3 b	7,0±0,3 a	25,6±0,5 b	1,17±0,05	508±2
GF0	13,1±0,1 a	32,8±0,5	6,0±0,2	46,9±0,5 bc	0,55±0,04	0,70±0,03	23,7±0,4 a	6,2±0,2 b	31,2±0,5 a	1,15±0,05	507±3
GF1	12,9±0,2 b	32,7±0,3	5,9±0,2	47,4±0,5 a	0,53±0,03	0,72±0,04	24,0±0,5 a	6,3±0,1 b	31,6±0,5 a	1,16±0,04	507±2
Homoscedasticidade ¹ (valor de <i>p</i>) (n=36)	0,438	0,315	0,407	0,225	<0,001	<0,001	0,095	0,194	0,851	0,003	0,073
ANOVA ² (valor de <i>p</i>) (n=36)	<0,001	0,08	0,057	<0,001	0,478	0,199	<0,001	<0,001	<0,001	0,906	0,371

¹Valores de *p* inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2; valores de *p* superiores a 0,05 indicam distribuições homoscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tukey HSD. ²Se o valor de *p* for inferior a 0,05, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas para pelo menos uma das formulações (identificadas com letras diferentes). Nos casos da frutose e glucose, a comparação foi feita através de um teste de *t* de student, dado que havia apenas dois grupos de valores.

4.6.2. Ácidos gordos

Os ácidos gordos presentes na amostra foram calculados como percentagem da massa de gordura total determinada pela extração por Soxhlet. Como primeira nota, refira-se que para além dos ácidos gordos listados na Tabela 12, foram ainda detetados C8:0, C11:0, C13:0, C14:1, C15:0, C15:1, C16:1, C17:0, C17:1, C18:2n6t, C18:3n6, C18:3n3, C20:0, C20:1, C20:3n6, C20:4n6, C20:3n3 e C22:0, porém em todos casos em percentagens inferiores a 1%. Em relação aos ácidos gordos tabelados, e apesar das diferenças significativas identificadas nos casos de C4:0, C6:0, C10:0 e C22:2, ambas as formulações preparadas apresentaram perfis similares. Este resultado era na verdade expectável considerando, por um lado, a percentagem, muito baixa, de extrato de figo adicionada na massa total preparada e por outro, o facto de os dois períodos avaliados terem apenas uma diferença de apenas 1 dia.

As duas formas mais abundantes foram o ácido palmítico (percentagem ligeiramente superior em GB0) e o ácido esteárico (sem diferenças entre as formulações testadas), com percentagens próximas dos 30%, sendo ainda de assinalar os valores obtidos para o ácido oleico, com percentagens próximas de 14% em todos os casos.

Em relação aos grupos de ácidos gordos, ácidos gordos saturados (AGS), ácidos gordos monoinsaturados (AGMI) e ácidos gordos polinsaturados (AGPI), a percentagem do primeiro grupo, também refletindo os valores de ácido palmítico e ácido esteárico, é obviamente superior (cerca de 75%, sem diferenças significativas entre as formulações testadas). Também as percentagens de AGMI ($\approx 16\%$) e AGPI ($\approx 8\%$) demonstraram grande similaridade entre todas as amostras avaliadas.

Tabela 13: Composição em ácidos gordos (%) das diferentes formulações de glacê (média±desvio-padrão).

	C4:0	C6:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C22:2	AGS	AGMI	AGPI
GB0	1,5±0,1 c	1,1±0,1 bc	1,5±0,1 b	2,5±0,2	5,9±0,3	34±1 a	27±1	14,1±0,1	5,3±0,1	1,9±0,1 a	76±1	16,3±0,1	18,1±0,1 ab
GB1	1,7±0,1 b	1,0±0,1 c	1,7±0,1 a	2,5±0,1	5,8±0,2	33±1 b	26±1	14,2±0,3	5,2±0,1	1,9±0,2 a	75±1	16,4±0,3	8,4±0,2 a
GF0	1,6±0,1 bc	1,1±0,1 b	1,6±0,1 a	2,5±0,2	6,0±0,2	33±1 b	27±1	14,3±0,2	5,2±0,1	1,6±0,1 c	76±1	16,4±0,2	7,9±0,3 b
GF1	1,9±0,1 a	1,3±0,1 a	1,6±0,1 a	2,6±0,2	6,0±0,3	33±1 b	26±1	14,2±0,4	5,3±0,2	1,7±0,1 b	75±1	16,4±0,3	8,2±0,3 a
Homoscedasticidade ¹ (valor de <i>p</i>) (n = 36)	0,380	0,141	0,990	0,130	0,560	0,057	0,005	0,007	0,018	<0,001	0,091	0,005	0,034
ANOVA ² (valor de <i>p</i>) (n = 36)	<0,001	<0,001	<0,001	0,963	0,233	0,035	0,139	0,736	0,422	<0,002	0,073	0,802	0,002

