



## **Valorização de casca de marmelo como fonte de fibra e compostos bioativos: otimização da extração e avaliação de bioatividades**

**Alexis Pereira**

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e ao Instituto Politécnico da Guarda para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde – Ramo Biotecnologia*

Orientado por:

Dr. José Pinela

Dra. Lillian Barros

Prof. Dr. António José Nogueira

Bragança, 8 de agosto de 2022



Trabalho financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do projeto Mobilizador Norte-01-0247-FEDER-024479: “ValorNatural: Valorização de recursos naturais através da extração de ingredientes de elevado valor acrescentado para aplicações na indústria alimentar”, e através do Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (COMPETE 2020), no âmbito do Projeto POCI-01-0247-FEDER-072241: “IntegraValor: Estratégia integrada de valorização de subprodutos agroalimentares”.



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional



## AGRADECIMENTOS

Esta etapa marca o fim de mais um capítulo na minha vida, e não poderia deixar de tecer o meu primeiro agradecimento a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse aqui. Agradeço a todos os familiares, amigos, colegas e professores.

Quero agradecer à professora Josiana Vaz, da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Bragança por todo o conhecimento transmitido e pela amizade e ensinamentos.

Ao meu orientador José Pinela, pela bondade, disponibilidade, paciência, dedicação e entusiasmo por transmitir o seu conhecimento, tratando-me como um igual, em vez de aluno de mestrado.

Aos meus coorientadores: Prof. Dr. António José Nogueira e Dra. Lillian Barros por permitirem a colaboração e a realização deste trabalho, no Centro de Investigação de Montanha (CIMO) e também pelos aconselhamentos durante a elaboração da dissertação.

Agradeço a toda a equipa do CIMO que se prontificaram sempre a ajudar-me durante todo o trabalho de laboratório, partilhando conhecimentos e orientando no que pudessem, especialmente ao Mikel, um aluno de doutoramento, por me ter guiado, partilhado os seus ensinamentos e dado conselhos nesta etapa da minha vida.

Aos meus avós, sogros e cunhado e outros familiares pelo amor e carinho, que me apoiaram incondicionalmente a realizar os meus objetivos e ultrapassar os obstáculos da vida.

Aos meus pais, desejo exprimir a minha profunda gratidão por me terem educado e encorajarem a perseguir os meus sonhos/objetivos, pelos sacrifícios que realizaram, pela paciência, carinho e apoio, que culminou naquilo que me tornei hoje.

À minha namorada Jessica, que me acompanhou ao longo desta caminhada, pela paciência, carinho, amor e dedicação. Obrigado por estares a meu lado, por me encorajares/inspirares/apoiares e por acreditares nas minhas capacidades, mesmo nos momentos mais complicados da minha vida.

Por último, estou grato a todos que de forma direta ou indiretamente, participaram para a realização desta tese.

## RESUMO

O marmelo é o fruto de *Cydonia oblonga* Mill., um membro da família da maçã e da pera (Rosaceae). Este não é apreciado cru devido à sua dureza, amargura e adstringência, mas é amplamente processado noutros produtos alimentares, como a marmelada, sendo a casca ou epicarpo descartado sem valor comercial. Como tal, este trabalho surgiu com o objetivo de avaliar o potencial deste subproduto ser integrado na cadeia de valor alimentar sob a forma de ingredientes alimentares ricos em compostos bioativos e fibra alimentar.

Para alcançar este objetivo, foi implementado um desenho de composto central rotativo (DCCR) acoplado à metodologia de superfície de resposta (RSM), combinando as variáveis independentes tempo (1–119 min), temperatura (25–94 °C) e proporção de etanol (0–100%) numa matriz de 20 execuções. Após processamento da amostra, os sobrenadantes das extrações foram denominados de extratos bioativos (EB) e os resíduos sólidos de extratos concentrados em fibra (ECF), sendo a casca de marmelo totalmente aproveitada. Os rendimentos de extração foram determinados por gravimetria e, enquanto os EB foram caracterizados quanto à sua composição em compostos fenólicos, ácidos orgânicos e açúcares livres usando diferentes técnicas de cromatografia líquida, os ECF foram analisados quanto à sua cor e teores de fibra alimentar usando um colorímetro e um método enzimático-gravimétrico, respetivamente. Os resultados experimentais foram usados como variáveis dependentes (ou de resposta) e ajustados a uma equação polinomial quadrática para obtenção de modelos teóricos, os quais foram validados com base em diferentes critérios estatísticos (*e.g.*,  $R^2$ ,  $R^2_{Adj}$  e falta de ajuste). Estes traduziram as tendências de extração e permitiram determinar as condições ótimas de extração.

Os rendimentos de extração de EB e ECF contrabalançaram e variaram de 34,47 a 67,09% (*m/m*) e de 39,82 a 65,52% (*m/m*), respetivamente. No EB foi possível identificar 17 compostos fenólicos, incluindo 6 ácidos fenólicos, 9 flavan-3-óis e 2 flavonóis glicosilados, os ácidos oxálico, quínico e málico e os açúcares frutose, glucose e sacarose. O teor total de compostos fenólicos variou de 6,5 a 10,13 mg/g EB. No ponto central do desenho, os flavan-3-óis e os ácidos fenólicos representaram 40,3% e 34,6% da fração fenólica, respetivamente, e os flavonóis corresponderam a 25,1%. Entre os ácidos orgânicos detetados, o ácido málico foi o mais abundante (representando mais 95% do total de ácidos orgânicos), com teores chegando a 6,97 g/100 g EB. Assim, a casca de marmelo surgiu como uma fonte alternativa deste composto utilizado no setor alimentar

e farmacêutico. Quanto aos açúcares, a frutose foi o mais abundante (60-79%), seguido pela glucose (11-25%). Estes dois açúcares redutores juntamente com a sacarose representaram 44 a 62,8% dos EB obtidos e, como esperado, os teores mais baixos estiveram associados ao uso de maiores proporções de etanol. Os modelos preditivos permitiram determinar as condições ótimas de processamento para o rendimento de EB (66,4 min, 28,4 °C e 42,6% de etanol), compostos fenólicos (64,2 min, 88 °C e 0% etanol) e ácido málico (87,7 min, 92,7 °C e 54,4% etanol) que permitiram alcançar valores de respostas de  $69 \pm 2\%$  (*m/m*),  $10,6 \pm 0,2$  mg/g EB e  $7,9 \pm 0,3$  g/100 g EB, respetivamente.

Para os ECF, as maiores proporções de etanol estiveram associadas a maiores rendimentos, mas a menores teores de fibra alimentar (a qual representou 52,5-65,6% dos ECF), o que provavelmente se deveu à maior extração de açúcares solúveis. Além disso, quanto maior a percentagem de açúcares, mais claros (valores de  $L^*$  mais elevados) foram os ECF. Pelo contrário, os ECF com maior proporção de fibra foram mais escuros, o que também poderá ter resultado do processamento a alta temperatura com 20–50% de etanol. A obtenção de ECF foi promovida por 69,1 min de extração a 61,3 °C, usando 99,9% de etanol. Já o teor máximo de fibra alimentar ( $67 \pm 1$  g/100 g ECF) esteve associado ao processamento a 92,2 °C com 35,5% de etanol, enquanto o tempo não foi significativo para o intervalo estudado.

As condições associadas a máximos de extração de compostos fenólicos e ácido málico foram seguidamente usadas para obtenção de extratos enriquecidos nestes compostos bioativos, o que permitiu validar experimentalmente os modelos preditivos com uma boa concordância entre dados teóricos e experimentais. Depois disso, o potencial conservante destes extratos foi avaliado pela medição da sua atividade antioxidante via inibição da peroxidação lipídica e da hemólise oxidativa e potencial antimicrobiano contra bactérias e fungos associados a contaminações alimentares. Os extratos destacaram-se em vários aspetos comparativamente a aditivos alimentares usados como controlo positivo, principalmente os enriquecidos em ácido málico.

Este trabalho mostrou que é possível valorizar a casca de marmelo em ingredientes alimentares bioativos e funcionais, seguindo uma estratégia de “desperdício zero”.

**Palavras-chave:** casca de marmelo; valorização de subprodutos; otimização da extração; compostos fenólicos, atividade antioxidante; atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

Quince is the fruit of *Cydonia oblonga* Mill., a member of the apple and pear family (Rosaceae). This is not appreciated raw due to its hardness, bitterness and astringency, but it is widely processed into other food products, such as marmalade, with the rind or epicarp being discarded without commercial value. Therefore, this work arose with the objective of evaluating the potential of this by-product to be upcycled into the food value chain in the form of food ingredients rich in bioactive compounds and dietary fiber.

To achieve this objective, a central composite rotatable design (CCRD) coupled with response surface methodology (RSM) was implemented, combining the independent variables time (1–119 min), temperature (25–94 °C) and ethanol proportion (0–100%) in a 20-run matrix. After sample processing, the extraction supernatants were named bioactive extracts (BE) and the solid residues as fiber concentrate extracts (FCE), with the quince peel being fully utilized. The extraction yields were then determined by gravimetric methods and, while the BEs were characterized for their composition in phenolic compounds, organic acids and free sugars using different liquid chromatography techniques, the FCEs were analyzed for their color and dietary fiber content using a colorimeter and an enzymatic-gravimetric method, respectively. The experimental results were used as dependent (or response) variables and fitted to a quadratic polynomial equation to obtain theoretical models, which were validated based on different statistical criteria (e.g.,  $R^2$ ,  $R^2_{Adj}$  and lack of fit). These translated the extraction trends and made it possible to determine the optimal processing conditions.

The BE and FCE extraction yields counterbalanced and ranged from 34.47 to 67.09% (w/w) and from 39.82 to 65.52% (w/w), respectively. In the BE it was possible to identify 17 phenolic compounds, including 6 phenolic acids, 9 flavan-3-ols and 2 glycosylated flavonols, oxalic, quinic and malic acids, and the sugars fructose, glucose and sucrose. The total content of phenolic compounds varied from 6.5 to 10.13 mg/g BE. At the center point of the design, flavan-3-ols and phenolic acids represented 40.3% and 34.6% of the phenolic fraction, respectively, and flavonols corresponded to 25.1%. Among the detected organic acids, malic acid was the most abundant (representing over 95% of the total organic acids), with contents reaching 6.97 g/100 g BE. Thus, quince peel emerged as an alternative source of this organic compound used in the food and pharmaceutical sectors. Regarding free sugars, fructose was the most abundant (60-79%),

followed by glucose (11-25%). These two reducing compounds together with sucrose represented 44 to 62.8% of the obtained BE and, as expected, the lower levels were associated with the use of higher ethanol proportions. The predictive models allowed to determine the optimal processing conditions for BE yield (66.4 min, 28.4 °C and 42.6% ethanol), phenolic compounds (64.2 min, 88.0 °C and 0% ethanol) and malic acid (87.7 min, 92.7 °C and 54.4% ethanol) that permitted reaching the response values of  $69 \pm 2\%$  (*w/w*),  $10.6 \pm 0.2$  mg/g BE and  $7.9 \pm 0.3$  g/100 g BE, respectively.

For FCE, higher ethanol proportions were associated with higher yields, but with lower fiber content (which represented 52.5-65.6% of FCE), which was probably due to the greater extraction of soluble sugars. Furthermore, the higher the percentage of sugars, the lighter (higher  $L^*$  values) the FCEs were. In contrast, FCEs with a higher proportion of fiber were darker, which could also have resulted from high temperature processing with 20–50% ethanol. Obtaining FCE was promoted by 69.1 min of extraction at 61.3 °C, using 99.9% ethanol. The maximum dietary fiber content ( $67 \pm 1$  g/100 g FCE) was associated with processing at 92.2 °C with 35.5% ethanol, while time was not significant for the studied range.

The conditions associated with maximum extraction of phenolic compounds and malic acid were then used to obtain extracts enriched in these bioactive constituents, which allowed the experimental validation of the predictive models with a good agreement between theoretical and experimental data. After that, the preservative potential of these extracts was evaluated by measuring their antioxidant activity *via* inhibition of lipid peroxidation and oxidative hemolysis and antimicrobial potential against foodborne bacteria and fungi. The extracts stood out in several aspects compared to food additives used as a positive control, especially those enriched in malic acid.

This work showed that it is possible to valorize quince peel in bioactive and functional food ingredients, following a “zero waste” strategy.

**Keywords:** quince peel; by-product valorization; extraction optimization; phenolic compounds; antioxidant activity; antimicrobial activity.

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>V</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XVI</b>
<b>TRABALHOS RESULTANTES DESTA DISSERTAÇÃO .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ESTADO DE ARTE.....</b>	<b>4</b>
2.1. CARATERIZAÇÃO BOTÂNICA DO MARMELEIRO E DO MARMELO.....	4
2.2. PRODUÇÃO DE MARMELO EM PORTUGAL E NO MUNDO .....	5
2.3. PROCESSAMENTO E SUBPRODUTOS INDUSTRIAIS DE MARMELO .....	6
2.4. ASPETOS NUTRICIONAIS E QUÍMICOS DO MARMELO E SEUS SUBPRODUTOS .....	7
2.4.1. Composição em nutrientes.....	7
2.4.2. Composição em ácidos orgânicos .....	8
2.4.3. Composição em compostos fenólicos .....	9
2.4.4. Composição em fibra alimentar.....	12
2.5. PROPRIEDADES BIOATIVAS E FUNCIONAIS DO MARMELO.....	14
2.6. PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS FIBRAS .....	15
2.7. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DE ELEVADO VALOR .....	15
2.8. ENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES BIOATIVAS.....	16
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1. PADRÕES E REAGENTES.....	21
4.2. MATERIAL VEGETAL .....	21
4.3. DESENHO EXPERIMENTAL PARA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO.....	22
4.4. MÉTODO DE EXTRAÇÃO .....	23
4.5. DETERMINAÇÃO DAS RESPOSTAS EXPERIMENTAIS .....	23
4.5.1. Rendimento de extração .....	24
4.5.2. Compostos fenólicos .....	24
4.5.3. Ácidos orgânicos .....	25
4.5.4. Açúcares solúveis .....	26

4.5.5.	Fibra alimentar total.....	27
4.5.6.	Parâmetros de cor dos extratos concentrados em fibra.....	28
4.6.	MODELAÇÃO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS MODELOS .....	28
4.7.	VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL DOS MODELOS E AVALIAÇÃO DAS BIOATIVIDADES DOS EXTRATOS BIOATIVOS OBTIDOS SOB AS CONDIÇÕES OTIMIZADAS .....	29
4.7.1.	Atividade antioxidante.....	30
4.7.2.	Atividade antimicrobiana .....	31
4.7.3.	Avaliação de diferenças estatística entre bioatividades de extratos .....	32
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
5.1.	RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO E PERFIL QUÍMICO .....	34
5.1.1.	Rendimento de extração .....	34
5.1.2.	Compostos fenólicos .....	34
5.1.3.	Ácidos orgânicos .....	38
5.1.4.	Açúcares solúveis .....	40
5.1.5.	Extratos concentrados em fibra .....	41
5.2.	AJUSTE E VERIFICAÇÃO ESTATÍSTICA DOS MODELOS.....	43
5.3.	EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES E CONDIÇÕES ÓTIMAS DE EXTRAÇÃO .....	48
5.3.1.	Efeitos no rendimento de extração .....	48
5.3.2.	Efeitos nos compostos fenólicos .....	49
5.3.3.	Efeitos no ácido málico e outros ácidos orgânicos.....	51
5.3.4.	Efeitos nos açúcares solúveis .....	53
5.3.5.	Efeitos nos extratos concentrados em fibra .....	53
5.4.	VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL DOS MODELOS PREDITIVOS.....	57
5.5.	PROPRIEDADES BIOATIVAS DOS EXTRATOS OBTIDOS EM CONDIÇÕES ÓTIMAS ...	58
5.5.1.	Atividade antioxidante.....	58
5.5.2.	Atividade antimicrobiana .....	60
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>	<b>64</b>
6.1.	NOTAS DE CONCLUSÃO .....	64
6.2.	ESTUDOS FUTUROS .....	65
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>81</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Marmeleiro com fruto (marmelo) .....	4
<b>Figura 2.</b> Dados sobre a produção (em toneladas) de marmelo no mundo (A) e em Portugal (B) desde 2010.....	5
<b>Figura 3.</b> Gráfico de setores ilustrando a produção do marmelo nos diferentes continentes, entre 1994 e 2020.....	6
<b>Figura 4.</b> Fluxograma das etapas iniciais da produção industrial de marmelada. As etapas com a caixa sombreada geram um subproduto ou resíduo.....	7
<b>Figura 5.</b> Representação dos vinte pontos do DCCR no espaço experimental, incluindo oito pontos fatoriais (●), seis pontos axiais ou estrela (●) e um ponto central replicado seis vezes (●). .....	22
<b>Figura 6.</b> Fluxograma dos passos envolvidos na obtenção de extratos bioativos (EB) e extratos concentrados em fibra (ECF) a partir de casca de marmelo e as respostas experimentais usadas no processo de otimização RSM. ....	24
<b>Figura 7.</b> Cromatograma representativo do perfil fenólico do EB de casca de marmelo obtido com a 19ª execução do desenho experimental, registado nos comprimentos de onda de 280 nm e 370 nm. A identificação dos picos é apresentada na <b>Tabela 6</b> ..	36
<b>Figura 8.</b> Composição média relativa em compostos fenólicos individuais dos extratos de casca de marmelo obtidos com as réplicas do ponto central do desenho experimental. A identidade dos compostos é mostrada na <b>Tabela 6</b> .....	38
<b>Figura 9.</b> Gráficos de superfície de resposta com representações gráfica de dados estatísticos ilustrando os efeitos das variáveis independentes no rendimento de extrato bioativo (EB) obtido a partir da casca de marmelo. Em cada gráfico 3D, a variável excluída foi fixada no seu valor ótimo. ....	47
<b>Figura 10.</b> Gráficos de superfície de resposta com representações gráfica de dados estatísticos ilustrando os efeitos das variáveis independentes na extração de compostos fenólicos da casca de marmelo. Em cada gráfico 3D, a variável excluída foi fixada no seu valor ótimo. ....	50
<b>Figura 11.</b> Gráficos de superfície de resposta ilustrando os efeitos das variáveis independentes na extração de ácidos fenólicos, flavan-3-óis e flavonóis a partir da casca de marmelo. Em cada gráfico 3D, a variável excluída foi fixada no seu valor ótimo.....	51

- Figura 12.** Gráficos de superfície de resposta com representações gráfica de dados estatísticos ilustrando os efeitos das variáveis independentes na extração de ácido málico a partir da casca de marmelo. Em cada gráfico 3D, a variável excluída foi fixada no seu valor ótimo. .... 52
- Figura 13.** Gráficos de superfície de resposta com representações gráfica de dados estatísticos ilustrando os efeitos das variáveis independentes no rendimento de ECF obtido a partir de casca de marmelo. Em cada gráfico 3D, a variável excluída foi fixada no seu valor ótimo. .... 54
- Figura 14.** Gráficos de superfície de resposta com representações gráfica de dados estatísticos ilustrando os efeitos das variáveis independentes no conteúdo em fibra bruta obtido de casca de marmelo. Em cada gráfico 3D, a variável excluída foi fixada no seu valor ótimo. .... 55

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição média em nutrientes da polpa de marmelo. ....	8
<b>Tabela 2.</b> Compostos fenólicos descritos na polpa, casca e semente de marmelo. ....	12
<b>Tabela 3.</b> Valores codificados e decodificados das variáveis independentes do DCCR implementado para otimizar os processos de extração. ....	22
<b>Tabela 4.</b> Rendimento de extrato bioativo (EB) e teores de compostos fenólicos e ácido málico obtidos experimentalmente a partir de casca de marmelo com as 20 execuções da matriz DCCR. ....	35
<b>Tabela 5.</b> Compostos fenólicos identificados nos EB de casca de marmelo. É apresentado o tempo de retenção ( $R_t$ ), o comprimento de onda de absorção máxima ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ) na região do visível e o ião desprotonado de cada composto identificado. ....	36
<b>Tabela 6.</b> Teores de ácidos quínico, de ácido málico, de ácidos orgânicos totais e de açúcares solúveis obtidos experimentalmente da casca de marmelo com as 20 execuções da matriz DCCR. ....	39
<b>Tabela 7.</b> Rendimento de extrato concentrado em fibra (ECF) e teores de fibra alimentar e parâmetros de cor obtidos experimentalmente a partir de casca de marmelo com as 20 execuções da matriz DCCR. ....	43
<b>Tabela 8.</b> Valores paramétricos estimados com a <b>Equação 2</b> e dados estatísticos do procedimento de ajuste dos modelos para o extrato bioativo (EB) e os seus constituintes. ....	44
<b>Tabela 9.</b> Valores paramétricos estimados com a <b>Equação 2</b> e dados estatísticos do procedimento de ajuste dos modelos para o ácido quínico, os ácidos orgânicos totais e os açúcares solúveis. ....	45
<b>Tabela 10.</b> Valores paramétricos estimados com a <b>Equação 2</b> e dados estatísticos do procedimento de ajuste dos modelos para os extratos concentrados em fibra (ECF) e a sua cor e conteúdo em fibra alimentar. ....	46
<b>Tabela 11.</b> Rendimento de extração, teores de compostos fenólicos (CF) e ácido málico (AM) e parâmetros de cor dos ECF obtidos em condições ótimas de extração a partir de casca de marmelo. ....	57
<b>Tabela 12.</b> Atividade antioxidante de extratos de casca de marmelo obtidos em condições que promovem a extração de compostos fenólicos (CF), ácido málico (AM) e ambos os constituintes (CF/AM) e dos controlos positivos (ascorbato de cálcio (E223), metabissulfito de sódio (E302) e Trolox). ....	58

<b>Tabela 13.</b> Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos de casca de marmelo obtidos nas condições que promovem a extração de compostos fenólicos (CF), ácido málico (AM) e ambos os constituintes (CF/AM) e dos controlos positivos (benzoato de sódio (E211), metabissulfito de potássio (E224), estreptomina, ampicilina, cetoconazol e bifonazol).....	61
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><i>a</i>*</b>	Cromaticidade do verde (-) ao vermelho (+)
<b>AAPH</b>	Dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropionamidina)
<b>ANOVA</b>	Análise de variância, do inglês “ <i>analysis of variance</i> ”
<b>AOAC</b>	Associação de Químicos Analíticos Oficiais, do inglês “ <i>Association of Official Analytical Chemists</i> ”
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b><i>b</i>*</b>	Cromaticidade do azul (-) ao amarelo (+)
<b>CV</b>	Coefficiente de variação
<b>DAD</b>	Detetor de arranjo de díodos, do inglês “ <i>diode array detector</i> ”
<b>DCCR</b>	Desenho de composto central rotativo
<b>E211</b>	Aditivo alimentar benzoato de sódio
<b>E223</b>	Aditivo alimentar metabissulfito de sódio
<b>E224</b>	Aditivo alimentar metabissulfito de potássio
<b>E302</b>	Aditivo alimentar ascorbato de cálcio
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentração que produz 50% de efeito antioxidante
<b>ECF</b>	Extratos concentrado em fibra
<b>EB</b>	Extrato bioativo
<b>EFSA</b>	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, do inglês “ <i>European Food Safety Authority</i> ”
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês “ <i>high-performance liquid chromatography</i> ”
<b>HPLC-RI</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por índice de refração, do inglês “ <i>high-performance liquid chromatography with refraction index detection</i> ”
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória média, do inglês “ <i>half-maximal inhibitory concentration</i> ”
<b>INT</b>	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólio
<b><i>L</i>*</b>	Luminosidade, do preto (0) ao branco (100)
<b>LOD</b>	Limite de detecção, do inglês “ <i>limit of detection</i> ”
<b>LOQ</b>	Limite de quantificação, do inglês “ <i>limit of quantification</i> ”
<b>MBC</b>	Concentração mínima bactericida, do inglês “ <i>minimum bactericidal concentration</i> ”

<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>MFC</b>	Concentração mínima fungicida, do inglês “ <i>minimum fungicidal concentration</i> ”
<b>MIC</b>	Concentração mínima inibitória, do inglês “ <i>minimum inhibitory concentration</i> ”
<b>MS</b>	Espectrometria de massa, do inglês “ <i>mass spectrometry</i> ”
<b>NCTC</b>	<i>National Collection of Type Cultures</i>
<b>OxHLIA</b>	Ensaio da inibição da hemólise oxidativa, do inglês “ <i>oxidative haemolysis inhibition assay</i> ”
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino, do inglês “ <i>phosphate-buffered saline</i> ”
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinação
<b>R<sup>2</sup><sub>adj</sub></b>	Coefficiente de determinação ajustado
<b>RGB</b>	Vermelho-verde-azul, do inglês “ <i>red-green-blue</i> ”
<b>RSM</b>	Metodologia de superfície de resposta, do inglês “ <i>response surface methodology</i> ”
<b>Rt</b>	Tempo de retenção, do inglês “ <i>retention time</i> ”
<b>S</b>	Solvente de extração/proporção de etanol
<b>T</b>	Temperatura
<b>t</b>	Tempo
<b>TBARS</b>	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês “ <i>thiobarbituric acid reactive substances</i> ”
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colónias
<b>UFLC-PDA</b>	Cromatografia líquida ultrarrápida com detecção por arranjo de fotodíodos, do inglês “ <i>ultra-fast liquid chromatography with photodiode array detection</i> ”
<b>UPLC</b>	Cromatografia líquida de ultra performance, do inglês “ <i>ultra-performance liquid chromatography</i> ”
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visível
<b>λ<sub>máx</sub></b>	Comprimento de onda de máxima absorção
<b>Δt</b>	Intervalo de tempo
<b>[M-H]<sup>-</sup></b>	Ião molecular desprotonado

## TRABALHOS RESULTANTES DESTA DISSERTAÇÃO

Os resultados desta dissertação de mestrado deram origem às seguintes comunicações em encontros científicos e uma publicação científica em fase de preparação:

Alexis Pereira, Souha Othman, Maria Inês Dias, Mikel Añibarro-Ortega, Isabel C.F.R. Ferreira, José Pinela, Lillian Barros. Novel antioxidant and fibre-rich food ingredients from quince peel. Em: 1<sup>st</sup> Research Meeting on Biochemistry. Online; 9-10/12/2021 (Comunicação em painel e oral internacional).

Alexis Pereira, Souha Othman, Mikel Añibarro-Ortega, Maria Inês Dias, Ana Ćirić, Filipa Mandim, Marina Soković, Isabel C.F.R. Ferreira, José Pinela, Lillian Barros. Quince peel as a natural food preservative: a renewable alternative in times of scarcity. Em: Webinar Chromatography helps in times of crisis, Sociedade Portuguesa de Química. Online; 17/12/2021 (Comunicação oral nacional).

Alexis Pereira, Souha Othman, Maria Inês Dias, Mikel Añibarro-Ortega, Isabel C.F.R. Ferreira, José Pinela, Lillian Barros. Phenolic profile, bioactivity and fibre content of quince peel. Em: 2022 #RSCPoster Twitter Conference, Royal Society of Chemistry. Online; 1-2/03/2022 (Comunicação em painel internacional).

Alexis Pereira, Souha Othman, Maria Inês Dias, Mikel Añibarro-Ortega, Isabel C.F.R. Ferreira, José Pinela, Lillian Barros. Perfil fenólico, bioatividade e teor de fibras da casca de marmelo. Em: Ciência 2022 – Encontro com a Ciência e Tecnologia em Portugal 2022. Lisboa, 16-18/05/2022 (Comunicação em painel nacional).

Alexis Pereira, Mikel Añibarro-Ortega, António Nogueira, José Pinela, Lillian Barros. Natural food ingredients from quince peel: Towards a "zero-waste" production system. Em: XVI Encontro de Química dos Alimentos. Castelo Branco; 23-26/10/2022 (Aceite para comunicação em painel nacional).

Alexis Pereira, Mikel Añibarro-Ortega, Ana Ćirić, Maria Inês Dias, Marina Soković, António Nogueira, José Pinela, Lillian Barros. Caracterização e extração otimizada de compostos bioativos de casca de marmelo. Em: IV Congresso Nacional das Escolas Superiores Agrárias. Santarém; 3-4/11/2022 (Aceite para comunicação nacional).

Alexis Pereira, Mikel Añibarro-Ortega, Marina Kostić, António Nogueira, Marina Soković, José Pinela, Lillian Barros. Upcycling quince peel into bioactive and dietary fiber ingredients. Manuscrito em preparação.



## 1. INTRODUÇÃO

Há imenso tempo que o Homem utiliza várias espécies vegetais pela sua riqueza em nutrientes e compostos bioativos, os quais podem ajudar a prevenir e/ou tratar diversas patologias, fortalecendo o sistema imunológico ou atuando diretamente nos mecanismos de ação de doenças (Mandim et al., 2019).

Hoje em dia, são cada vez mais as evidências que evidenciam o impacto negativo do uso excessivo de recursos naturais, o que pode impulsionar a humanidade para uma situação preocupante que não poderá sustentar a sociedade como tem acontecido até ao momento (Aschemann-Witzel & Stangherlin, 2021). Visto os recursos do nosso planeta serem finitos e tendo em conta as necessidades atuais e futuras da população humana, é imperativo melhorar o sistema agroalimentar atual, tornando-o mais saudável, circular e eficiente em termos de aproveitamento de recursos (Aschemann-Witzel & Stangherlin, 2021; Silva & Oliveira, 2013). Neste sentido, a reinserção de subprodutos agroalimentares na cadeia de valor surge como uma estratégia inovadora orientada para a sustentabilidade que permitirá reduzir o desperdício gerado e melhorar a eficiência na utilização dos recursos naturais. Desta forma, os resíduos ou subprodutos poderão ser transformados em novos produtos e ingredientes com potencial aplicação na indústria alimentar, biotecnológica e farmacêutica, entre muitos outros setores (Aschemann-Witzel & Stangherlin, 2021; Pinela et al., 2017). A recuperação de biomoléculas de elevado valor acrescentado a partir de resíduos ou subprodutos desprovidos de valor económico e a sua reutilização na cadeia agroalimentar como ingredientes funcionais pode ser alcançada através de um processo de recuperação que pode incluir as seguintes etapas: pré-tratamento macroscópico, extração, purificação/isolamento e desenvolvimento do produto final (Pinela et al., 2017; Rocha et al., 2020).

O marmelo é o fruto de uma árvore decídua da família das Rosáceas, a *Cydonia oblonga* Miller, e é bastante conhecido pelos seus usos medicinais, nutricionais e ornamentais (Karar et al., 2014; Silva, Andrade, Mendes, et al., 2002; Stojković et al., 2018). Apesar deste fruto não ser apreciado cru devido à sua dureza, amargura e adstringência, é consumido sob a forma de marmelada e outros produtos doces (Griñán, Rodríguez, et al., 2019; Silva, Andrade, Mendes, et al., 2002). De acordo com a legislação Portuguesa (Decreto-Lei n.º 97/84 de 28 de Março, 1984), a marmelada resulta da mistura obtida exclusivamente da cozedura do mesocarpo do marmelo com açúcar, sendo a casca

descartada como um subproduto. No entanto, este poderá ser valorizado como fonte de compostos bioativos e funcionais, visto já ter sido descrito como uma interessante fonte de compostos fenólicos (Fattouch et al., 2007; Legua et al., 2013; Othman, 2021).

Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de valorização da casca de marmelo para a produção simultânea de ingredientes bioativos e concentrados de fibra alimentar para aplicação na indústria alimentar. Para isso, o material vegetal foi processado sob um desenho experimental de 20 execuções acoplado à metodologia de superfície de resposta (RSM); os compostos fenólicos e o ácido málico, entre outros constituintes, foram analisados nos sobrenadantes das extrações, enquanto os resíduos das extrações foram caracterizados quanto à sua cor e teor de fibra alimentar. Após determinar as melhores condições de processamento, os resultados previstos pelos modelos foram validados experimentalmente e os extratos enriquecidos em compostos fenólicos e ácido málico foram estudados *in vitro* para as atividades antioxidante e antimicrobiana. Este trabalho segue as tendências atuais de desperdício zero e contribuir para o uso mais eficiente dos recursos agroalimentares.



## 2. ESTADO DE ARTE

### 2.1. Caracterização botânica do marmeleiro e do marmelo

O marmelo é o fruto de uma árvore decídua da mesma família da maçã (Rosaceae) e da subfamília *Pomoideae*, cujo nome científico é *Cydonia oblonga* Miller (sinónimo: *Cydonia vulgaris* Pers.), sendo o único membro do género *Cydonia* (Alesiani et al., 2010; Ashraf et al., 2016; Griñán, Rodríguez, et al., 2019; Silva et al., 2004; Stojanović et al., 2017). Esta árvore pode crescer entre 5 a 8 m de altura e entre 4 a 5 m de largura e produz o fruto (marmelo), de aroma forte e duradouro quando maduro, que possui um grande número de sementes plano-convexas dispostas em duas filas verticais (Alesiani et al., 2010; Ashraf et al., 2016; Griñán, Rodríguez, et al., 2019; Silva et al., 2004). A planta floresce na primavera com flores de forma elíptica de cor rosa claro, com um diâmetro de 5 cm e com 6 a 11 cm de comprimento, e com pelos brancos na sua superfície (Ashraf et al., 2016). O fruto tem entre 7 a 12 cm de comprimento e 6 a 9 cm de diâmetro (**Figura 1**) (Alesiani et al., 2010; Griñán, Rodríguez, et al., 2019; Silva et al., 2004). Este é verde e possui pelos cinzento-esbranquiçados quando imaturo e torna-se amarelo dourado quando maduro (Tamri et al., 2014). Com base na forma do marmelo, os pomos podem ser semelhantes a maçãs ou em forma de pera (Griñán, Galindo, et al., 2019; Rop et al., 2011). Os marmelos em forma de maçã têm uma polpa aromática, mais seca e dura, enquanto os marmelos em forma de pera são finos e macios (Rop et al., 2011). Atualmente, existem mais de 70 genótipos e variedades de marmelo cultivados em todo o mundo (Rasheed et al., 2018).

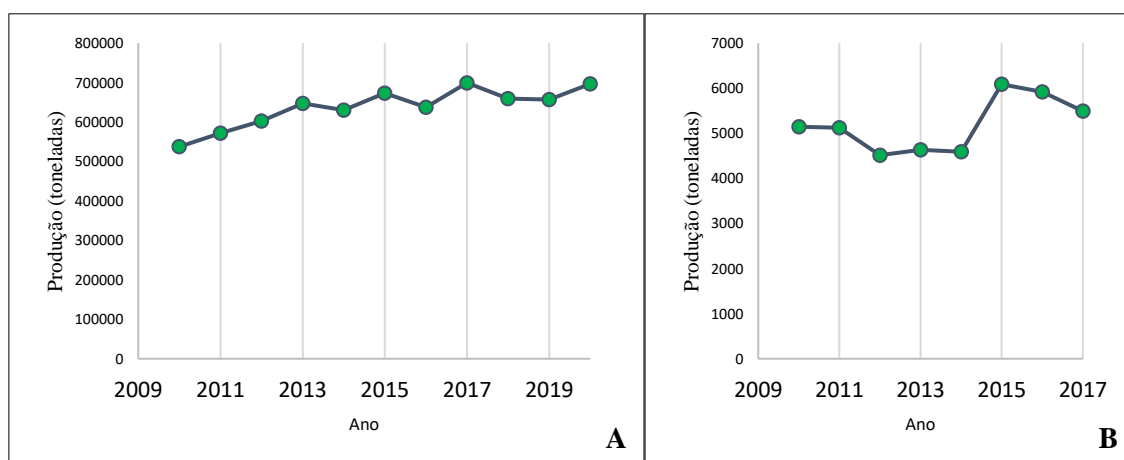


**Figura 1.** Marmeleiro com fruto (marmelo). Fonte: [https://jb.utad.pt/especie/Cydonia\\_oblonga](https://jb.utad.pt/especie/Cydonia_oblonga)

## 2.2. Produção de marmelo em Portugal e no mundo

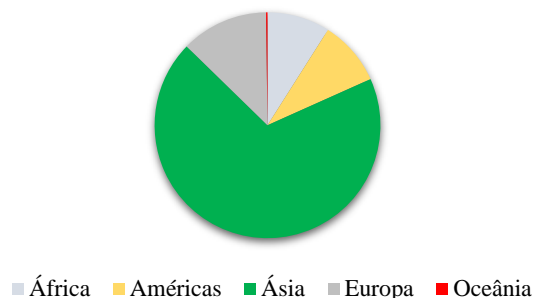
O nome do género *Cydonia* vem da região de Kydonia da costa noroeste de Creta, Grécia, onde a árvore é cultivada desde a antiguidade. Acredita-se que os marmelos eram “maças de ouro” de Hespérides, referidas no décimo primeiro trabalho de Hércules, e também o fruto que Paris, príncipe de Troia, ofereceu a Afrodite, a deusa do amor, para ganhar seu favor em seduzir Helena e provocar a guerra de Troia. No antigo ritual grego, os frutos de marmelo eram oferendas de casamento símbolo da fertilidade (Ganopoulos et al., 2011). Na Roma Antiga, o marmelo era conhecido por “maça de mel”, não pelo facto de ser doce, mas sim porque era conservado em mel para dar um exemplo das numerosas formas de consumir o marmelo (Karar et al., 2014).