Ácido butírico (C4:0); Ácido capríco (C6:0); Ácido cáprico (C10:0); Ácido láurico (C12:0); Ácido mirístico (C14:0); Ácido palmítico (C16:0); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1n9c); Ácido linoleico (C18:2n6c); Ácido docosadienóico (C22:2).

¹Valores de *p* inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2; valores de *p* superiores a 0,05 indicam distribuições homoscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tukey HSD. ²Se o valor de *p* for inferior a 0,05, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas para pelo menos uma das formulações (identificadas com letras diferentes).

4.6.3. Parâmetros de cor

Para além dos aspetos nutricionais e dos componentes individuais discutidos nas secções anteriores, a análise dos parâmetros de cor (Tabela 14), nomeadamente, L^* , a^* e b^* , são de todo relevantes, dado que estão diretamente associados à potencial aceitação de novos produtos por parte dos consumidores.

Tabela 14: Parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) e pH nas diferentes formulações de glacê.

	L^*	a^*	b^*	pH
GB0	81±2 a	-4±1 c	30±2 a	5,0±0,1 ab
GB1	80±1 a	-4±1 c	28±1 a	5,1±0,1 a
GF0	64±1 b	15±1 b	13±1 b	4,9±0,1 b
GF1	55±1 c	20±1 a	5±1 c	4,7±0,2 c
Homoscedasticidade ¹ (valor de p) (n = 36)	0,047	0,016	0,001	<0,001
ANOVA ² (valor de p) (n = 36)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹Valores de p inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2; valores de p superiores a 0,05 indicam distribuições homoscedásticas, sendo as comparações múltiplas feitas pelo teste de Tukey HSD. ²Se o valor de p for inferior a 0,05, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas para pelo menos uma das formulações (identificadas com letras diferentes).

Quanto à luminosidade (L^*), verificou-se que as amostras controlo (GB0 e GB1) se apresentaram mais brilhantes, tendo ainda sido notória a manutenção integral dos seus valores ao longo das primeiras 24 horas, o que não se verificou no caso do glacê aditivado com extrato de figo. Por outro lado, a intensidade da tonalidade vermelha (a^*) foi superior entre estas mesmas formulações, que apresentaram valores significativamente superiores aos das amostras controlo. Quanto ao parâmetro b^* , as amostras aditivadas com extrato de figo mostraram, por outro lado, valores menores, o que corresponde de forma geral a dizer que as amostras controlo estavam mais próximas da tonalidade amarela.

De notar ainda que se registaram valores de pH ligeiramente mais ácidos no caso dos glacês preparados com extrato de figo.

4.6.4. Parâmetros reológicos

Atendendo à sua importância para a apreciação geral do produto, foram também avaliados parâmetros reológicos, nomeadamente firmeza, consistência, coesividade e viscosidade (Tabela 15).

No que diz respeito à firmeza e consistência, as formulações analisadas no dia de preparação apresentam valores relativamente similares. No entanto, um dia após a sua preparação, é notório o aumento de ambos os parâmetros, em especial nas formulações controlo. O menor endurecimento que foi verificado nas formulações de glacê que foram aditivadas com extrato de figo pode constituir uma vantagem adicional na utilização deste produto em aplicações alimentares.

Tabela 15: Parâmetros reológicos nas diferentes formulações de glacê.

	Firmeza	Consistência	Coesividade	Viscosidade
GB0	1237±108 c	8677±277 c	-795±14 b	-2127±75 a
GB1	3381±250 a	19132±617 a	-2161±45 d	-6721±209 d
GF0	1034±79 d	8042±242 d	-644±13 a	-5177±148 c
GF1	2104±106 b	10765±157 b	-1038±40 c	-3582±114 b
Homoscedasticidade ¹ (valor de <i>p</i>) (n = 36)	0,038	0,002	<0,001	0,101
ANOVA ² (valor de <i>p</i>) (n = 36)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Firmeza (g); Consistência (g.s); Coesividade (g); Viscosidade (g.s)

¹Valores de *p* inferiores a 0,05 indicam distribuições heteroscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tamhane's T2; valores de *p* superiores a 0,05 indicam distribuições homoscedásticas, tendo a comparação múltipla sido feita pelo teste de Tukey HSD. ²Se o valor de *p* for inferior a 0,05, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas para pelo menos um dos tipos de formulação (identificadas com letras diferentes).

O mesmo comportamento pode ser analisado quanto a coesividade, que aumentou após 24 horas de preparação, em especial no glacê controlo, indicando potencialmente maior aderência na boca, no momento do seu consumo. É também de realçar que a maior viscosidade de GF0 em relação a GB0, poderá facilitar aplicação do glacê, uma vez que se trata de um produto destinado à cobertura de alimentos.

5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Devido ao grande interesse pelo uso de pigmentos naturais na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética, no presente trabalho selecionou-se uma matriz natural, casca de figo, tendo-se estudado a otimização das condições de extração de antocianinas, componente responsável pela sua capacidade corante. Foram selecionadas diferentes técnicas de extração sólido-líquido (HAE, UAE e MAE) e a otimização do processo foi realizada por MSR utilizando três variáveis independentes (t , T e S para HAE e MAE, e t , P e S para UAE) para maximizar as seguintes respostas: mg C/g R (Y_1); mg C/g P dw (Y_2); e g R/g P dw (Y_2/Y_1). A UAE foi o método mais eficaz face aos objetivos do trabalho tendo resultado na extração de $17,0 \pm 0,2$ mg C/g R, $3,11 \pm 0,05$ mg C/g P dw e $0,19 \pm 0,001$ g R/g P dw. Estes valores foram obtidos nas condições ótimas de: $21,34 \pm 0,55$ min, $310,58 \pm 25,89$ W, etanol a 100% e $183,01 \pm 22,82$ g/L. As técnicas de HAE e MAE revelaram um desempenho inferior, originando concentrações de antocianinas e extrato ligeiramente inferiores às obtidas para UAE. Posteriormente, foi avaliada, separadamente, o efeito da razão S/L , tendo-se demonstrado a existência de um efeito significativo na UAE, resultando num extrato com maior pureza (maior teor de antocianinas) à medida que a razão S/L aumentava.

A estratégia seguida fornece dados importantes que permitem a comparação entre diferentes métodos de extração, em termos da sua eficiência e, conseqüente, ajudam na tomada de decisões, nomeadamente para a sua implementação a nível industrial. Desta forma é possível reduzir custos energéticos, consumo de solventes, investimento em equipamentos, permitindo alcançar as condições ideais e maximizar as respostas. Estes passos são muito importantes para orientar na escolha de um processo adequado e sustentável.

A utilização de antocianinas como corantes alimentares atende por completo à crescente demanda por produtos alimentares promotores de efeitos benéficos para a saúde, visto que estes compostos, além do poder corante, apresentam uma vasta gama de atividades biológicas. Para tal, o extrato de casca de figo obtido nas condições otimizadas foi avaliado quanto à sua atividade antioxidante, antimicrobiana, citotóxica e anti-inflamatória. Tal permitiu comprovar que os extratos possuem atividade antioxidante (TBARS e OxHLIA) e uma boa capacidade antimicrobiana, sem apresentar citotoxicidade. Tal permitiu validar o potencial deste extrato como um ingrediente natural com excelentes propriedades para utilização na indústria alimentar. Assim, o extrato otimizado foi incorporado numa cobertura para donuts revelando uma boa capacidade corante sem alterar as características nutricionais do produto alimentar.