O marmeleiro é provavelmente originário do Cáucaso e propagou-se para o Médio Oriente, Grécia e à volta do Mediterrâneo (de Escalada Pla et al., 2010; Ganopoulos et al., 2011; Hemmati et al., 2012; Zhang et al., 2021). Embora a sua antiga reputação tenha vindo a perder destaque, o marmelo continua a ser cultivado em todo o mundo. Como se pode observar na **Figura 2A**, a produção mundial de marmelo aumentou nos últimos 10 anos, atingindo 696.861 toneladas em 2020 numa área de produção de 77.060 hectares (FAOSTAT, 2022). Para Portugal, a FAOSTAT não apresenta dados de produção desde 2017, mas, para este ano, a produção de marmelo atingiu 5.492 toneladas (**Figura 2B**), o que representou menos de 1% do total mundial. Por sua vez, a Turquia e a China contribuíram com cerca de 41% do total mundial. Uzbequistão, Irão, Marrocos e Azerbaijão foram outros países com grande produção de marmelo (FAOSTAT, 2022).



**Figura 2.** Dados sobre a produção (em toneladas) de marmelo no mundo (A) e em Portugal (B) desde 2010. Fonte: FAOSTAT (2022).

Como mostrado na **Figura 3**, também é possível concluir que o continente asiático foi o maior produtor de marmelo entre 1994 e 2019 (69%), seguido pela Europa (12,5%), América (9,3%), África (9%) e Oceânia (0,2%).



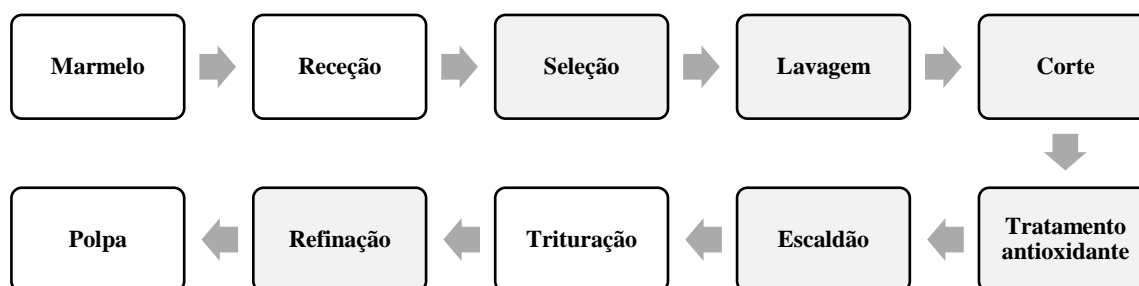
**Figura 3.** Gráfico de setores ilustrando a produção do marmelo nos diferentes continentes, entre 1994 e 2020. Fonte: FAOSTAT (2022).

### 2.3. Processamento e subprodutos industriais de marmelo

O marmelo não é um fruto apreciado fresco devido à polpa dura, amarga e adstringente. No entanto, quando maduro, é amplamente utilizado na produção de geleia, licor, bebidas, caramelos e marmeladas, entre outros produtos alimentares, bem como na extração de compostos aromáticos (Alesiani et al., 2010; Oliveira et al., 2012; Rasheed et al., 2018).

De acordo com a Legislação Portuguesa (Decreto-Lei n.o 97/84 de 28 de Março 1984), a marmelada é o produto resultante de uma mistura homogénea e consistente, obtida exclusivamente da cozedura do mesocarpo do marmelo com açúcar. No entanto, alguns aditivos também são adicionados à marmelada produzida a nível industrial, incluindo conservantes (por exemplo, ácido benzoico e ácido sórbico), antioxidantes (por exemplo, ácido ascórbico) e reguladores de acidez (por exemplo, ácido cítrico e ácido tartárico), entre outros. Considerando o elevado volume de produção da marmelada, são necessárias grandes quantidades de matéria-prima, principalmente marmelo e açúcar. Durante a produção deste produto, a gelificação depende do tipo e concentração de pectina, do pH e da quantidade de açúcar e ocorre quando a pectina é precipitada pela adição de açúcar, alterando o equilíbrio existente entre a pectina e a água. A marmelada é um doce típico português, que tem deixado de ser produzida de forma artesanal e, quando produzida industrialmente, é geralmente de menor qualidade ou adulterada, devido ao preço mais baixo e à textura semelhante da maçã e da pera e pelo aroma forte do marmelo encobrir facilmente os sabores de maçã ou pera (Silva et al., 2000).

A **Figura 4** ilustra as etapas iniciais da produção industrial da marmelada, muitas das quais geram um subproduto ou resíduo, segundo Eusébio e Isabel (2013). Após receção, o marmelo é selecionado para obtenção de matéria-prima uniforme e de elevada qualidade, depois é lavado com água clorada, processado para retirar a casca e partes danificadas (operação realizada de forma manual ou mecânica e que gera um subproduto sólido). Após um tratamento antioxidante com uma solução de ácido ascórbico (resultando um subproduto líquido), os frutos são escaldados com água a 90 °C para inativar as enzimas responsáveis pelo escurecimento e reduzir a carga microbiana. Depois disso, são triturados para obtenção de uma polpa que é refinada por centrifugação para eliminar as sementes. A polpa resultante segue para a produção de marmelada.



**Figura 4.** Fluxograma das etapas iniciais da produção industrial de marmelada. As etapas com a caixa sombreada geram um subproduto ou resíduo. Adaptado de Eusébio e Isabel (2013).

## 2.4. Aspetos nutricionais e químicos do marmelo e seus subprodutos

### 2.4.1. Composição em nutrientes

Os frutos frescos, em geral, são dos alimentos mais atrativos do ponto de vista visual e sensorial e, tal como os produtos hortícolas, carecem de um elevado valor energético (25 a 100 kcal/100 g), proporcionado principalmente pelos hidratos de carbono, uma vez que são alimentos pobres em proteína e gordura (Hegedűs et al., 2013).

O marmelo apresenta um baixo teor de gordura e é uma importante fonte de ácidos orgânicos, açúcares, fibra e minerais (incluindo potássio, fósforo e cálcio), além de outros constituintes promotores de saúde (Fattouch et al., 2007; Legua et al., 2013; Rodríguez-Guisado et al., 2009; Szychowski et al., 2018). No entanto, os fatores climáticos têm uma grande influência na qualidade nutricional dos frutos (Rasheed et al., 2018).

Do ponto de vista nutricional, o marmelo apresenta por um conteúdo em hidratos de carbono compreendido entre 10 e 15% (Cornatosky & Andrada, 2000). A **Tabela 1** apresenta a composição em macro e micronutrientes da polpa de marmelo. O marmelo fresco apresenta um elevado teor de água e um baixo valor calórico (51 a 60 kcal/100 g), podendo ser utilizado como variante ou alternativa em dietas ou planos alimentares hipocalóricos ou de conteúdo restrito em hidratos de carbono (em casos de excesso de peso, obesidade e diabetes, entre outros) (Cornatosky & Andrada, 2000). O conteúdo em proteínas e lípidos é muito baixo. Por outro lado, é um alimento interessante pela sua composição em micronutrientes, principalmente potássio e vitaminas (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Composição média em nutrientes da polpa de marmelo.

Composição centesimal (g/100 g)					
Água	Hidratos de carbono	Proteínas	Lípidos	Celulose	Energia (kcal)
83-85	12-15	0,3-0,4	0,1	1,5-2,2	51-60
Composição em elementos minerais (mg/100 g)					
Cálcio	Fósforo	Ferro	Cobre	Sódio	Potássio
6-10	17-21	0,3-0,6	0,13	2-9	197-203
Composição em vitaminas (mg/100 g)					
Vitamina A	Vitamina B <sub>1</sub>	Vitamina B <sub>2</sub>	Niacina	Vitamina C	Vitamina B <sub>6</sub>
Vestígios	0,02-0,04	0,03	0,2-0,7	13-15	0,04

Adaptado de Cornatosky e Andrada (2000).

#### 2.4.2. Composição em ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são metabolitos primários que podem ser encontrados em grandes quantidades em frutos e vegetais. Como os compostos fenólicos, esta classe de compostos também tem um papel protetor contra várias doenças devido ao seu poder antioxidante (Oliveira et al., 2012). O ácido ascórbico é provavelmente o antioxidante solúvel em água mais amplamente distribuído em vegetais. O ácido oxálico é o ácido dicarboxílico mais simples e, apesar de funcionar como antinutriente, tem uma forte capacidade quelante para catiões multivalentes. Outros ácidos carboxílicos, como os ácidos tartárico, málico, cítrico, succínico e hidroxiglutarico comportam-se como antioxidantes, pois também possuem capacidade de quelar metais. São, portanto, classificados como antioxidantes “preventivos” ou sinérgicos (Oliveira et al., 2012).

Os ácidos orgânicos, para além de serem importantes metabolitos resultantes do metabolismo primário das plantas em geral, desempenham um papel decisivo não só na qualidade dos frutos, mas também na dieta humana (Dolenc-Šturm et al., 1999). A natureza química, o estado isomérico e a concentração de ácidos orgânicos são fatores que influenciam fortemente as propriedades organoléticas dos frutos e dos seus derivados (Lee, 1993). A sua concentração determina o pH e pode afetar o sabor e o aroma dos derivados de frutos e a sua suscetibilidade à degradação microbiana (Blanco et al., 1988). Alguns frutos apresentam um perfil em ácidos orgânicos muito característico, podendo ser usado em estudos de autentificação de produtos alimentares (Cámara et al., 1994; Leong & Shui, 2002). A composição dos frutos em ácidos orgânicos pode ser influenciada por vários fatores, tais como a variedade, o grau de maturação, a sua origem geográfica e as condições climáticas dos locais de produção (Cámara et al., 1994; Blanco et al., 1988).

Os ácidos orgânicos são importantes constituintes do marmelo. Silva et al. (2002) identificaram os ácidos cítrico, ascórbico, málico, quínico, xiquímico e fumárico em várias amostras de casca e polpa de marmelo, com teores totais variando de 7 a 14 g/kg em ambas as amostras. Em alguns casos, a quantidade de ácidos orgânicos foi maior na polpa do que na casca correspondente, enquanto que noutros casos as diferenças foram pequenas. Adicionalmente, a soma dos ácidos málico e quínico foi responsável por 96–99% do conteúdo total de ácidos orgânicos nas polpas e 93–98% nas cascas. Por sua vez, Szychowski et al. (2014) relataram um perfil constituído pelos ácidos fítico, málico, quínico, cítrico e tartárico, com predominância dos ácidos fítico e málico. No entanto, é de destacar que o ácido fítico pode reduzir a biodisponibilidade de certos nutrientes, como os minerais, pois trata-se de um antinutriente.

#### **2.4.3. Composição em compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal. Mais de 4.000 compostos fenólicos (como ácidos fenólicos, flavonoides e taninos) foram já detetados em plantas vasculares, onde previnem danos oxidativos causados por radicais livres às proteínas, hidratos de carbono, lípidos e DNA (Oliveira et al., 2012). Além disto, alguns dos compostos fenólicos são também benéficos para a saúde humana, dado conseguirem atuar como antioxidantes através diferentes maneiras, como: agentes redutores, doadores de hidrogénio, sequestradores de radicais livres, inibidores

de oxigénio singuleto, quelantes de metais e inibidores de enzimas e, portanto, como protetores celulares contra o danos oxidativo (Fattouch et al., 2007; Oliveira et al., 2012).

Apesar da omnipresença dos compostos fenólicos em frutos e vegetais, evidências experimentais demonstraram que alguns deles podem funcionar como marcadores úteis para a origem botânica e geográfica de vários alimentos vegetais (vinho, grãos de café e geleias) e alguns dos compostos fenólicos podem ser considerados marcadores químicos da autenticidade de frutos (Oliveira et al., 2007; Silva, Andrade, Ferreres, et al., 2002). No entanto, dentro de cada espécie, a natureza desses compostos pode variar de órgão para órgão e vários outros fatores podem contribuir para a variabilidade na distribuição destes compostos, como o genótipo e cultivar, a origem geográfica, grau de maturação, fatores climáticos e práticas agrícolas (Oliveira et al., 2007; Silva, Andrade, Ferreres, et al., 2002). Além disso, os compostos fenólicos podem contribuir para a amargura, adstringência, cor, aroma e estabilidade oxidativa (Zapata et al., 2019).

A presença de agentes antioxidantes a nível alimentar é importante, não só para a conservação dos alimentos, mas também porque constituem um suplemento de defesa para o organismo (Honglian & Noriko, 2001). Entre as diferentes classes de compostos com propriedades antioxidantes, a dos compostos fenólicos representa uma das de maior interesse dado que, para além de se encontrarem amplamente distribuídos na natureza, apresentam atividade antirradicalar, bem como capacidade para quelar metais e inibir sistemas geradores de radicais livres. Portanto, estes antioxidantes reduzem os danos oxidativos em biomoléculas e células e têm sido implicados na patogénese de várias doenças humanas e certos tipos de cancro (Honglian & Noriko, 2001; Zapata et al., 2019).

Os compostos fenólicos do marmelo incluem os flavonoides (flavan-3-óis e flavonóis) e os ácidos hidroxicinâmicos/cafeoilquínicos (Wojdyło et al., 2014). A ação antioxidante destes compostos assenta essencialmente no elevado potencial para sequestrar radicais livres, tais como os radicais superóxido, hidroxilo e peróxido (Magalhães, 2009). Os compostos fenólicos não reagem rapidamente com o peróxido de hidrogénio mas são capazes de sequestrar o oxigénio singuleto e o ácido hipocloroso (Magalhães, 2009). Também podem interagir sinergicamente com outros antioxidantes como o ácido ascórbico e o  $\alpha$ -tocoferol (Magalhães, 2009).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grupos: os flavonoides e os não flavonoides, estando ambos presentes em frutas e vegetais. Os flavonoides são

pigmentos naturais de baixo peso molecular, com uma estrutura base C6-C3-C6. Dependendo da substituição e do nível de oxidação do anel C, os flavonoides podem ser divididos em catorze classes, sendo os que se incluem na dieta divididos essencialmente em seis (Magalhães, 2009):

- Flavonas – possuem um grupo carbonilo na posição 4 e uma ligação dupla entre as posições 2,3. Exemplos: apigenin e luteoleína;
- Flavonóis – possuem um grupo carbonilo na posição 4, um grupo hidroxilo na posição 3 e uma ligação dupla entre as posições 2,3. Exemplos: quercetina, kaempferol e quercitagetina. Estes são responsáveis pela cor de alguns frutos;
- Flavanonas – possuem um grupo carbonilo na posição 4. Exemplos: miricetina, hesperidina, naringina e naringenina;
- Flavanóis – possuem um grupo hidroxilo na posição 3. Exemplos: catequina e epicatequina;
- Antocianidinas – possuem um grupo hidroxilo na posição 3 e duas ligações duplas, uma entre o átomo de oxigénio e o carbono 2 e outra entre os carbonos 3 e 4. Exemplos: cianidina, petunidina e malvidina;
- Isoflavonas – possuem um grupo carbonilo na posição 4 e o anel B encontra-se ligado à restante molécula através do carbono 3. Podem ainda possuir uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3. Exemplos: genisteína e coumestrol.

Por sua vez, os compostos fenólicos não flavonoides incluem os ácidos fenólicos, as cumarinas, os taninos, os estilbenos e os lignanos. Dentro deste grupo, os ácidos fenólicos são os mais abundantes na natureza, estando presentes em frutos e vegetais. Estes compostos estão divididos em dois grupos: os derivados do ácido hidroxicinâmico e os derivados do ácido hidroxibenzóico (Magalhães, 2009).

O marmelo é fonte de vários compostos fenólicos com efeito promotor de saúde. Além disso, tal como apresentado na **Tabela 2**, o perfil fenólico qualitativo de diferentes partes de marmelo (casca, polpa e sementes) é distinto. De Tommasi et al. (1996) descreveram teores de fenóis totais na faixa dos 12–268 mg/kg na polpa e entre 243–1738 mg/kg na casca. A polpa apresentou seis compostos, nomeadamente ácido 3-*O*-cafeoilquínico, ácido 4-*O*-cafeoilquínico, ácido 5-*O*-cafeoilquínico, ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico, 3-*O*-galactosilquercetina e quercetina-3-*O*-rutinosido (ou rutina). Na casca foi possível detetar treze compostos fenólicos, incluindo os seis detetados na polpa, mais 3-*O*-glucosilkaempferol, 3-*O*-rutinosilkaempferol e cinco compostos parcialmente

identificados, tais como um glicosídeo de kaempferol, dois glicosídeos de quercetina acilados com ácido *p*-cumárico e dois glicosídeos de kaempferol também acilados com ácido *p*-cumárico. As sementes apresentaram um perfil fenólico característico, composto pelos mesmos ácidos cafeoilquínicos e por diversas flavonas *C*-glicosiladas, incluindo leucenina-2, vicenina-2, estelarina-2, isoschaftósido, schaftósido, 6-*C*-pentosil-8-*C*-glucosil crisoeriol e 6-*C*-glucosil-8-*C*-pentosil crisoeriol. As antocianinas cianidina-3-glucosídeo e a cianidina-3,5-diglucosídeo também já foram detetadas na casca de marmelo. A rutina e o ácido 5-*O*-cafeoilquínico têm sido descritos como os principais compostos fenólicos da casca de marmelo (**Tabela 2**) e os ácidos 3-*O*-cafeoilquínico e 5-*O*-cafeoilquínico os maioritários da polpa (Oliveira et al., 2008; Stojanović et al., 2017).

**Tabela 2.** Compostos fenólicos descritos na polpa, casca e semente de marmelo.

Polpa	Casca	Semente
Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico (46%)	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico (28%)	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico (9%)
Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico (5%)	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico (2%)	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico (10%)
Ácido 5- <i>O</i> -dicafeoilquínico (43%)	Ácido 5- <i>O</i> -dicafeoilquínico (26%)	Ácido 5- <i>O</i> -dicafeoilquínico (20%)
Ácido 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico (4%)	Ácido 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico (1%)	Leucenina-2 (4%)
Rutina (2%)	3- <i>O</i> -Galactosilquercetina (7%)	Vicenina-2 (5%)
	Rutina (25%)	Estelarina-2 (17%)
	Glicosídeo de kaempferol (2%)	Isoschaftósido (6%)
	3- <i>O</i> -Glucosilkaempferol (1%)	Schaftósido (4%)
	3- <i>O</i> -Rutinosilkaempferol (2%)	6- <i>C</i> -Pentosil-8- <i>C</i> -glucosil crisoeriol (8%)
	Glicosídeos de quercetina acilados com ácido <i>p</i> -cumárico (3%)	6- <i>C</i> -Gglucosil-8- <i>C</i> -pentosil crisoeriol (6%)
	Glicosídeos de kaempferol acilados com ácido <i>p</i> -cumárico (2%)	Ácido 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico (11%)

Adaptado de Silva et al. (2004).

#### 2.4.4. Composição em fibra alimentar

O conceito de fibra alimentar ou dietética é complexo e tem vindo a evoluir ao longo do tempo. Este abrange uma vasta gama de compostos com efeitos diferentes para quem a consome, sendo a base de ligação entre estes compostos o facto de não serem digeríveis pelo organismo humano. Atualmente, é usada a seguinte definição: “A fibra alimentar é constituída pelas partes edíveis de vegetais ou glúcidos análogos resistentes à digestão e absorção no intestino delgado humano, com fermentação completa ou parcial no intestino

grosso. A fibra alimentar inclui polissacáridos, oligossacáridos, lenhina e substâncias vegetais associadas. A fibra alimentar promove efeitos fisiológicos benéficos tais como efeito laxante, e/ou diminuição do colesterol e/ou redução de glucose no sangue" (Food and Nutrition Board Institute of Medicine, 2001). Os constituintes da fibra alimentar são, na sua maior parte, substâncias de origem vegetal, predominantemente oriundas da parede celular e, em menor parte, alguns polissacarídeos provenientes de outras partes das plantas ou sintetizados por microrganismos.

As fibras alimentares podem ser classificadas de acordo com a sua estrutura, a sua solubilidade em água e em relação ao seu grau de utilização (fermentação bacteriana) no organismo humano (Mendes, 2011). As cadeias laterais ou ramificações da estrutura básica, quando presentes, são responsáveis pela solubilidade das fibras alimentares, que podem ser divididas em fibras alimentares solúveis e insolúveis, conjunto que constitui a fibra alimentar total. Esta classificação é muito útil para a compreensão das propriedades fisiológicas das fibras alimentares. Além disso, estabelece uma divisão simples entre aquelas que têm efeitos principalmente na absorção de glucose e de lípidos no intestino delgado, as quais são facilmente fermentadas por bactérias no cólon (fibras solúveis), e aquelas que não são fermentadas, ou o são incompletamente, tendo efeitos mais pronunciados nos hábitos intestinais (fibras insolúveis) (Tate & Lyle, 2008).

As fibras solúveis representam aproximadamente um terço das fibras alimentares totais ingeridas com uma dieta típica ou comum. Entre elas estão as pectinas, algumas hemiceluloses ou pentosanas, amido resistente e mucilagens. A maior parte das fibras solúveis são polímeros de cadeia longa, que se dissolvem ou dispersam formando um gel na presença de água, sendo também conhecidos como hidrocoloides. Estes são utilizados como estabilizantes de emulsões, na suspensão de partículas, no controlo de cristalização, no encapsulamento e na formação de biofilmes (Santos, 2013). As fibras insolúveis incluem componentes estruturais da parede celular das plantas, como a lenhina, a celulose e algumas hemiceluloses. Estas têm como principal função regular o trânsito intestinal e proteger o intestino, pelo facto de absorverem água. As principais fontes deste tipo de fibras são os farelos de cereais, os grãos integrais de cereais, os frutos secos, as frutas quando ingeridas com casca e hortícolas (Santos, 2013).

No caso do marmelo, um estudo anterior mostrou que a casca seca deste fruto contém cerca de 20,2 g/100 g de fibra alimentar, enquanto que resíduos resultantes de extrações sólido-líquido podem conter cerca de 35–37 g/100 g (Othman, 2021). Também

se sabe que o marmelo é rico em pectina e que, no caso da casca, os teores de ácido galacturónico podem representar 78% deste heteropolissacarídeo (Dammak et al., 2020).

## **2.5. Propriedades bioativas e funcionais do marmelo**

O marmelo é constituído por compostos promotores da saúde devido ao seu potencial antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, antiulcerativo, anticarcinogénico, antialérgico, hipoglicémico e hepatoprotetor (Fattouch et al., 2007; Oliveira et al., 2008; Shinomiya et al., 2009; Silva et al., 2004; Stojanović et al., 2017; Szychowski et al., 2018; Zhang et al., 2021). Por outro lado, é conhecido na medicina popular por tratar a diarreia, refluxo gástrico, doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, bronquite e dor de garganta (Zhang et al., 2021). Também já foi descrito que o marmelo e a folha do marmeleiro possuem efeitos promissores no tratamento de doenças cardiovasculares, hemorroidas, asma brônquica, tosse e contra hemólise (Alesiani et al., 2010; Ashraf et al., 2016). As folhas são usadas como sedativo, os frutos para tratar a disenteria e as sementes como emulsificante faríngeo e agente emoliente na preparação de loções fixadoras de cabelo (Hemmati et al., 2012); as sementes também são usadas como laxante e anti-inflamatório (Tamri et al., 2014). A mucilagem das sementes é usada para tratar doenças respiratórias, principalmente em crianças, e para aplicar em queimaduras leves exteriores (Tamri et al., 2014). Em Portugal, decocções ou infusões de folhas de marmeleiro são usados na medicina tradicional devido às suas propriedades sedativas, antipiréticas, antidiarreicas e antitússicas (Oliveira et al., 2008, 2012).

Os compostos fenólicos são considerados importantes constituintes da dieta humana com potencial quimiopreventivo. Os mecanismos sugeridos para explicar a sua atividade antitumoral incluem a supressão da ativação do fator nuclear-kB (NF-kB), do fator de transcrição da proteína ativadora-1 (AP-1), da proteína quinase ativada por mitogénio (MAPKs), de proteínas quinases (PKs) e de vias mediadas pelo recetor do fator de crescimento (GFR), bem como paragem do ciclo celular e indução de apoptose, efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios e supressão da angiogénese (Carvalho et al., 2010).

Antioxidantes como os compostos fenólicos, o ácido ascórbico e outros ácidos orgânicos, a vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) e os carotenoides atuam como agentes redutores dadores de hidrogénio e têm capacidade de eliminar radicais livres e espécies reativas de oxigénio, inibindo assim os mecanismos e danos oxidativos que levam a

patologias degenerativas, levando à sobrevivência das células (Alesiani et al., 2010; Fattouch et al., 2007; Oliveira et al., 2008). Os compostos fenólicos, entre os quais os ácidos cafeoilquínicos, têm sido relatados como os principais responsáveis pela bioatividade do marmelo e pelos benefícios para a saúde associados ao seu consumo (Silva et al., 2000, 2004). Como referido anteriormente, o marmelo é fonte de ácidos fenólicos e flavonoides considerados fortes antioxidantes (Hemmati et al., 2012).

## **2.6. Propriedades funcionais das fibras**

O papel da fibra alimentar na prevenção de problemas de saúde e na redução dos níveis de colesterol tem recebido muita atenção na literatura científica e popular. Estudos têm evidenciado a existência de relações entre a ingestão de fibra dietética e a diminuição do risco de doenças crônicas, cancro, doenças cardiovasculares e diabetes tipo II (Phillips et al., 2019). Como discutido anteriormente, os seus benefícios para o intestino também são amplamente reconhecidos e úteis para a saúde e bem-estar. Além disso, as fibras podem ser usadas como aditivos funcionais em alimentos. Os subprodutos do processamento de matérias-primas de origem vegetal, como a casca de marmelo, representam uma perda de recursos naturais com custos económicos sempre que descartados sem qualquer utilização. No entanto, a sua transformação em produtos de valor acrescentado, como fibra alimentar, pode contribuir para diminuir este problema e reciclar biomassa e nutrientes de elevado valor. Diferentes fontes de fibra podem ter diferentes efeitos metabólicos e fisiológicos. Além do mais, a fibra de uma mesma origem pode ter uma funcionalidade diferente em função do processo de obtenção (de Escalada Pla et al., 2010).

## **2.7. Métodos de extração de compostos de elevado valor**

O processo de extração é uma etapa crucial no isolamento de compostos bioativos de elevado valor, como os compostos fenólicos. Alguns métodos de extração apresentam uma série de desvantagens, visto poderem requerer tempos de extração muito longos e uma quantidade significativa de solvente (tal como a extração por Soxhlet), podendo ainda levar à degradação dos compostos de interesse (Albuquerque et al., 2017). Entre os métodos convencionais, a maceração dinâmica surge como uma técnica amplamente utilizada e consiste na agitação da amostra vegetal com um determinado solvente durante

um período de tempo e a uma temperatura pré-determinados. O processo é simples, mas pode requerer tempos relativamente longos e temperaturas elevadas (He et al., 2016). No entanto, os processos de extração podem ser afetados por vários fatores ou variáveis independentes cujos ótimos de processamento não devem ser generalizados para todas as matrizes devido às diferenças composicionais intrínsecas e aos compostos alvo que se pretendem extrair. Portanto, é imprescindível realizar uma otimização para determinar as condições que maximizam os rendimentos de extração (enquanto variáveis dependentes ou de resposta), minimizando a degradação dos compostos alvo, bem como o consumo de solvente e energia. Com o processo otimizado, a passagem da escala de bancada para uma escala industrial será mais facilmente conseguida.

A otimização deste tipo de processos pode ser feita através do estudo das variáveis independentes de forma individual. No entanto, estas podem interagir entre si e induzir efeitos sinérgicos ou antagónicos, ou seja, podem potenciar ou afetar negativamente a recuperação de compostos (Albuquerque et al., 2020). Neste sentido, a metodologia de RSM surge como uma ferramenta de otimização muito útil, a qual permite reduzir o número de ensaios experimentais necessários para a otimização e, conseqüentemente, o consumo de reagentes e labor. Ao contrário das abordagens de um fator de cada vez, esta metodologia permite avaliar a existência de efeitos de interação entre as variáveis independentes usadas no desenho experimental (Caleja et al., 2017). Esta ferramenta baseia-se na obtenção de equações polinomiais que descrevem o efeito das variáveis independentes numa dada resposta, com capacidade de prover as melhores condições de processamento e o valor de resposta associado.

## **2.8. Ensaios para avaliação de propriedades bioativas**

Atualmente existe em grande número de ensaios *in vitro* que permitem avaliar a atividade antioxidante de produtos naturais. Entre eles, o ensaio de inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA) é um ensaio que permite avaliar a capacidade antioxidante de um determinado extrato ou composto, simulando as condições biológicas. Este baseia-se na monitorização da percentagem de hemólise produzida por um gerador de radicais livres em eritrócitos de origem ovina, na presença de um extrato antioxidante, ao longo de um determinado período de incubação. O ensaio OxHLIA apresenta maior robustez face a outros métodos químicos de avaliação da atividade antioxidante, tais como ensaios de poder redutor e

sequestro de radicais livres, dado que se utiliza células vivas e, como tal, os resultados são mais significativos do ponto de vista biológico (Takebayashi et al., 2010).

O ensaio de inibição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como o malondialdeído (MDA, um produto final da peroxidação lipídica), baseia-se na indução da peroxidação lipídica *in vitro* por agentes oxidantes na presença de um determinado extrato ou composto (Oakes & Van Der Kraak, 2003). A capacidade de inibir a reação é avaliada pela monitorização de complexos corados de rosa resultantes da oxidação de ácidos gordos insaturados presentes no tecido cerebral de porco.

Os ensaios de atividade antimicrobiana baseiam-se em expor culturas de bactérias controladas a um determinado extrato ou composto para avaliar a sua capacidade de inibir o crescimento microbiano ou matar o inóculo original. Desta forma, os resultados podem ser expressos em concentração mínima inibitória (MIC) e em concentração mínima bactericida (MBC) ou fungicida (MFC) (Helena et al., 2013). Um dos ensaios mais utilizado para determinação da MIC é o método de microdiluição sucessiva. A utilização das microplacas torna possível fazer diluições seriadas nos poços consecutivos. Uma das principais desvantagens do método de microdiluição é o facto de alguns microrganismos aderirem à base do poço ou, em outros casos, permanecem em suspensão. Por outro lado, possui imensas vantagens, pois permite a avaliação de um grande número de amostras e requer pequenas quantidades e/ou volumes de extrato ou composto, o que é extremamente importante se a amostra for escassa, como é o caso geralmente de produtos naturais. Esta metodologia é económica, possibilita o uso de mais de uma substância-teste, bem como diferentes microrganismos num mesmo ensaio, além de apresentar resultados reprodutíveis (Langfield et al., 2004; Lorenzón et al., 2012; Ostrosky et al., 2008).



### 3. OBJETIVOS

Atualmente há uma grande quantidade de casca de marmelo que não é devidamente valorizada pela indústria. Porém, estudos anteriores evidenciaram que este subproduto poderá ser um bom candidato ao desenvolvimento de ingredientes alimentares funcionais. Como tal, esta dissertação de mestrado teve como PRINCIPAL OBJETIVO otimizar a produção simultânea de ingredientes bioativos (enriquecidos em compostos fenólicos e ácido málico) e concentrados de fibra alimentar a partir de casca de marmelo, bem como avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos ingredientes bioativos. Para alcançar este objetivo, foram propostos os seguintes OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Implementação de um desenho de composto central rotativo (DCCR) acoplado a RSM, combinando as variáveis independentes tempo (1–119 min), temperatura (25–94 °C) e proporção de etanol (0–100%) numa matriz de 20 execuções;
- ✓ Obtenção de extratos bioativos (EB) e de extratos concentrados em fibra (ECF) de acordo com a matriz do DCCR implementado e determinação dos rendimentos de extração por métodos gravimétricos;
- ✓ Identificação e quantificação de compostos fenólicos, ácidos orgânicos e açúcares livres nos extratos bioativos por diferentes técnicas cromatográficas;
- ✓ Avaliação da cor e dos teores de fibra alimentar dos extratos concentrados de fibra usando um colorímetro e um método enzimático-gravimétrico, respetivamente;
- ✓ Desenvolvimento de modelos polinomiais por ajuste dos dados experimentais a uma equação quadrática e determinação as condições ótimas de extração por RSM;
- ✓ Validação experimentalmente de modelos preditivos para extratos bioativos;
- ✓ Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* dos extratos bioativos obtidos nas condições ótimas para comprovação do efeito conservante.

Pretende-se assim contribuir para uma melhor eficiência no uso de recursos e circularidade no setor agroalimentar, seguindo uma abordagem de “desperdício zero”, e desenvolver novos ingredientes de base natural para aplicação em alimentos. Esta abordagem está alinhada com os objetivos do desenvolvimento sustentável da Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU, 2015). Além disso, também se pretende que os resultados venham a ter um impacto na indústria e na sociedade em geral, através da produção e consumo de géneros alimentícios formulados com os ingredientes naturais desenvolvidos no âmbito deste trabalho a partir de casca de marmelo.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Padrões e reagentes

Os solventes etanol absoluto (99,9%), ácido trifluoroacético e acetonitrilo (99,9%) de grau de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram fornecidos pela Fisher Scientific (Lisboa, Portugal). Os padrões de compostos fenólicos (ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico, catequina e quercetina-3-*O*-glicósido), com um grau de pureza  $\geq 96\%$ , foram adquiridos na Extrasynthese (Genay Cedex, França). Os padrões de ácidos orgânicos (ácido oxálico, ácido quínico e ácido málico) e açúcares (D(-)-frutose, D(+)-glucose e D(+)-sucarose), o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), o kit para análise de fibra alimentar total, o ácido ascórbico, o dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropionamida) (AAPH), o sulfato de ferro, o tampão fosfato-salino (PBS), o ácido tiobarbitúrico, o ácido tricloroacético, a sulforodamina B, o ácido fórmico e a estreptomicina foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). O cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) foi adquirido na PanReac AppliChem (Barcelona, Espanha). A ampicilina, o bifonazol e o cetoconazol foram adquiridos na Panfarma (Belgrade, Serbia), Srbolek (Belgrade, Serbia) e Zorkapharma (Šabac, Serbia), respetivamente. A estreptomicina foi adquirida na Gibco Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, Califórnia, EUA). O Mueller-Hinton agar foi adquirido na BioLab® (Budapeste, Hungria). A água utilizada nos ensaios foi tratada com um sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, EUA). Os restantes reagentes e solventes usados neste trabalho eram de grau analítico e foram obtidos de fornecedores comuns.

### 4.2. Material vegetal

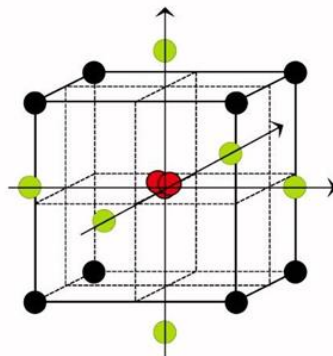
As amostras de casca de marmelo (*Cydonia oblonga* Mill.) foram fornecidas por agricultores locais da região de Bragança, Portugal, em outubro de 2020. As amostras de casca foram liofilizadas (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA), reduzidas a um pó fino recorrendo a uma trituradora de cozinha e um crivo de vinte malhas, e seguidamente homogeneizado para obter uma amostra representativa que foi mantida sob vácuo a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  no escuro até posterior utilização.