De uma forma global, este estudo abre portas para investigações futuras mais amplas, tais como a exploração de novos métodos de extração como, por exemplo, métodos baseados em líquidos pressurizados e fluidos supercríticos, que poderiam ser estudados e comparados, com o objetivo de obter as melhores condições para maximizar a extração de antocianinas. Adicionalmente, o estudo da estabilidade do corante elaborado em diferentes condições de armazenamento, seria também um ponto com muito interesse para abordar em trabalhos futuros uma vez que estes compostos podem apresentar problemas de estabilidade face a vários fatores (tempo, temperatura, pH, entre outros). A sua aplicação em diferentes matrizes alimentares, nomeadamente em produtos com teor de lipídios inferior ao da cobertura para donuts, ampliaria a análise do espectro de aplicação do corante, valorizando ainda mais esta matriz (casca do figo) que tem sido pouco explorada na literatura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, R. M. V, Ferreira, I. C. F. R., Calhella, R. C., Lima, R. T., Vasconcelos, M. H., Adegá, F., ... Queiroz, M. J. R. P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(12), 5800–5806.
- Albuquerque, B. R., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Rodrigues, A., Curran, T. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo* L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. *Industrial Crops and Products*, 95, 404–415.
- Álvarez, A., Poejo, J., Matias, A. A., Duarte, C. M. M., Cocero, M. J., & Mato, R. B. (2017). Microwave pretreatment to improve extraction efficiency and polyphenol extract richness from grape pomace. Effect on antioxidant bioactivity. *Food and Bioproducts Processing*, 106(2015), 162–170.
- Amchova, P., Kotolova, H., & Ruda-Kucerova, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 914–922.
- AOAC. (2016). Official Methods of Analysis of AOAC International. In *AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International*. Arlington.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.
- Bakar, N. H. A., Swethadri, G. K., Baig, A., A, I. M., & U, M. I. (2015). Non-toxic antiproliferative effect of *Ficus carica* fruit extracts on estrogen receptor positive breast cancer cell (MCF-7). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(10), 815–821.
- Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120(1), 247–254.
- Barros, L., Pereira, E., Calhella, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5, 1732–1740.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry* (4th ed.). Berlin: Springer US.
- Benvidi, A., Abbasi, S., Gharaghani, S., Dehghan Tezerjani, M., & Masoum, S. (2017). Spectrophotometric determination of synthetic colorants using PSO–GA–ANN. *Food Chemistry*, 220, 377–384.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escalera, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977.
- Bonfigli, M., Godoy, E., Reinheimer, M. A., & Scenna, N. J. (2017). Comparison between conventional and ultrasound-assisted techniques for extraction of anthocyanins from grape pomace. Experimental results and mathematical modeling.

- Journal of Food Engineering*, 207, 56–72.
- Bosiljkov, T., Dujmić, F., Cvjetko Bubalo, M., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., ... Jokić, S. (2017). Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food and Bioprocess Technology*, 102, 195–203.
- Cai, Z., Qu, Z., Lan, Y., Zhao, S., Ma, X., Wan, Q., ... Li, P. (2016). Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes. *Food Chemistry*, 197, 266–272.
- Caleja, C., Barros, L., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Extraction of rosmarinic acid from *Melissa officinalis* L. by heat, microwave and ultrasound-assisted extraction techniques: A comparative study through response surface analysis. *Separation and Purification Technology*, 186, 297–308.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377–399.
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 45, 284–295.
- Celli, G. B., & Brooks, M. S. L. (2017). Impact of extraction and processing conditions on betalains and comparison of properties with anthocyanins — A current review. *Food Research International*, 100, 501–509.
- Celli, G. B., Ghanem, A., & Brooks, M. S. L. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from haskap berries (*Lonicera caerulea* L.) using Response Surface Methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 449–455.
- Cesa, S., Carradori, S., Bellagamba, G., Locatelli, M., Casadei, M. A., Masci, A., & Paolicelli, P. (2017). Evaluation of processing effects on anthocyanin content and colour modifications of blueberry (*Vaccinium spp.*) extracts: Comparison between HPLC-DAD and CIELAB analyses. *Food Chemistry*, 232, 114–123.
- Céspedes, C. L., El-Hafidi, M., Pavon, N., & Alarcon, J. (2008). Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Food Chemistry*, 107(2), 820–829.
- Chan, C. H., Yusoff, R., & Ngoh, G. C. (2013). Modeling and prediction of extraction profile for microwave-assisted extraction based on absorbed microwave energy. *Food Chemistry*, 140(1–2), 147–153.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560.
- Chen, M. H., McClung, A. M., & Bergman, C. J. (2017). Phenolic content, anthocyanins and antiradical capacity of diverse purple bran rice genotypes as compared to other bran colors. *Journal of Cereal Science*, 77, 110–119.
- Chen, S. Y., & Urban, P. L. (2015). On-line monitoring of Soxhlet extraction by chromatography and mass spectrometry to reveal temporal extract profiles. *Analytica Chimica Acta*, 881, 74–81.