### 4.3. Desenho experimental para otimização da extração

Para otimizar o processo de extração de compostos de elevado valor a partir da casca de marmelo, foi implementado um desenho de composto central rotativo (DCCR) por combinação das variáveis independentes  $X_1$  (tempo,  $t$ , 1–119 min),  $X_2$  (temperatura,  $T$ , 26–94 °C) e  $X_3$  (proporção de etanol,  $S$ , 0–100%,  $v/v$ ) em cinco níveis, conforme mostrado na **Tabela 3**. O software Design-Expert, Versão 11 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, EUA) foi usado para gerar os 20 pontos do desenho experimental através da inserção dos valores de alfa (1,68) de cada variável. Assim, a matriz do DCCR contou com 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais ou estrela (para permitir rotatividade e garantir uma variação de previsão constante em todos os pontos equidistantes do centro do desenho) e 6 repetições do ponto central (**Figura 5**).

**Tabela 3.** Valores codificados e decodificados das variáveis independentes do DCCR implementado para otimizar os processos de extração.

Variáveis independentes	Símbolos	Unidades	Níveis das variáveis				
			-1.68	-1	0	1	+1.68
Tempo	$t$	min	1	25	60	95	119
Temperatura	$T$	°C	26	40	60	80	94
Proporção de etanol	$S$	%, $v/v$	0	20	50	80	100



**Figura 5.** Representação dos vinte pontos do DCCR no espaço experimental, incluindo oito pontos fatoriais (●), seis pontos axiais ou estrela (●) e um ponto central replicado seis vezes (●).

As três variáveis independentes a cinco níveis foram codificadas e decodificadas usando a **Equação 1**:

$$X_c = (x_n - x_0)/\Delta x_n \text{ and } X_n = (x_0 + \Delta x_n) \times /\Delta x_c$$

**Equação 1.** Equação utilizada na codificação e decodificação das três variáveis independentes, em que  $x_n$  e  $x_c$  são os valores naturais ( $n$ ) e codificados ( $c$ ) no centro do desenho experimental,  $x_0$  é o valor inicial e  $\Delta x_n$  é o incremento de  $x_n$  por unidade de  $x_c$ .

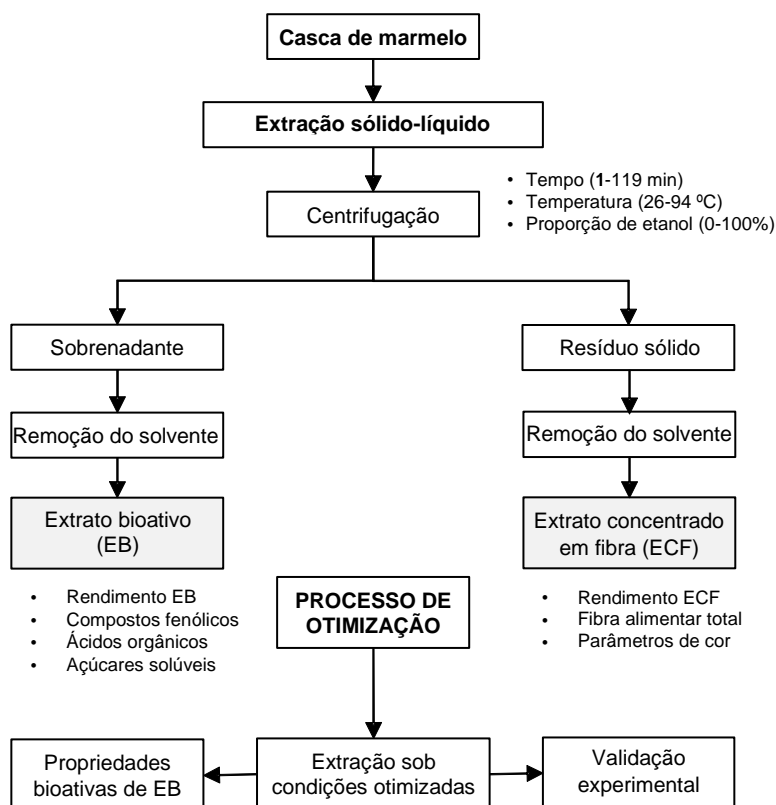
Os valores naturais e codificados são apresentados na **Tabela 3**. Para cada ponto (*run*) do desenho, as respostas experimentais resultaram de valores médios ( $n = 6$ ).

#### 4.4. Método de extração

As extrações sólido-líquido foram realizadas em banho-maria termostático em recipientes de vidro selados para evitar a evaporação do solvente. O etanol foi selecionado para este estudo por ser um solvente autorizado para utilização durante o processamento de géneros alimentícios e de componentes ou ingredientes alimentares (Directiva 2009/32/CE, 2010). As amostras (1,8 g) foram misturadas com 30 mL de solvente (0–100% etanol) e processadas por agitação a diferentes níveis de tempo (1–119 min) e temperatura (26–94 °C) de acordo com o desenho experimental (**Tabela 3**). A relação sólido/líquido foi mantida em 60 g/L. Após extração, as misturas foram centrifugadas (Multifuge X1R, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) a 4000×g durante 10 min e os sobrenadantes e resíduos sólidos foram coletados de forma independente; os sobrenadantes foram concentrados sob pressão reduzida para remover o etanol e seguidamente liofilizados, enquanto que os resíduos sólidos, correspondendo aos extratos concentrados, de fibra foram secos numa estufa a 60 °C. Além disso, as 20 extrações foram executadas de forma aleatória para minimizar o efeito de possível variabilidade nas respostas.

#### 4.5. Determinação das respostas experimentais

Conforme representado no fluxograma da **Figura 6**, as amostras de EB foram analisadas quanto ao rendimento de extração e teor de compostos fenólicos, ácidos orgânicos e açúcares solúveis, enquanto que os ECF foram caracterizados quanto ao rendimento, teores de fibra alimentar total e parâmetros de cor.



**Figura 6.** Fluxograma dos passos envolvidos na obtenção de extratos bioativos (EB) e extratos concentrados em fibra (ECF) a partir de casca de marmelo e as respostas experimentais usadas no processo de otimização RSM.

#### 4.5.1. Rendimento de extração

Um método gravimétrico foi usado para determinar o rendimento de extração (% , *m/m*) dos EB e ECF. Para EB, 4 mL de sobrenadante de cada extração (obtido em 4.4) foram colocados em cadinhos de porcelana, previamente calcinados e pesados, e o solvente foi evaporado numa estufa ventilada a 105 °C durante cerca de 24 h até peso constante. Para ECF, o rendimento foi determinado por secagem do resíduo sólido remanescente após cada extração numa estufa a 60 °C até peso constante. Depois, foram novamente pesados e o rendimento (g/100 g) foi calculado de acordo através **Equação A1** (em anexo).

#### 4.5.2. Compostos fenólicos

As amostras de EB foram redissolvidas a 6 mg/mL em etanol a 20%, filtradas através de filtros de seringa com poros de 0,22 µm e analisadas seguindo os procedimentos descritos por Bessada et al. (2016). Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de ultra performance (UPLC, Dionex Ultimate 3000 UPLC, Thermo Scientific, San Jose, CA,

EUA) equipado com uma bomba quaternária, um injetor automático e um compartimento de coluna termostatizados a 35 °C, um detetor de matriz de díodos (DAD) e também com um espectrómetro de massa (MS) Ion Trap Linear LTQ XL (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA) com uma fonte de ionização por eletropulverização (ESI). A separação cromatográfica foi realizada numa coluna Spherisorb S3 ODS-2 C18 (4,6 mm × 150 mm, 3 µm; Waters, Milford, MA, EUA) de fase reversa da Waters, utilizando os eluentes água com 0,1% (v/v) de ácido fórmico (A) e acetonitrilo (B). O gradiente de eluição foi o seguinte: 15% B (5 min), 15% B a 20% B (5 min), 20-25% B (10 min), 25-35% B (10 min), 35-50% B (10 min), e reequilíbrio da coluna, usando um fluxo constante de 0,5 mL/min. A deteção DAD foi feita a comprimentos de onda de 280 e 370 nm e a deteção MS foi efetuada em modo negativo, usando azoto (50 psi) como gás de arraste.

Os compostos fenólicos detetados foram identificados por comparação do tempo de retenção (Rt) e dos espetros de ultravioleta-visível (UV-Vis) e de massa dos picos das amostras com os obtidos com os padrões comerciais ou por comparação dos dados cromatográficos com os da literatura. Para a análise quantitativa, foram usadas as curvas de calibração ( $r^2 \geq 0,999$ ) construídas para os padrões disponíveis: ácido clorogénico ( $y = 168823x - 161172$ ; limite de deteção (LOD) = 0,20 µg/mL; limite de quantificação (LOQ) = 0,68 µg/mL), ácido *p*-cumárico ( $y = 301950x + 6966,7$ ; LOD = 0,68 µg/mL; LOQ = 1,61 µg/mL), catequina ( $y = 84950x - 23200$ ; LOD = 0,17 µg/mL; LOQ = 0,68 µg/mL) e quercetina-3-*O*-glicosídeo ( $y = 34843x - 160173$ ; LOD = 0,21 µg/mL; LOQ = 0,71 µg/mL). Os dados foram processados com o software Xcalibur (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA) e os resultados expressos em mg/g de EB; assim, os mesmos compostos foram expressos em equivalentes do seu constituinte básico ou composto similar.

#### 4.5.3. Ácidos orgânicos

As amostras de EB foram redissolvidas a 6 mg/mL em ácido metafosfórico, filtradas através de filtros de nylon de 0,2 µm e analisados por cromatografia líquida ultrarrápida acoplado a um detetor de arranjo de fotodíodos (UFLC-PDA) (Shimadzu 20A series, Quioto, Japão) de acordo com o procedimento descrito anteriormente por Pereira et al. (2014). A separação cromatográfica foi realizada em fase reversa numa coluna C18 (5 mm, 250 mm × 4,6 mm; Phenomenex, Torrance, CA, EUA) termostatizada a 35 °C. A

eluição foi feita em modo isocrático com uma solução de ácido sulfúrico (3,6 mM) a um fluxo constante de 0,8 mL/min.

Os compostos foram identificação comparando o  $R_t$  e o espectro UV-Vis dos picos das amostras com os de padrões comerciais e quantificados comparando as áreas dos picos, registados a 215 nm, com as seguintes curvas de calibração ( $r^2 \geq 0,994$ ) construídas com os padrões de cada composto: ácido oxálico ( $y = 9 \times 10^6 x + 377,946$ ; LOD = 12,55  $\mu\text{g/mL}$ ; LOQ = 41,82  $\mu\text{g/mL}$ ), ácido quínico ( $y = 612,327x + 16,563$ ; LOD = 24,18  $\mu\text{g/mL}$ ; LOQ = 80,61  $\mu\text{g/mL}$ ) e ácido málico ( $y = 912,441x + 92,665$ ; LOD = 35,76  $\mu\text{g/mL}$ ; LOQ = 119,18  $\mu\text{g/mL}$ ). Os dados foram processados com o software LabSolutions Multi LC-PDA (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) e os resultados expressos g/100 g de EB.

#### 4.5.4. Açúcares solúveis

As amostras de EB foram redissolvidas a 6 mg/mL em água destilada, filtradas através de filtros de nylon de 0,2  $\mu\text{m}$  e analisados num sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detetor de índice de refração (HPLC-RI; Knauer, Smartline system 1000, Berlim, Alemanha), com uma bomba quaternária, um sistema de degaseificação (Smartline manager 5000) e um injetor automático (AS-2057, Jasco, Easton, MD, EUA). Como previamente descrito por Dias et al. (2015), a separação cromatográfica foi realizada numa coluna Eurospher 100-5  $\text{NH}_2$  (4,6 mm  $\times$  250 mm, 5 mm, Knauer) a 35 °C (Grace 7971 R). A eluição foi isocrática, utilizando acetonitrilo/água desionizada (70:30, v/v) como fase móvel, a um fluxo constante 1 mL/min.

Os açúcares detetados foram identificados comparando os tempos de retenção dos picos das amostras com padrões comerciais e quantificados usando retas de calibração ( $r^2 \geq 0,999$ ) construídas com os seguintes padrões: frutose ( $y = 1,04x$ ; LOD = 0,05 mg/mL; LOQ = 0,18 mg/mL), glucose ( $y = 0,935x$ ; LOD = 0,08 mg/mL; LOQ = 0,25 mg/mL) e sacarose ( $y = 0,977x$ ; LOD = 0,06 mg/mL; LOQ = 0,21 mg/mL). Os dados foram processados com o software Clarity 2,4 (DataApex, Podohradská, República Checa) e os resultados expressos em g/100 g de EB.

#### 4.5.5. Fibra alimentar total

O conteúdo de fibra alimentar nas amostras de ECF foi determinado por um método enzimático-gravimétrico, seguindo os procedimentos da Associação Oficial dos Químicos Analíticos (AOAC 985.29) (AOAC, 2019). Resumidamente, as amostras de ECF (250 mg) foram gelatinizadas com 100 µL de  $\alpha$ -amilase termoestável (incubação a pH 6 durante 15 min a 95 °C) e hidrolisadas com 100 µL de protease (incubação a pH 7,5 durante 30 min a 60 °C) e 100 µL de amiloglucosidase (incubação a pH 4,5 durante 30 min a 60 °C) para remover proteínas e amido. Após processos de precipitação com etanol durante a noite e de filtração, os resíduos foram lavados sequencialmente com água destilada, etanol a 78%, etanol a 95% e acetona e, em seguida, filtrados sob vácuo, secos em estufa a 105 °C e finalmente pesados. Os teores de proteína não digerida (AOAC 920.152) e cinzas (AOAC 940.26) foram determinados por quantificação do nitrogénio ou por incineração, respetivamente, para a correção do valor de fibra alimentar (**Equação A2**, em anexo). Os resultados foram expressos em g/100 g de ECF.

O conteúdo em nitrogénio foi determinado pelo método de macro-Kjeldahl. Para isso, alíquotas dos resíduos da análise de fibra alimentar foram digeridos (Block Digester System, Velp Scientifica, MB, Itália) a 400 °C durante 70 min na presença de ácido sulfúrico e um catalisador (pastilhas Kjetabs, com 5 g de sulfato de potássio e 0,5 g de sulfato de cobre II), o que resultou na mineralização do nitrogénio em sulfato de amónio. Após arrefecimento da amostra, a acidez foi neutralizada pela adição de água destilada e esta transferiu-se para o equipamento de destilação e titulação automática (Pro-Nitro A, JP Selecta, Barcelona, Espanha), onde se adicionou hidróxido de sódio para converter o sal de amónio a amoníaco, o qual foi destilado e recolhido em meio ácido para ser titulado. O conteúdo de nitrogénio (mg) medido pelo equipamento foi multiplicado pelo fator de conversão 6,25 para obter o valor de proteína.

Para a determinação do conteúdo em cinzas, alíquotas dos resíduos da análise de fibra alimentar foram colocadas em cadinhos de porcelana, previamente calcinados e pesados, e incineradas numa mufla a 525 °C durante 5 h. Após arrefecimento num exsiccador, a amostra foi pesada e o conteúdo em cinzas determinado por diferença de peso de acordo com a **Equação A3** (em anexo).

#### 4.5.6. Parâmetros de cor dos extratos concentrados em fibra

A cor dos ECF foi medida com um colorímetro portátil (modelo CR-400; Konica Minolta Sensing Inc., Japão) previamente calibrado contra um azulejo branco padrão. Os valores dos parâmetros  $L^*$  (luminosidade, de (0) preto ao (100) branco),  $a^*$  (cromaticidade do (-) verde ao (+) vermelho) e  $b^*$  (cromaticidade do (-) azul ao (+) amarelo) foram registados usando o iluminar  $C$  e uma abertura do diafragma de 8 mm (Antonio et al., 2016). Seguidamente, para representar visualmente as cores registadas, os valores CIELAB foram convertidos em valores RGB (*Red* – vermelho, *Green* – verde, *Blue* – azul) usando um conversor de cor online (<https://www.easyrgb.com/en/convert.php>).

#### 4.6. Modelação dos processos de extração e análise estatística dos modelos

As variáveis dependentes ou de resposta consideradas para a otimização do processo de extração foram agrupadas em três grupos relacionados com:

- i) o extrato bioativo (EB), nomeadamente rendimento de EB (%  $m/m$ ), compostos fenólicos (mg/g EB), ácidos fenólicos (mg/g EB), flavan-3-óis (mg/g EB) e ácido málico (mg/g EB);
- ii) outros constituintes do EB, nomeadamente ácido quínico (g/100 g EB), ácidos orgânicos totais (g/100 g EB), frutose (g/100 g EB), glucose (g/100 g EB), açúcares solúveis totais (g/100 g EB);
- iii) o extrato concentrado em fibra (ECF), nomeadamente rendimento de ECF (%  $m/m$ ), fibra alimentar (g/100 g ECF), luminosidade ( $L^*$ ), cromaticidade do verde ao vermelho ( $a^*$ ) e cromaticidade do azul ao amarelo ( $b^*$ ).

Os modelos de superfície de resposta foram ajustados por meio do cálculo dos mínimos quadrados utilizando uma equação polinomial de segunda ordem (**Equação 2**).

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$$

**Equação 2.** Equação polinomial de segunda ordem, em que  $Y$  corresponde à variável dependente a ser modelada,  $X$  define as variáveis independentes,  $b_0$  é o coeficiente constante,  $b_1$ ,  $b_2$  e  $b_3$  são os coeficientes dos termos lineares,  $b_{11}$ ,  $b_{22}$  e  $b_{33}$  são os coeficientes dos termos quadráticos e  $b_{12}$ ,  $b_{13}$  e  $b_{23}$  são os coeficientes dos termos de interação.

Os procedimentos de ajuste, a estimativa de coeficientes e a análises estatística foram realizadas com o software Design-Expert, versão 11 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, EUA). A análise de variância unidirecional (ANOVA) foi utilizada para avaliar a significância dos modelos e dos termos que os constituem, bem como a falta de ajuste (*lack-of-fit*). As diferenças estatisticamente significativas foram avaliadas com intervalo de confiança de 95%, sendo que apenas os termos significativos ou aqueles necessários para a hierarquia foram utilizados na construção dos modelos.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ), o coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{adj}$ ) e a precisão adequada, interpretados como a proporção de variabilidade da variável dependente explicada pelo modelo (Albuquerque et al., 2017), foram utilizados para avaliar a adequação das equações polinomiais às respostas. Os valores de  $R^2$  e  $R^2_{adj}$  são os principais indicadores da significância dos modelos; o  $R^2$  representa a variação em torno da média explicada pelo modelo, enquanto o  $R^2_{adj}$  resulta de um ajuste que considera o número de variáveis e os termos significativos do modelo. Portanto, valores próximos de 1 ilustram uma concordância entre os dados teóricos e os experimentais. Para a precisão adequada, que é uma medida da relação sinal-ruído, o valor deverá ser superior a 4 (Iberahim et al., 2019). A falta de ajuste mede a qualidade do ajuste do modelo aos dados experimentais, ou seja, este teste indica se o modelo descreve adequadamente a relação funcional entre as variáveis independentes e a resposta obtida. Desta forma, a falta de ajuste deve ser não significativa ( $p > 0,05$ ). O software Design-Expert também foi usado para gerar os gráficos de superfície de resposta.