- Chen, S., Zhang, F., Ning, J., Liu, X., Zhang, Z., & Yang, S. (2015). Predicting the anthocyanin content of wine grapes by NIR hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, *172*, 788–793.
- CLSI. (2008). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. In *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Wayne.
- Codex/Alimentarius. (1995). Codex Stan 192/1995 - General Standard for Food Additives, 271 pages.
- Corrêa, R. C. G., de Souza, A. H. P., Calhêla, R. C., Barros, L., Glamoclija, J., Sokovic, M., ... Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactive formulations prepared from fruiting bodies and submerged culture mycelia of the Brazilian edible mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. *Food Function*, *6*(7), 2155–2164.
- Coulter, T. P. (1998). *Manual de química y bioquímica de los alimentos* (2nd ed.). Madrid: Acribia.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, *15*(10), 7313–7352.
- DeMan, J. M. (1999). *Principles of Food Chemistry* (3rd ed.). New York: Springer US.
- Diao, W. R., Hu, Q. P., Feng, S. S., Li, W. Q., & Xu, J. G. (2013). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from green huajiao (*Zanthoxylum schinifolium*) against selected foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(25), 6044–6049.
- Díaz-García, M. C., Castellar, M. R., Obón, J. M., Obón, C., Alcaraz, F., & Rivera, D. (2015). Production of an anthocyanin-rich food colourant from *Thymus moroderi* and its application in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(6), 1283–1293.
- Eliasson, L., Labrosse, L., & Ahrné, L. (2017). Effect of drying technique and particle size of bilberry press cake on the extraction efficiency of anthocyanins by pressurized carbon dioxide extraction. *LWT - Food Science and Technology*, *85*, 510–516.
- Elisia, I., Hu, C., Popovich, D. G., & Kitts, D. D. (2006). Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. *Food Chemistry*, *101*, 1052–1058.
- Estupiñán, D. C., Schwartz, S. J., & Garzón, G. A. (2011). Antioxidant Activity, Total Phenolics Content, Anthocyanin, and Color Stability of Isotonic Model Beverages Colored with Andes Berry (*Rubus glaucus* Benth) Anthocyanin Powder. *Journal of Food Science*, *76*(1), 26–34.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST); European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). (2013). Stockholm, Sweden.
- Evans, B. C., Nelson, C. E., Yu, S. S., Beavers, K. R., Kim, A. J., Li, H., ... Duvall, C. L. (2013). Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *Journal of Visualized Experiments*, (73), e50166.
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., ... dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the

- optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179–186.
- García-Mendoza, M. del P., Espinosa-Pardo, F. A., Baseggio, A. M., Barbero, G. F., Maróstica Junior, M. R., Rostagno, M. A., & Martínez, J. (2017). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. *Journal of Supercritical Fluids*, 119, 9–16.
- Garibay, G., Ramírez, Q., & Munguía, L. (2000). *Biotecnología Alimentaria*. México: Limusa.
- Ge, J., Yue, P., Chi, J., Liang, J., & Gao, X. (2018). Formation and stability of anthocyanins-loaded nanocomplexes prepared with chitosan hydrochloride and carboxymethyl chitosan. *Food Hydrocolloids*, 74, 23–31.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E., Karimi, E., & Rahmat, A. (2014). Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoid compounds and their pharmaceutical activity from curry leaf (*Murraya koenigii* L.) using response surface methodology. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 1–10.
- Harzallah, A., Bhourri, A. M., Amri, Z., Soltana, H., & Hammami, M. (2016). Phytochemical content and antioxidant activity of different fruit parts juices of three figs (*Ficus carica* L.) varieties grown in Tunisia. *Industrial Crops and Products*, 83, 255–267.
- He, J., & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 163–187.
- He, Q., Zhang, Z., & Zhang, L. (2016). Anthocyanin Accumulation, Antioxidant Ability and Stability, and a Transcriptional Analysis of Anthocyanin Biosynthesis in Purple Heading Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(1), 132–145.
- Heleno, S. A., Prieto, M. A., Barros, L., Rodrigues, A. A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of ergosterol from *Agaricus bisporus* L. by-products using response surface methodology. *Food and Bioprocess Processing*, 100, 25–35.
- Houghton, J. D., & Hendry, G. A. F. (1996). *Natural Food Colorants* (2nd ed.). Dordrecht: Springer US.
- Iora, S. R. F., Maciel, G. M., Zielinski, A. a. F., da Silva, M. V., Pontes, P. V. D. a., Haminiuk, C. W. I., & Granato, D. (2014). Evaluation of the bioactive compounds and the antioxidant capacity of grape pomace. *International Journal of Food Science & Technology*, 50, 62–69.
- Ivanovic, J., Tadic, V., Dimitrijevic, S., Stamenic, M., Petrovic, S., & Zizovic, I. (2014). Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar “Čačanska Bestrna.” *Industrial Crops and Products*, 53, 274–281.
- Kalil, S. J., Maugeri, F., & Rodrigues, M. I. (2000). Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Process Biochemistry*, 35, 539–550.
- Kamiloglu, S., & Capanoglu, E. (2015). Polyphenol content in figs (*Ficus carica* L.): Effect of sun-drying. *International Journal of Food Properties*, 18(3), 521–535.

- Kerbstadt, S., Eliasson, L., Mustafa, A., & Ahrné, L. (2015). Effect of novel drying techniques on the extraction of anthocyanins from bilberry press cake using supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 29, 209–214.
- Khaliq, A., Ahmad, S. D., Sabir, S. M., & Khan, A. (2015). Antioxidant activity and inhibitory effect of cultivars of Olive (*Olea europaea*) against lipid peroxidation in mice liver. *Turkish Journal of Biochemistry*, 40(2), 188–196.
- Kowalska, H., Czajkowska, K., Cichowska, J., & Lenart, A. (2017). What's new in biopotential of fruit and vegetable by-products applied in the food processing industry. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 150–159.
- Kuete, V., Ango, P. Y., Fotso, G. W., Kapche, G. D. W. F., Dzoyem, J. P., Wouking, A. G., ... Abegaz, B. M. (2011). Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds from *Artocarpus communis* (Moraceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 25, 11–42.
- Li, D., Zhang, Y., Liu, Y., Sun, R., & Xia, M. (2015). Purified Anthocyanin Supplementation Reduces Dyslipidemia, Enhances Antioxidant Capacity, and Prevents Insulin Resistance in Diabetic Patients. *Journal of Nutrition*, 145(4), 742–748.
- Liu, Z., Pan, Y., Li, X., Jie, J., & Zeng, M. (2017). Chemical composition, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of pummelo peel flavonoid extract. *Industrial Crops and Products*, 109, 862–868.
- Lopes, M. M. A., Silva, E. O., Canuto, K. M., Silva, L. M. A., Gallão, M. I., Urban, L., ... Miranda, M. R. A. (2016). Low fluence pulsed light enhanced phytochemical content and antioxidant potential of “Tommy Atkins” mango peel and pulp. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, 216–224.
- Luo, J., Tian, C., Xu, J., & Sun, Y. (2009). Studies on the antioxidant activity and phenolic compounds of enzyme-assisted water extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) leaves. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(6), 1280–1287.
- Luo, J., Zhang, P., Li, S., & Shah, N. P. (2016). Antioxidant, Antibacterial, and Antiproliferative Activities of Free and Bound Phenolics from Peel and Flesh of Fuji Apple. *Journal of Food Science*, 81(7), M1735–M1742.
- Machado, A. P. D. F., Pereira, A. L. D., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2017). Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination. *Food Chemistry*, 231, 1–10.
- Março, P. H., Poppi, R. J., & Scarminio, I. S. (2008). Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. *Química Nova*, 31(5), 1218–1223.
- Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science and Technology*, 52, 1–15.
- Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Coloring