#### **4.7. Validação experimental dos modelos e avaliação das bioatividades dos extratos bioativos obtidos sob as condições otimizadas**

Extratos adicionais de casca de marmelo foram obtidos sob as configurações ideais estabelecidas para compostos fenólicos, ácido málico e ambos os constituintes bioativos. Os procedimentos de extração e análise foram realizados conforme descrito nas seções anteriores e os resultados quantitativos foram utilizados para validação experimental dos modelos teóricos, por comparação dos resultados obtidos experimentalmente com os previstos pelos modelos. Os rendimentos de EB e ECF e os parâmetros de cor do ECF também foram avaliados, assim como a atividade antioxidante e antimicrobiana dos EB. Os ensaios foram realizados em triplicado e cada amostra foi medida três vezes ( $n = 9$ ).

#### 4.7.1. Atividade antioxidante

A capacidade dos extratos inibirem a hemólise oxidativa e a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como o MDA, foi avaliada *in vitro* conforme descrito abaixo. O Trolox e os aditivos alimentares ascorbato de cálcio (E302) e metabissulfito de sódio (E223) foram testados como controlos positivos.

##### 4.7.1.1. Capacidade de inibição da peroxidação lipídica pelo ensaio TBARS

O ensaio TBARS foi realizado seguindo o procedimento descrito por Pinela et al. (2012). Inicialmente, foi preparada uma mistura homogênea de tecido cerebral de porco (obtido num matadouro local) em tampão tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto (tris-HCl, 20 mM, pH 7,4) numa proporção de 1:2 (*m/m*) e o sobrenadante foi recolhido após centrifugada a 3000×*g* durante 10 min. Alíquotas de 100 µL desta solução foram imediatamente incubadas com 200 µL de solução de extrato (0,016–8 mg/mL), Trolox (3,125–100 µg/mL), E302 (0,01–2,56 mg/mL) ou E223 (0,01–2,56 mg/mL) mais 100 µL de sulfato de ferro (FeSO<sub>4</sub>; 10 µM) e 100 µL de ácido ascórbico (0,1 mM) a 37 °C durante 1 h. Em seguida, foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético (28% *m/v*) e 380 µL de ácido tiobarbitúrico (2%, *m/v*) e as misturas aquecidas em banho maria a 80 °C durante 20 min. Após centrifugação a 3000×*g* durante 10 min, a intensidade da cor dos complexos MDA-ácido tiobarbitúrico formados foi monitorada por medição da absorvância a 532 nm num (Specord 200 spectrophotometer, Analytik Jena, Jena, Alemanha). Os resultados foram expressos como a concentração de extrato (µg/mL) responsável por metade do efeito máximo ou 50% da inibição da peroxidação lipídica (EC<sub>50</sub>), a qual foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de extrato (**Equação A4** em anexo).

##### 4.7.1.2. Capacidade de inibição da hemólise oxidativa pelo ensaio OxHLIA

O ensaio OxHLIA foi realizado seguindo o método descrito por Lockowandt et al. (2019), usando eritrócitos de sangue de ovelhas saudáveis, colhido por profissionais qualificados. Para o isolamento dos eritrócitos, a amostra de sangue foi centrifugada a 1000×*g* durante 5 min a 10 °C e o sobrenadante descartado. Os eritrócitos foram lavados, primeiro com uma solução de NaCl (150 mM) e depois três vezes com PBS (pH 7,4), com centrifugação e remoção do sobrenadante a cada lavagem (Evans et al., 2013). Posteriormente, foi

preparada uma solução de eritrócitos a 2,8% (v/v) com PBS. Numa microplaca de 48 poços de fundo plano, 200  $\mu$ L da suspensão de eritrócitos foram adicionados a 400  $\mu$ L quer da solução de extrato (0,125–4 mg/mL), Trolox (7,81–250  $\mu$ g/mL), E302 (0,01–2,56 mg/mL), E223 (0,01–2,56 mg/mL), PBS (controlo) ou água destilada (para hemólise completa). Após 10 min de pré-incubação da placa a 37 °C com agitação, foram adicionados 200  $\mu$ L de solução de AAPH (160 mM em PBS) e a densidade ótica foi medida a 690 nm a cada 10 min num leitor de microplacas (ELX800a, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA) até hemólise completa. Os resultados foram dados como a concentração de extrato ( $\mu$ g/mL) responsável por 50% da inibição da hemólise oxidativa (IC<sub>50</sub>) para intervalos de tempo  $\Delta t$  de 60 e 120 min, ou seja, os valores de Ht<sub>50</sub> obtidos a partir das curvas de hemólise com o software GraphPad Prism 6 (**Equação A5** em anexo) foram correlacionados com as respetivas concentrações de extrato (**Equação A6** em anexo), o que permitiu calcular a concentração necessária para proteger 50% da população de eritrócitos durante  $\Delta t$  de 60 e 120 min.

#### 4.7.2. Atividade antimicrobiana

Os extratos foram testados contra as bactérias Gram-positivo *Bacillus cereus* (isolado alimentar), *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632) e *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), as bactérias Gram-negativo *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter cloacae* (isolado clínico) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC 13311) e os micromicetas *Aspergillus fumigatus* (isolado humano), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Trichoderma viride* (IAM 5061), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839) e *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (isolado alimentar). Os microrganismos foram obtidos do Laboratório Micológico do Instituto de Investigação Biológica "Siniša Stanković" - Instituto Nacional da República da Sérvia, Universidade de Belgrado, Sérvia.

A atividade antimicrobiana foi avaliada seguindo protocolos previamente descritos por Soković & Van Griensven (2006) e Soković et al. (2010). Os extratos foram dissolvidos redissolvidos a 8 mg/mL em etanol a 30% e meio de cultura Mueller-Hinton (5:95, v/v). A cada um dos 96 poços da microplaca, foram adicionados 100  $\mu$ L de meio digerido de soja e, no primeiro poço de cada coluna, foram adicionados 40  $\mu$ L das soluções de extrato previamente preparadas, das quais foram feitas diluições sucessivas

até uma concentração de 0,5 mg/mL. As estirpes bacterianas e fúngicas foram preparadas com base na densidade ótica, medida por espectrofotometria (UV-120-01, SHIMADZU, Kyoto, Japão), e ajustada para 0,50 nm da escala de McFarland, correspondendo a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Seguidamente, 10  $\mu$ L desses inóculos foram adicionados a cada um dos poços (uma microplaca para cada espécie microbiana) e, após incubação, 40  $\mu$ L de corante INT (0,2 mg/mL) foram adicionados a cada poço e incubados novamente por 30 min. Este indicador assume uma cor rosa quando os microrganismos viáveis existem em solução e, como tal, o primeiro poço da série de diluição sucessiva dos extratos que apresenta essa coloração, indica que essa concentração de extrato, e qualquer outra inferior a esta, não é capaz de inibir o crescimento microbiano; portanto, o poço imediatamente anterior a este, que não apresentou coloração rosa, indicou a concentração mínima inibitória (MIC) de extrato (mg/mL). Dos poços sem coloração, uma alíquota foi transferida para uma placa de Petri com meio de cultura ágar e incubada a 37 °C durante 24 h, no caso de bactérias, e a 28 °C durante 72 h, no caso de fungos. Para cada espécie microbiana, a placa com a menor concentração de extrato que não apresentou crescimento microbiano indicou a MBC ou MFC de extrato (mg/mL).

Os aditivos alimentares benzoato de sódio (E211) e metabissulfito de potássio (E224), os antibióticos estreptomicina e ampicilina e os antifúngicos cetoconazol e bifonazol foram utilizados como controlos positivos, enquanto etanol a 30% foi usado como controlo negativo.

#### **4.7.3. Avaliação de diferenças estatística entre bioatividades de extratos**

Os resultados da atividade antioxidante foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças entre amostras foram avaliadas por uma Análise de Variância (ANOVA) e o cumprimento dos requisitos da ANOVA foi testado por meio dos testes de Shapiro-Wilk e de Levene para avaliar a normalidade e homogeneidade da variância dos dados, respetivamente. Os resultados foram comparados usando testes de comparação múltipla HSD de Tukey ou T2 de Tamhane, quando a homocedasticidade foi verificada ( $p > 0,05$ ) ou não ( $p < 0,05$ ), respetivamente. Além disso, foi realizada uma correlação de Pearson para avaliar possíveis correlações entre a atividade antioxidante e os constituintes do extrato (**Tabela A2** em anexo). Os testes estatísticos foram realizados com nível de significância de 5% usando o software SPSS<sup>®</sup> Statistics 28.0 (IBM Crop, EUA).



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Rendimento de extração e perfil químico

Um estudo anterior de Othman (2021) descreveu a casca de marmelo como uma fonte interessante de compostos de alto valor agregado e destacou o interesse em reciclar este subproduto em ingredientes bioativos e funcionais de grau alimentar. Portanto, após realização das vinte extrações de acordo com o desenho experimental implementado neste trabalho, os extratos de casca de marmelo obtidos com as diferentes condições foram caracterizados quanto aos constituintes bioativos e não bioativos a seguir descritos.

#### 5.1.1. Rendimento de extração

Conforme representado na **Tabela 4**, o rendimento de extração (massa de extrato por massa de amostra) variou de 34,47 a 67,09% (*m/m*) com as execuções 14 e 11 do projeto, as quais envolveram o nível mais alto ( $\alpha = +1,68$ ) de solvente e o menor nível ( $\alpha = -1,68$ ) de tempo, respectivamente, combinadas com níveis médios ( $\alpha = 0$ ) das outras duas variáveis independentes. O ponto central replicado rendeu  $51 \pm 1\%$  (*m/m*). Esta faixa de valores compreende os rendimentos de extração obtidos por Othman (2021) para extratos de casca de marmelo obtidos por uma maceração dinâmica de 2 h com etanol 80% ( $53 \pm 2\%$ , *m/m*) e uma extração de 5 min com água fervente ( $54 \pm 1\%$ , *m/m*).

#### 5.1.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos representam o maior grupo de antioxidantes presentes na dieta humana. Estudos epidemiológicos e meta-análises mostraram que dietas ricas em polifenóis oferecem proteção contra o desenvolvimento de doenças inflamatórias e neurodegenerativas e vários tipos de cancro (Cory et al., 2018; Santos-Buelga, 2021). A **Tabela 5** mostra os dados cromatográficos utilizados na tentativa de identificação dos compostos fenólicos detetados, nomeadamente o  $R_t$ , o  $\lambda_{\text{máx}}$  na região do UV-vis e o ião desprotonado ( $[M-H]^-$ ), e na **Figura 7** está representado o cromatograma representativo do perfil fenólico do extrato de casca de marmelo obtido com a 19ª execução do desenho experimental.

**Tabela 4.** Rendimento de extrato bioativo (EB) e teores de compostos fenólicos e ácido málico obtidos experimentalmente a partir de casca de marmelo com as 20 execuções da matriz DCCR.

Execução	Desenho experimental			Variáveis dependentes					
	<i>t</i> (min)	T (°C)	S (%)	$\eta$ EB (%)	CF (mg/g)	AF (mg/g)	F3O (mg/g)	FL (mg/g)	AM (%)
1	25	40	20	58,55	9,77	3,26	4,36	2,15	6,43
2	95	40	20	59,12	9,99	3,72	4,17	2,10	4,59
3	25	80	20	57,89	9,48	3,39	4,08	2,02	6,43
4	95	80	20	53,24	10,13	3,74	4,45	1,94	6,63
5	25	40	80	50,31	6,86	2,26	2,68	1,92	0,59
6	95	40	80	54,12	7,95	2,76	3,38	1,81	0,79
7	25	80	80	50,59	7,10	2,20	2,88	2,02	4,32
8	95	80	80	47,30	8,89	3,08	3,85	1,96	6,18
9	1	60	50	48,36	8,93	2,82	3,86	2,25	3,95
10	119	60	50	48,62	10,04	3,71	4,23	2,10	5,07
11	60	26	50	67,09	8,87	3,26	3,76	1,85	2,90
12	60	94	50	59,19	9,04	3,39	3,83	1,82	6,97
13	60	60	0	49,69	9,78	3,56	4,13	2,09	6,06
14	60	60	100	34,47	6,50	2,00	2,62	1,88	1,63
15	60	60	50	49,69	8,43	2,90	3,50	2,03	4,60
16	60	60	50	51,82	7,67	2,61	3,08	1,98	4,72
17	60	60	50	53,32	8,48	3,03	3,40	2,05	5,37
18	60	60	50	51,73	7,71	2,64	3,07	2,00	4,57
19	60	60	50	49,46	7,80	2,64	3,07	2,09	4,75
20	60	60	50	52,03	8,17	2,88	3,34	1,94	5,41

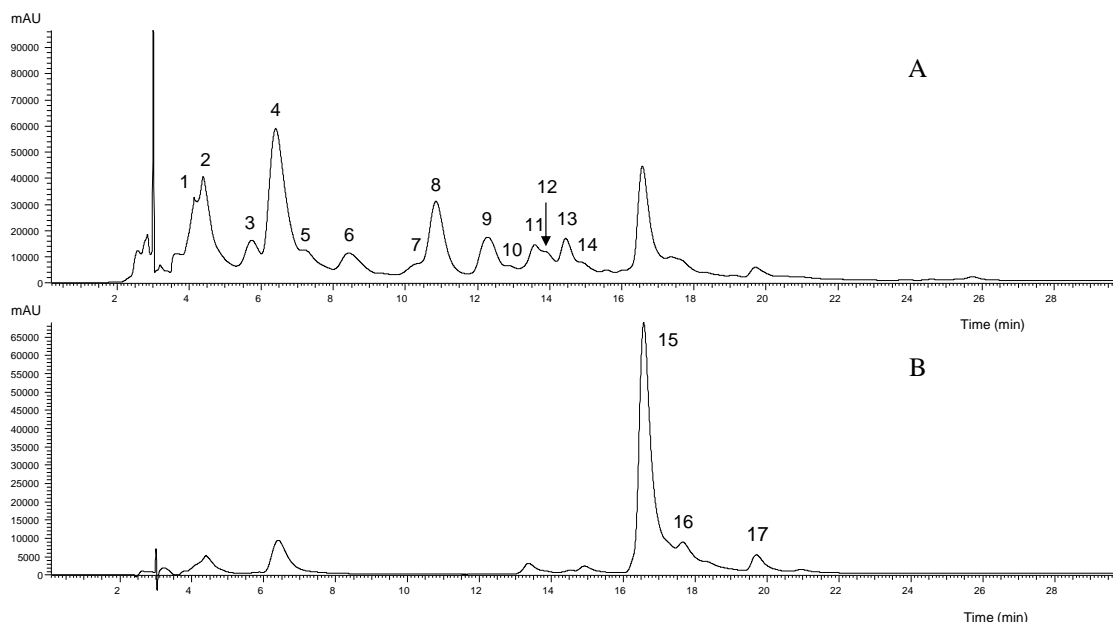
$\eta$ : rendimento; CF: compostos fenólicos; AF: ácidos fenólicos; F3O: flavan-3-óis; FL: flavonóis.

Foram identificados dezassete compostos (**Tabela 5**), incluindo cinco ácidos fenólicos (ácidos cafeoilquínicos), nove flavan-3-óis ((+)-catequina, dímeros, trímeros e tetrâmeros de (epi)catequina do tipo  $\beta$  e uma procianidina com ligação do tipo A) e dois flavonóis glicosilados (quercetina-*O*-desoxi-hexosil-hexóxido e kaempferol-*O*-desoxi-hexosil-hexóxido), o que concorda com o perfil descrito anteriormente por Othman (2021). Esses compostos também foram identificados nesta espécie por outros autores (Karar et al., 2014; Szychowski et al., 2018; Wojdyło et al., 2014; Zapata et al., 2019). Portanto, a identidade dos compostos fenólicos foi atribuída comparando os dados cromatográficos da **Tabela 5** com a literatura.

**Tabela 5.** Compostos fenólicos identificados nos EB de casca de marmelo. É apresentado o tempo de retenção (Rt), o comprimento de onda de absorção máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) na região do visível e o ião desprotonado de cada composto identificado.

Pico	Rt (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Tentativa de identificação
1 <sup>A</sup>	4,43	324	353	Ácido <i>cis</i> -3- <i>O</i> -cafeoilquínico
2 <sup>A</sup>	4,39	325	353	Ácido <i>trans</i> -3- <i>O</i> -cafeoilquínico
3 <sup>B</sup>	5,85	292	337	Ácido 3- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroilquínico
4 <sup>A</sup>	6,56	326	353	Ácido <i>cis</i> -5- <i>O</i> -cafeoilquínico
5 <sup>A</sup>	7,43	323	353	Ácido <i>trans</i> -5- <i>O</i> -cafeoilquínico
6 <sup>C</sup>	8,63	275	289	(+)-Catequina
7 <sup>*</sup>	10,47	311	337	Ácido 5- <i>O</i> -cumaroilquínico
8 <sup>C</sup>	11,08	276	865	Trímero de (epi)catequina do tipo $\beta$
9 <sup>C</sup>	12,52	272	1153	Tetrâmero de (epi)catequina do tipo $\beta$
10 <sup>*</sup>	13,83	298	577	Dímero de (epi)catequina do tipo $\beta$
11 <sup>C</sup>	14,16	280	1153	Tetrâmero de (epi)catequina do tipo $\beta$
12 <sup>*</sup>	14,57	271	865	Trímero de (epi)catequina do tipo $\beta$
13 <sup>C</sup>	15,10	275	865	Trímero de (epi)catequina do tipo $\beta$
14 <sup>*</sup>	15,76	275	865	Trímero de (epi)catequina do tipo $\beta$
15 <sup>D</sup>	16,70	355	609	Quercetina- <i>O</i> -desoxi-hexosil-hexósido
16 <sup>*</sup>	17,52	268	863	Procianidina com ligação do tipo A
17 <sup>D</sup>	19,86	357	593	Kaempferol- <i>O</i> -desoxi-hexosil-hexósido

Padrões usados na quantificação: <sup>A</sup> ácido clorogénico; <sup>B</sup> ácido *p*-cumárico; <sup>C</sup> catequina; e <sup>D</sup> quercetina-3-*O*-glucósido. \*Não foram usados no processo de otimização.



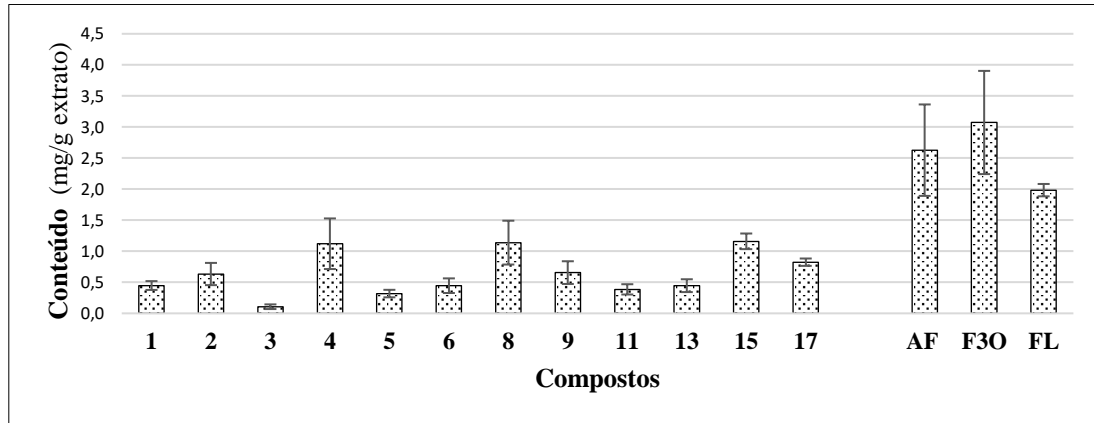
**Figura 7.** Cromatograma representativo do perfil fenólico do EB de casca de marmelo obtido com a 19<sup>a</sup> execução do desenho experimental, registado nos comprimentos de onda de (A) 280 nm e (B) 370 nm. A identificação dos picos é apresentada na **Tabela 5**.

O teor total de compostos fenólicos variou de 6,5 a 10,13 mg/g de EB com a 14<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> execuções (**Tabela 4**), que combinaram o nível mais alto ( $\alpha = +1,68$ ) de solvente com níveis médios ( $\alpha = 0$ ) de tempo e temperatura e níveis médios-altos ( $\alpha = +1$ ) destas duas variáveis independentes com um nível médio-baixo ( $\alpha = -1$ ) de solvente. Além dos teores mais levados de compostos fenólicos, estas duas execuções também estiveram associadas às concentrações mais altas/mais baixas de ácidos fenólicos e flavan-3-óis. Estas duas classes de compostos representaram cerca de 34,6 e 40,3% do conteúdo fenólico quantificado no ponto central replicado do desenho experimental, respetivamente, enquanto os flavonóis representaram 25,1% da fração fenólica destes extratos de casca de marmelo. Para estes fitoconstituintes, a 12<sup>a</sup> execução (ponto axial de temperatura mais alta) e a 9<sup>a</sup> execução (ponto axial de tempo mais baixo) deram origem às concentrações mais baixas (1,82 mg/g de extrato) e mais altas (2,25 mg/g de extrato), respetivamente, diferente do observado para as outras duas classes. No entanto, nem todos os compostos fenólicos identificados foram quantificados e considerados no cálculo dos teores totais dos grupos de compostos utilizados no processo de otimização, pois alguns deles (nomeadamente os compostos 7, 10, 12, 14 e 16) foram detetados em baixa concentração.

Em geral, os maiores rendimentos de EB estiveram associados a maiores taxas de recuperação de compostos fenólicos (**Tabela 4**), ácidos orgânicos e açúcares solúveis (**Tabela 6**) e ao uso de proporções de etanol baixas ou médias-baixas, dada a solubilidade em água desses constituintes.

Conforme ilustrado na **Figura 8**, os compostos 4 (ácido *cis*-5-*O*-cafeoilquínico), 8 (trímero de (epi)catequina do tipo  $\beta$ ) e 15 (quercetina-*O*-desoxi-hexosil-hexósido) foram aqueles detetados em concentrações mais altas ( $> 1,12$  mg/g de extrato) nos extratos de casca de marmelo obtidos com o ponto central replicado do desenho experimental. Os compostos 2 (ácido *trans*-3-*O*-cafeoilquínico), 9 (tetrâmero de (epi)catequina do tipo  $\beta$ ) e 17 (kaempferol-*O*-desoxi-hexosil-hexósido) surgiram em segundo lugar com níveis variando de 0,63 a 0,83 mg/g de extrato. Os compostos restantes estiveram em concentrações abaixo de 0,5 mg/g de extrato. Assim, os flavan-3-óis representaram aproximadamente 40% da fração fenólica, enquanto os ácidos fenólicos e os flavonóis glicosilados correspondem a 34,2 e 25,8%, respetivamente. Esta proporção é comparável à descrita por Othman (2021) para extratos de casca de marmelo obtidos por maceração hidroetanólica e extração com água fervente. No entanto, embora nem

todos os compostos detetados neste trabalho tenham sido quantificados, os níveis totais detetados nos extratos do ponto central foram superiores aos obtidos por Othman (2021).



**Figura 8.** Composição média relativa em compostos fenólicos individuais dos extratos de casca de marmelo obtidos com as réplicas do ponto central do desenho experimental. A identidade dos compostos é mostrada na **Tabela 5**. AF: ácidos fenólicos; F3O: flavan-3-óis; FL: flavonóis.

Outros estudos também descrevem os flavan-3-óis (ou procianidinas poliméricas) como a classe de compostos fenólicos predominante no marmelo, seguidos pelos ácidos hidroxicinâmicos e depois pelos flavonóis (Karar et al., 2014; Szychowski et al., 2018; Wojdyło et al., 2014). Por sua vez, os ácidos cafeoilquínicos são relevantes na fabricação de géneros alimentícios à base de marmelo, uma vez que esses ácidos fenólicos são substratos da atividade de catecolase da enzima polifenol oxidase e, portanto, podem influenciar os processos de oxidação e escurecimento. Por sua vez, o ácido 5-*O*-cafeoilquínico já foi descrito como sendo o ácido hidroxicinâmico mais proeminente no marmelo, principalmente na casca, que também se destacou pelos maiores teores de fenóis e flavonoides totais (Stojanović et al., 2017).

### 5.1.3. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos juntamente com os açúcares são os principais constituintes solúveis dos frutos maduros e têm um efeito importante no paladar e, portanto, na sua aceitação pelos consumidores. Os ácidos oxálico, quínico e málico foram detetados nos extratos de casca de marmelo. Entre estes, o ácido málico predominou em todas as amostras de EB, com teores chegando a 6,97 g/100 g de extrato com a 12ª execução (**Tabela 6**). Este ácido

dicarboxílico tem sido amplamente utilizado no setor alimentar, farmacêutico e agrícola e como precursor de produtos químicos industrialmente importantes (Dai et al., 2018). Atualmente, pode ser produzido por síntese química, conversão enzimática, fermentação biológica e biologicamente por estirpes microbianas. No entanto, a utilização de casca de marmelo e outros subprodutos agroalimentares ricos em ácido málico poderá ser uma opção, mas é necessário ter disponíveis técnicas de extração mais eficientes, ecológicas e economicamente viáveis. Segundo Othman (2021), uma porção de 100 g de pó seco de casca de marmelo contém  $7,2 \pm 0,2$  g de ácido málico.

**Tabela 6.** Teores de ácidos quínico, de ácido málico, de ácidos orgânicos totais e de açúcares solúveis obtidos experimentalmente da casca de marmelo com as 20 execuções da matriz DCCR.

Execução	Desenho experimental			Variáveis dependentes						
	<i>t</i> (min)	<i>T</i> (°C)	<i>S</i> (%)	AQ (%)	AM (%)	AOT (%)	Frutose (%)	Glucose (%)	Sacarose (%)	AST (%)
1	25	40	20	0,277	6,43	6,71	42,19	13,45	5,30	60,94
2	95	40	20	0,200	4,59	4,79	40,98	12,03	5,85	58,86
3	25	80	20	0,480	6,43	6,91	41,91	13,46	7,41	62,78
4	95	80	20	0,410	6,63	7,04	39,32	11,81	6,30	57,43
5	25	40	80	0,000	0,59	0,59	39,43	10,96	6,45	56,84
6	95	40	80	0,000	0,79	0,79	36,95	9,89	6,36	53,20
7	25	80	80	0,270	4,32	4,59	36,79	9,94	5,78	52,51
8	95	80	80	0,392	6,18	6,57	32,92	7,69	3,73	44,34
9	1	60	50	0,240	3,95	4,19	38,23	12,81	6,37	57,41
10	119	60	50	0,404	5,07	5,47	36,30	10,14	5,50	51,94
11	60	26	50	0,000	2,90	2,90	42,17	12,01	5,60	59,78
12	60	94	50	0,413	6,97	7,38	40,35	10,99	5,77	57,11
13	60	60	0	0,620	6,06	6,68	41,84	11,39	5,92	59,15
14	60	60	100	0,200	1,63	1,83	33,99	6,12	5,13	45,24
15	60	60	50	0,139	4,60	4,74	39,69	10,91	5,38	55,98
16	60	60	50	0,000	4,72	4,72	37,80	9,88	4,72	52,40
17	60	60	50	0,260	5,37	5,63	37,30	10,61	4,31	52,22
18	60	60	50	0,070	4,57	4,64	36,79	9,24	4,53	50,56
19	60	60	50	0,000	4,75	4,75	38,79	11,16	4,40	54,35
20	60	60	50	0,000	5,41	5,41	39,08	10,70	5,54	55,32

AQ: ácido quínico; AM: ácido málico; AOT: ácidos orgânicos totais; AST: açúcares solúveis totais.

Conforme representado na **Tabela 6**, o ácido málico representou mais de 95% do conteúdo total de ácidos orgânicos detetados no ponto central replicado, enquanto a

contribuição dos outros dois foi menor. O ácido quínico variou de 0,07 a 0,62 g/100 g de extrato e não foi identificado em seis extratos (**Tabela 6**). Por sua vez, o ácido oxálico foi detetado apenas em metade das execuções do desenho experimental, com teores variando de 0,01 a 0,73 g/100 g de extrato. A maior concentração foi obtida com a 15ª execução, que consistiu numa réplica do ponto central. Portanto, dada a escassez e a inconsistência dos dados experimentais, o ácido oxálico não foi considerado como variável de resposta para a otimização, nem para o cálculo dos teores de ácidos orgânicos totais.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Othman (2021) e Rodríguez-Guisado et al. (2009), os quais descrevem o ácido málico como o principal ácido orgânico na casca e no sumo de polpa de marmelo, respetivamente. Rodríguez-Guisado et al. (2009) descreveram o ácido tartárico como o segundo ácido orgânico mais abundante, mas não relataram o ácido quínico nas suas amostras. A prevalência de ácidos málico e quínico em casca e polpa de marmelo também foi observada por Silva, Andrade, Mendes, et al. (2002), autores que também identificaram os ácidos cítrico, ascórbico, xiquímico e fumárico. Além disso, a polpa de marmelo tendeu a apresentar mais ácidos orgânicos do que a casca. Estes resultados destacam o potencial subvalorizado deste subproduto.

#### 5.1.4. Açúcares solúveis

Os açúcares solúveis são constituintes abundantes em extratos de plantas. No entanto, a maioria dos estudos sobre otimização de métodos de extração tem sido focada em um ou num número restrito de compostos de alto de valor acrescentado (compostos fenólicos, carotenoides, etc.), enquanto a composição em açúcares é frequentemente negligenciada. Conforme apresentado na **Tabela 6**, os extratos de casca de marmelo continham frutose, glucose e sacarose. A frutose foi de longe o hidrato de carbono mais abundante (60-79%), seguido pela glucose (11-25%). Estes açúcares redutores, juntamente com a sacarose, representaram 44 a 62,8% da massa dos extratos EB obtidos. Além disso, os teores mais baixos de açúcares solúveis estiveram associados ao uso de maiores proporções de etanol, como verificado para a 14ª execução do desenho experimental que utilizou 100% de etanol. Este perfil de açúcar está de acordo com o descrito pela primeira vez por Othman (2021) para a casca de marmelo. Por outro lado, a polpa de marmelo encontra-se bem caracterizada quanto à sua composição em açúcares e outros hidratos de carbono. Szychowski et al. (2014) relataram a frutose como o principal açúcar solúvel na polpa de

amostras de marmelo de Espanha, seguida por glucose, sorbitol e vestígios de sacarose e maltose. Segundo Rodríguez-Guisado et al. (2009), frutose e glucose, e menores quantidades de sacarose e maltose, também podem ser quantificadas no sumo de marmelo. Apesar das diferenças quantitativas relatadas, os açúcares solúveis que predominam na polpa do marmelo também parecem estar presentes na sua casca.

Uma vez que as propriedades organoléticas dos aditivos e ingredientes alimentares podem afetar a aceitabilidade dos alimentos aos quais são adicionados, uma relação açúcar/ácido adequada deve ser considerada aquando da fabricação destes produtos, especialmente de origem vegetal. A relação açúcar/ácido dos diferentes extratos de casca de marmelo variou de 7 (com a 8ª execução) a 96 (com a 5ª execução). No entanto, este possível problema é geralmente superado pelo efeito de diluição causado pelas baixas doses comumente usadas nos alimentos. Ainda assim, é relevante considerar o consumo excessivo de açúcar, muitas vezes oculto em alimentos sob diferentes nomes, o que pode resultar em consequências negativas para a saúde humana. Portanto, o desenvolvimento de novos ingredientes alimentícios deve ter esta questão em consideração.

### **5.1.5. Extratos concentrados em fibra**

Hoje em dia, o setor agroalimentar gera milhões de toneladas de subprodutos vegetais ricos em fibra alimentar, um nutriente que pode ser recuperado e reinserido na cadeia de valor sob a forma de ingredientes alimentares (Galanakis, 2018). Esta poderá ser uma estratégia para promover a circularidade e a eficiência no uso de recursos naturais nos sistemas agroalimentares e promover uma maior ingestão de fibra alimentar, uma vez que uma parte considerável da população mundial não consome a dose diária recomendada de 25 g/dia (EFSA, 2014). A fibra alimentar é um “nutriente de interesse de saúde pública” que desempenha um papel importante na proteção contra doenças cardiovasculares, diabetes tipo II e alguns tipos de cancro, bem como na melhoria da saúde gastrointestinal e controlo do peso corporal (Brownlee et al., 2017; Cho et al., 2013). Desta forma, a abordagem metodológica deste trabalho de mestrado também promove a autossuficiência num contexto de desperdício zero (European commission: Directorate-General for Research and Innovation, 2017).

Após o processo de extração, os ECF foram recuperados e os rendimentos (massa de ECF por massa de matéria-prima) foram determinados, bem como os teores de fibra

alimentar e os parâmetros de cor (**Tabela 7**). Estes ECF poderão ser usados na fortificação de alimentos, mas a sua cor não deve afetar significativamente a aparência das formulações finais dos alimentos onde forem incorporados (Słowiński et al., 2021). Conforme mostrado na **Tabela 7**, o rendimento de ECF variou de 39,82 a 65,52% (*m/m*) com a 11ª e a 14ª execução do desenho, respetivamente, o que contrabalançou com o rendimento de EB (**Tabela 4**). Curiosamente, embora o uso de maiores proporções de etanol tenha estado relacionado com maiores rendimentos de ECF, estes resíduos apresentaram teores mais baixos de fibra alimentar (correspondendo a 52,46 a 65,55% dos ECF). Conforme discutido acima, a solubilidade dos açúcares livres foi menor nestes casos (em que se utilizou uma maior proporção de etanol) e, portanto, estes constituintes foram depositados durante a extração e centrifugação das misturas e coletados na fração correspondente aos ECF. Portanto, as menores proporções de fibra alimentar poderão ser explicadas por uma maior concentração em açúcares solúveis. Nesse sentido, a cor dos ECF pode ter variado dependendo do seu teor em açúcares, ou seja, quanto maior a percentagem de açúcar, mais claras (valores de  $L^*$  mais elevados) foram as amostras. Contrariamente, os ECF que contiveram mais fibra alimentar foram mais escuros, tais como os obtidos com a 3ª, 4ª e 12ª execução do desenho experimental (**Tabela 7**), que também resultaram de um processamento a altas temperaturas (80–94 °C) com 20–50% de etanol, condições que poderão ter causado algum tipo de reação de escurecimento (reação de Maillard).

Como representado na **Tabela 7**, enquanto os valores de  $L^*$  (34,09–70,62, do mais escuro ao mais claro) foram os que mais variaram, os de  $a^*$  ( $7,20 \pm 0,57$ , avermelhado) e  $b^*$  ( $20,37 \pm 2,62$ , amarelado) não variaram muito entre os vinte ECF obtidos.

Num trabalho prévio, Afifi et al. (2017) otimizaram a extração de fibra de sementes de tâmara (*Phoenix dactylifera* L.) seguindo uma abordagem metodológica semelhante à deste trabalho de mestrado. Os autores obtiveram rendimentos de ECF variando de 25,40 a 74,13% e teores de fibra de 22,35 a 79,37 g/100 g ECF ao processar as amostras a 45–65 °C durante 60–180 min com 25–75% de etanol. Curiosamente, os maiores rendimentos de ECF estiveram associados a menores teores de fibra bruta e vice-versa, o que está em concordância com os resultados do presente estudo. Em geral, os ECF obtidos a partir das sementes de tâmara foram mais escuros (valores de  $L^* > 48$ ) e avermelhados (valores  $a^*$  até 15,14) do que os da casca de marmelo (**Tabela 7**).

**Tabela 7.** Rendimento de extrato concentrado em fibra (ECF) e teores de fibra alimentar e parâmetros de cor obtidos experimentalmente a partir de casca de marmelo com as 20 execuções da matriz DCCR.