- attributes of betalains: a key emphasis on stability and future applications. *Food Function*, 8(4), 1357–1372.
- Mateos-Aparicio, I. (2017). *Aditivos Alimentarios*. Madrid: Dextra.
- McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., ... Stevenson, J. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*, 370(9598), 1560–1567.
- Mojica, L., Berhow, M., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Black bean anthocyanin-rich extracts as food colorants: Physicochemical stability and antidiabetes potential. *Food Chemistry*, 229, 628–639.
- Murado, M. A., & Prieto, M. A. (2013). Dose-Response Analysis in the Joint Action of Two Effectors. A New Approach to Simulation, Identification and Modelling of Some Basic Interactions. *PLoS ONE*, 8(4), e61391.
- Oliveira, A. P., Valentão, P., Pereira, J. A., Silva, B. M., Tavares, F., & Andrade, P. B. (2009). *Ficus carica* L.: Metabolic and biological screening. *Food and Chemical Toxicology*, 47(11), 2841–2846.
- Ongkowijoyo, P., Luna-Vital, D. A., & Gonzalez de Mejia, E. (2018). Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update. *Food Chemistry*, 250, 113–126.
- Palassarou, M., Melliou, E., Liouni, M., Michaelakis, A., Balayiannis, G., & Magiatis, P. (2017). Volatile profile of Greek dried white figs (*Ficus carica* L.) and investigation of the role of β -damascenone in aroma formation in fig liquors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(15), 5254–5270.
- Parlamento Europeu. (2008). Regulamento (CE) n° 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho. In *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Parlamento Europeu. (2011). Regulamento (UE) n° 1129/2011 da Comissão Europeia. In *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Pinela, J., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Carvalho, A. M., Oliveira, M. B. P. P., Curran, T. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Valorisation of tomato wastes for development of nutrient-rich antioxidant ingredients: A sustainable approach towards the needs of the today's society. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 41, 160–171.
- Pojer, E., Mattivi, F., Johnson, D., & Stockley, C. S. (2013). The case for anthocyanin consumption to promote human health: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(5), 483–508.
- Presidência da República. (1965). Decreto n° 55871 de 26 de Março de 1965. In *Diário Oficial da União - DOU*.
- Prieto, M. A., Curran, T. P., Gowen, A., & Vázquez, J. A. A. (2015). An efficient methodology for quantification of synergy and antagonism in single electron transfer antioxidant assays. *Food Research International*, 67, 284–298.
- Prieto, M. A., & Vázquez, J. A. (2014). In vitro determination of the lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of unroasted coffee bean extracts and their synergistic and antagonistic effects. *Food Research International*, 62(10), 1183–1196.

- Qiu, G., Wang, D., Song, X., Deng, Y., & Zhao, Y. (2018). Degradation kinetics and antioxidant capacity of anthocyanins in air-impingement jet dried purple potato slices. *Food Research International*, 105(October 2017), 121–128.
- Ranic, M., Nikolic, M., Pavlovic, M., Buntic, A., Siler-Marinkovic, S., & Dimitrijevic-Brankovic, S. (2014). Optimization of microwave-assisted extraction of natural antioxidants from spent espresso coffee grounds by response surface methodology. *Journal of Cleaner Production*, 80, 69–79.
- Recharla, N., Riaz, M., Ko, S., & Park, S. (2017). Novel technologies to enhance solubility of food-derived bioactive compounds: A review. *Journal of Functional Foods*, 39, 63–73.
- Ring, J., Brockow, K., & Behrendt, H. (2001). Adverse Reactions To Foods. *SciencesNew York*, 756(10), 3–10.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2016). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20–26.
- Rustioni, L., Di Meo, F., Guillaume, M., Failla, O., & Trouillas, P. (2013). Tuning color variation in grape anthocyanins at the molecular scale. *Food Chemistry*, 141(4), 4349–4357.
- Salem, N., Msaada, K., Elkahoui, S., Mangano, G., Azaeiz, S., Ben Slimen, I., ... Marzouk, B. (2014). Evaluation of antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of safflower natural dyes during flowering. *BioMed Research International*, 2014(2014), 1–10.
- Sang, J., Sang, J., Ma, Q., Hou, X. fang, & Li, C. qin. (2017). Extraction optimization and identification of anthocyanins from *Nitraria tangutorun* Bobr. seed meal and establishment of a green analytical method of anthocyanins. *Food Chemistry*, 218, 386–395.
- Sbayou, H., Boumaza, A., Hilali, A., & Amghar, S. (2016). Antioxidant properties of *Artemisia herba-alba* Asso., *Mentha pulegium* L. and *Origanum compactum* Benth. essential oils. *Journal of Materials and Environmental Science*, 7(8), 2908–2912.
- Solomon, A., Golubowicz, S., Yablowicz, Z., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H. E., ... Flaishman, M. A. (2006). Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7717–7723.
- Takebayashi, J., Iwahashi, N., Ishimi, Y., & Tai, A. (2012). Development of a simple 96-well plate method for evaluation of antioxidant activity based on the oxidative haemolysis inhibition assay (OxHLIA). *Food Chemistry*, 134, 606–610.
- Todaro, A., Cimino, F., Rapisarda, P., Catalano, A. E., Barbagallo, R. N., & Spagna, G. (2009). Recovery of anthocyanins from eggplant peel. *Food Chemistry*, 114(2), 434–439.
- Tsatsop, R. K. T., Djiobie, G. T., Kenmogne, B. S., Regonne, K. R., & Ngassoum, M. B. (2016). Optimization Of Microwave-Assisted Extraction Of Bioactive Compounds From *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. Stem Bark Using Response Surface Methodology, 5(5), 103–112.
- Vallejo, F., Marín, J. G., & Tomás-Barberán, F. A. (2012). Phenolic compound content of fresh and dried figs (*Ficus carica* L.). *Food Chemistry*, 130(3), 485–492.

- Vieira, V., Prieto, M. A., Barros, L., Coutinho, J. A. P., Ferreira, O., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Optimization and comparison of maceration and microwave extraction systems for the production of phenolic compounds from *Juglans regia* L. for the valorization of walnut leaves. *Industrial Crops and Products*, *107*, 341–352.
- Vieitez, I., Maceiras, L., Jachmanián, I., & Alborés, S. (2018). Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *Journal of Supercritical Fluids*, *133*, 58–64.
- Vong, W. C., & Liu, S. Q. (2016). Biovalorisation of okara (soybean residue) for food and nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, *52*, 139–147.
- Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, *17*(6), 300–312.
- Wang, Z., Cui, Y., Vainstein, A., Chen, S., & Ma, H. (2017). Regulation of Fig (*Ficus carica* L.) Fruit Color: Metabolomic and Transcriptomic Analyses of the Flavonoid Biosynthetic Pathway. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1–15.
- Wojdyło, A., Nowicka, P., Carbonell-Barrachina, Á. A., & Hernández, F. (2016). Phenolic compounds, antioxidant and antidiabetic activity of different cultivars of *Ficus carica* L. fruits. *Journal of Functional Foods*, *25*, 421–432.
- Yamashita, C., Chung, M. M. S., dos Santos, C., Mayer, C. R. M., Moraes, I. C. F., & Branco, I. G. (2017). Microencapsulation of an anthocyanin-rich blackberry (*Rubus* spp.) by-product extract by freeze-drying. *LWT - Food Science and Technology*, *84*, 256–262.
- Yao, W. R., Wang, H. Y., Wang, S. T., Sun, S. L., Zhou, J., & Luan, Y. Y. (2011). Assessment of the antibacterial activity and the antidiarrheal function of flavonoids from bayberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(10), 5312–5317.
- Zhao, C. L., Yu, Y. Q., Chen, Z. J., Wen, G. S., Wei, F. G., Zheng, Q., ... Xiao, X. L. (2017). Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. *Food Chemistry*, *214*, 119–128.
- Zhao, Z., Yan, H., Zheng, R., Khan, M. S., Fu, X., Tao, Z., & Zhang, Z. (2018). Anthocyanins characterization and antioxidant activities of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rind extracts. *Industrial Crops and Products*, *113*, 38–45.
- Zheng, X., Xu, X., Liu, C., Sun, Y., Lin, Z., & Liu, H. (2013). Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions. *Separation and Purification Technology*, *104*, 17–25.