Execução	Desenho experimental			Variáveis dependentes					
	<i>t</i> (min)	<i>T</i> (°C)	<i>S</i> (%)	$\eta$ ECF (%)	Fibra (%)	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	Cor
1	25	40	20	43,66	57,84	59,66	7,48	21,22	
2	95	40	20	43,08	56,78	56,75	7,50	21,14	
3	25	80	20	42,11	64,44	37,24	6,85	13,97	
4	95	80	20	46,76	62,65	35,62	5,44	11,59	
5	25	40	80	51,90	57,27	55,88	7,20	20,91	
6	95	40	80	51,59	58,66	56,02	7,62	21,57	
7	25	80	80	49,41	57,73	59,51	7,92	21,57	
8	95	80	80	52,70	57,53	58,60	8,14	19,93	
9	1	60	50	51,64	57,21	58,35	6,52	21,61	
10	119	60	50	50,25	58,64	56,80	6,31	20,41	
11	60	26	50	39,82	59,83	51,76	6,81	22,31	
12	60	94	50	40,81	65,55	34,09	8,51	20,18	
13	60	60	0	49,18	55,33	55,90	7,43	21,07	
14	60	60	100	65,53	52,46	70,62	6,63	22,25	
15	60	60	50	50,31	59,95	54,21	7,49	21,30	
16	60	60	50	48,18	58,11	56,62	7,71	21,39	
17	60	60	50	46,68	59,35	56,42	6,91	20,79	
18	60	60	50	48,27	57,86	57,30	7,22	21,29	
19	60	60	50	50,54	57,94	58,92	7,05	21,40	
20	60	60	50	47,97	60,48	58,33	7,20	21,54	

$\eta$ : rendimento.

## 5.2. Ajuste e verificação estatística dos modelos

A metodologia RSM é uma ferramenta estatística adequada para modelar e otimizar processos de extração envolvendo uma ou mais variáveis de resposta e permite determinar condições ótimas de processamento com um número reduzido de ensaios experimentais, quando comparado com as abordagens convencionais que estudam um fator de cada vez e que não têm em consideração as possíveis interações entre variáveis (Aydar, 2018). Para desenvolver modelos teóricos capazes de prever e explicar os efeitos das variáveis independentes do processo numa determinada resposta, é necessário avaliar e assegurar a precisão do seu ajuste aos dados experimentais. Neste estudo, os valores de resposta apresentados na **Tabela 4**, **Tabela 6** e **Tabela 7** foram ajustados à **Equação 2** usando o software Design-Expert, mas apenas os parâmetros significativos ( $p < 0,05$ ) ou aqueles

necessários para a hierarquia foram usados no desenvolvimento dos modelos. Os coeficientes dos modelos teóricos obtidos para as variáveis de resposta são representadas na **Tabela 8** para o EB e seus constituintes bioativos, na **Tabela 9** para os outros constituintes do EB e na **Tabela 10** para o ECF e sua cor e teor de fibra alimentar, bem como os dados estatísticos do processo de modelação.

**Tabela 8.** Valores paramétricos estimados com a **Equação 2** e dados estatísticos do procedimento de ajuste dos modelos para o extrato bioativo (EB) e os seus constituintes.

Coefficientes	$\eta$ de EB	Compostos fenólicos	Ácidos fenólicos	Flavan-3-óis	Flavonóis	Ácido málico	
Intercepção	$b_0$	$50,89 \pm 0,65$	$8,05 \pm 0,11$	$2,77 \pm 0,05$	$3,28 \pm 0,07$	$2,01 \pm 0,01$	$4,83 \pm 0,10$
Linear	$b_1$	$-0,23 \pm 0,51^*$	$0,41 \pm 0,08$	$0,27 \pm 0,04$	$0,18 \pm 0,05$	$-0,04 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,09^*$
	$b_2$	$-1,93 \pm 0,51$	$0,10 \pm 0,08^*$	$0,05 \pm 0,04^*$	$0,06 \pm 0,05^*$	$-0,01 \pm 0,01^*$	$1,32 \pm 0,09$
	$b_3$	$3,81 \pm 0,51$	$-1,03 \pm 0,08$	$-0,47 \pm 0,04$	$-0,50 \pm 0,05$	$-0,06 \pm 0,01$	$-1,44 \pm 0,09$
Quadrático	$b_{11}$	ns	$0,48 \pm 0,08$	$0,15 \pm 0,04$	$0,27 \pm 0,05$	$0,06 \pm 0,01$	ns
	$b_{22}$	ns	$0,29 \pm 0,08$	$0,17 \pm 0,04$	$0,18 \pm 0,05$	$-0,06 \pm 0,01$	ns
	$b_{33}$	$-2,67 \pm 0,49$	ns	ns	ns	ns	$-0,35 \pm 0,09$
Interação	$b_{12}$	$-1,54 \pm 0,67$	ns	ns	ns	ns	$0,46 \pm 0,13$
	$b_{13}$	ns	$0,25 \pm 0,11$	ns	$0,19 \pm 0,07$	$0,07 \pm 0,01$	$0,46 \pm 0,13$
	$b_{23}$	ns	ns	ns	ns	ns	$0,89 \pm 0,13$
<b>Modelação estatística</b>							
Valor-F do modelo		34,18	38,18	49,38	26,43	27,81	71,54
Valor-p do modelo		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Falta de ajuste		0,2237	0,7923	0,8772	0,5805	0,9774	0,6356
$R^2$		0,9404	0,9463	0,9463	0,9242	0,9277	0,9766
$R^2_{adj}$		0,9129	0,9215	0,9272	0,8893	0,8944	0,9629
Precisão adequada		27,29	20,83	25,04	17,17	19,14	28,23
CV (%)		3,64	3,59	4,65	5,24	1,84	7,77

Os parâmetros subscritos 1,2 e 3 representam as variáveis independentes tempo, temperatura e proporção de etanol, respetivamente.  $R^2$ : coeficiente de determinação;  $R^2_{adj}$ : coeficiente de determinação ajustado; CV: coeficiente de variação (%); ns: não significativo;  $\eta$ : rendimento. \* Não significativo, mas necessário para a hierarquia do modelo.

Os valores paramétricos traduzem os efeitos lineares, quadráticos e de interação dos fatores tempo, temperatura e proporção de etanol e denotam a mudança esperada na resposta por unidade de mudança no valor de um fator, quando os fatores restantes são mantidos constantes. Quanto maior o valor do coeficiente (independentemente do sinal positivo ou negativo), maior a significância da variável. Para as interações, os efeitos sinérgicos entre os fatores são representados por um sinal positivo, enquanto um

antagonismo é traduzido por um sinal negativo (Pinela et al., 2019). Portanto, a complexidade das tendências de extração pode ser ilustrada pelos modelos desenvolvidos. A interceção corresponde ao valor médio esperado da variável resposta quando todos os fatores são iguais a zero ( $X = 0$ ), ou seja, a resposta média prevista no ponto central do domínio experimental. Assim, os valores de intercetação mostrados na **Tabela 8** para o EB e seus constituintes, na **Tabela 9** para outros constituintes do EB e na **Tabela 10** para o ECF e teor de fibra também mostram quais são os constituintes mais abundantes nos extratos de casca de marmelo obtidos com o ponto central do desenho experimental.

**Tabela 9.** Valores paramétricos estimados com a **Equação 2** e dados estatísticos do procedimento de ajuste dos modelos para o ácido quínico, os ácidos orgânicos totais e os açúcares solúveis.

Coeficientes		Ácido quínico	Ácidos orgânicos	Frutose	Glucose	Sacarose	Açúcares totais
Interceção	$b_0$	$0,11 \pm 0,03$	$4,99 \pm 0,10$	$37,89 \pm 0,27$	$10,40 \pm 0,24$	$4,81 \pm 0,17$	53,64
Linear	$b_1$	$0,02 \pm 0,02^*$	$0,19 \pm 0,09^*$	$-0,98 \pm 0,26$	$-0,80 \pm 0,16$	$-0,30 \pm 0,11$	$-2,08 \pm 0,48$
	$b_2$	$0,13 \pm 0,02$	$1,45 \pm 0,09$	$-0,85 \pm 0,26$	$-0,38 \pm 0,16$	$-0,03 \pm 0,11^*$	$-1,26 \pm 0,48$
	$b_3$	$-0,10 \pm 0,02$	$-1,54 \pm 0,09$	$-2,31 \pm 0,26$	$-1,55 \pm 0,16$	$-0,28 \pm 0,11$	$-4,14 \pm 0,48$
Quadrático	$b_{11}$	$0,07 \pm 0,02$	ns	ns	$0,49 \pm 0,15$	$0,42 \pm 0,11$	ns
	$b_{22}$	ns	ns	$1,10 \pm 0,25$	$0,50 \pm 0,15$	$0,34 \pm 0,11$	$1,87 \pm 0,63$
	$b_{33}$	$0,10 \pm 0,02$	$-0,25 \pm 0,09$	ns	$-0,47 \pm 0,15$	$0,28 \pm 0,11$	ns
Interação	$b_{12}$	ns	$0,48 \pm 0,13$	ns	ns	$-0,45 \pm 0,14$	ns
	$b_{13}$	ns	$0,50 \pm 0,13$	ns	ns	ns	ns
	$b_{23}$	ns	$0,93 \pm 0,13$	$-0,59 \pm 0,33$	ns	$-0,73 \pm 0,14$	$-1,70 \pm 0,63$
<b>Modelação estatística</b>							
Valor-F do modelo		13,41	78,28	26,02	23,56	9,51	24,81
Valor-p do modelo		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0006	<0,0001
Falta de ajuste		0,7304	0,7700	0,7938	0,8672	0,9139	0,7804
$R^2$		0,8273	0,9786	0,9028	0,9322	0,8737	0,8986
$R^2_{\text{adj}}$		0,7656	0,9661	0,8681	0,8923	0,7819	0,8624
Precisão adequada		13,26	29,44	16,47	18,53	12,89	16,32
CV (%)		42,25	7,58	2,45	5,39	7,43	3,23

Os parâmetros subscritos 1,2 e 3 representam as variáveis independentes tempo, temperatura e proporção de etanol, respetivamente.  $R^2$ : coeficiente de determinação;  $R^2_{\text{adj}}$ : coeficiente de determinação ajustado; CV: coeficiente de variação (%). ns: não significativo. \* Não significativo, mas necessário para a hierarquia do modelo.

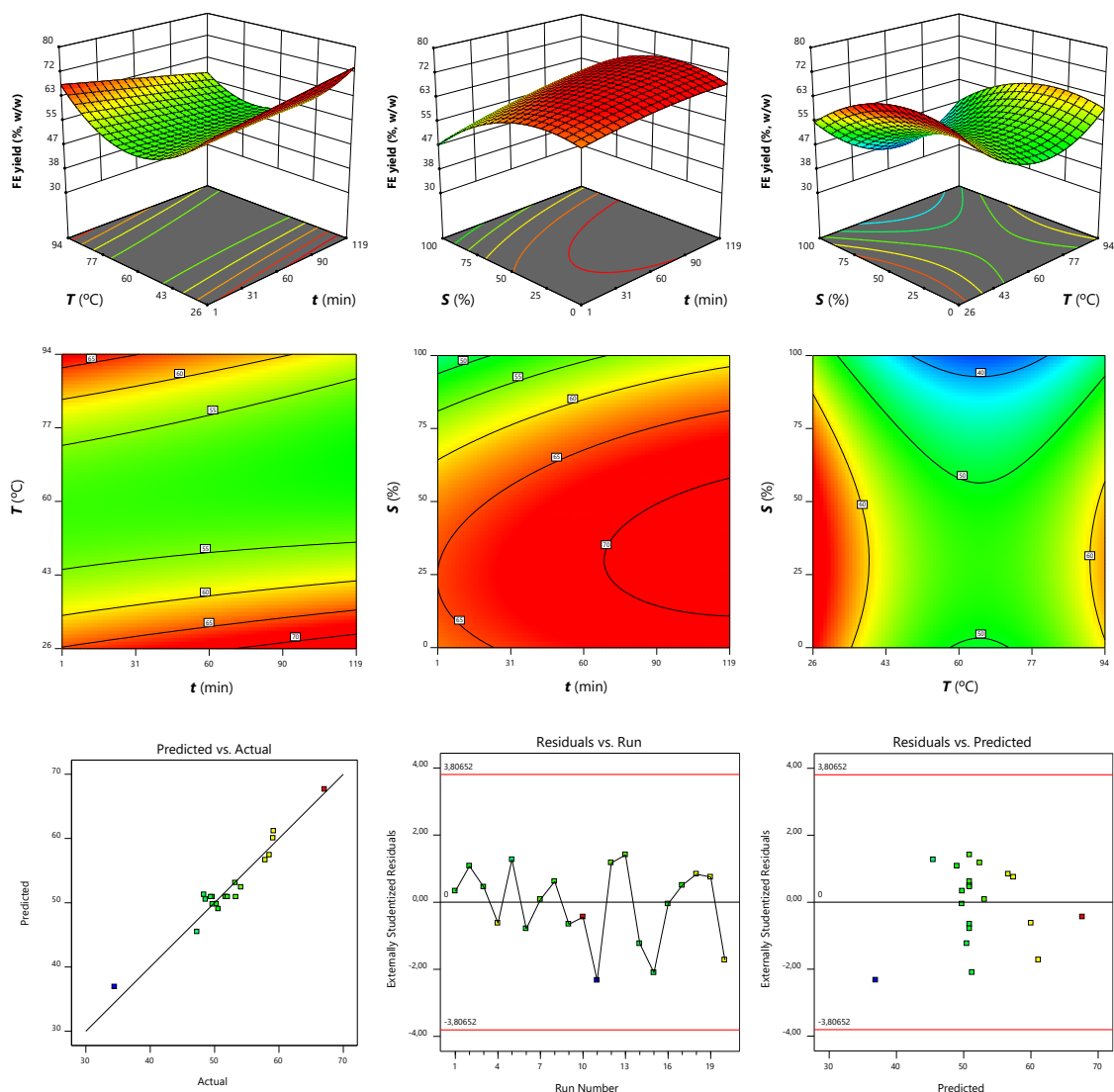
**Tabela 10.** Valores paramétricos estimados com a **Equação 2** e dados estatísticos do procedimento de ajuste dos modelos para os extratos concentrados em fibra (ECF) e a sua cor e conteúdo em fibra alimentar.

Coeficientes		$\eta$ ECF	Fibra	$L^*$	$a^*$
Interceção	$b_0$	49,05 $\pm$ 0,59	58,79 $\pm$ 0,36	56,86 $\pm$ 0,57	7,23 $\pm$ 0,14
Linear	$b_1$	0,35 $\pm$ 0,46*	ns	ns	-0,08 $\pm$ 0,11*
	$b_2$	0,18 $\pm$ 0,46*	1,57 $\pm$ 0,28	-4,91 $\pm$ 0,44	0,25 $\pm$ 0,11
	$b_3$	4,21 $\pm$ 0,46	-1,12 $\pm$ 0,28	4,80 $\pm$ 0,44	0,02 $\pm$ 0,11*
Quadrático	$b_{11}$	ns	ns	ns	-0,24 $\pm$ 0,11
	$b_{22}$	-3,40 $\pm$ 0,44	1,55 $\pm$ 0,27	-5,37 $\pm$ 0,43	ns
	$b_{33}$	3,63 $\pm$ 0,44	-1,56 $\pm$ 0,27	1,82 $\pm$ 0,43	ns
Interação	$b_{12}$	1,10 $\pm$ 0,59	ns	ns	ns
	$b_{13}$	ns	ns	ns	ns
	$b_{23}$	ns	-1,64 $\pm$ 0,37	6,22 $\pm$ 0,58	0,49 $\pm$ 0,14
<b>Modelação estatística</b>					
Valor-F do modelo		31,97	28,10	108,00	4,63
Valor- $p$ do modelo		<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0099
Falta de ajuste		0,3454	0,6731	0,5502	0,1723
$R^2$		0,9365	0,9094	0,9749	0,6913
$R^2_{\text{adj}}$		0,9072	0,8770	0,9657	0,5342
Precisão adequada		24,41	23,56	40,83	7,77
CV (%)		3,48	1,76	3,01	5,56

Os parâmetros subscritos 1,2 e 3 representam as variáveis independentes tempo, temperatura e proporção de etanol, respetivamente.  $R^2$ : coeficiente de determinação;  $R^2_{\text{adj}}$ : coeficiente de determinação ajustado; CV: coeficiente de variação (%); ns: não significativo;  $\eta$ : rendimento. \*Não significativo, mas necessário para a hierarquia do modelo.

Conforme apresentado na **Tabela 8**, as equações modelo desenvolvidas para o rendimento de EB, para as classes de compostos fenólicos e o ácido málico apresentaram um valor-F significativos ( $p < 0,001$ ) e uma falta de ajuste não significativa ( $p > 0,05$ ), o que indicou que os modelos construídos descrevem adequadamente o efeito das variáveis independentes nestas respostas alvo. Em todos os casos, os coeficientes  $R^2$  e  $R^2_{\text{adj}}$  foram superiores a 0,924 e 0,889, respetivamente, indicando que a variabilidade de cada resposta é explicada pelas variáveis independentes envolvidas no processo de extração. Esta boa concordância entre valores previstos e experimentais é representada na parte referente ao diagnóstico estatístico mostrada na parte inferior da **Figura 9** para o rendimento de EB, da **Figura 10** para os compostos fenólicos, da **Figura 12** para o ácido málico, da **Figura 13** para o rendimento de ECF e da **Figura 14** para o teor de fibra, onde também é mostrada a distribuição gráfica dos resíduos, descrevendo as tendências associadas às execuções,

para evidenciar que não existe nenhum tipo de padrão que possa influenciar a modelação. Além disso, a precisão adequada, que é uma medida da relação sinal-ruído, apresentou valores superiores a 17 (valores superiores a 4 indicam uma boa adequada dos modelos). O alto grau de precisão e confiabilidade também foi demonstrado pelos baixos valores do coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo, que é uma medida da variação residual dos dados em relação ao tamanho da média. Assim, os modelos desenvolvidos foram estatisticamente confiáveis para navegar o espaço do desenho e posterior otimização das condições de extração dos constituintes bioativos da casca de marmelo.



**Figura 9.** Gráficos de superfície de resposta com representações gráficas de dados estatísticos ilustrando os efeitos das variáveis independentes no rendimento de extrato bioativo (EB) obtido a partir da casca de marmelo. Em cada gráfico 3D, a variável excluída foi fixada no seu valor ótimo.

Neste estudo, também foram obtidas equações modelo significativas ( $p \leq 0,006$ ) para os outros constituintes do extrato, nomeadamente ácido quínico, ácidos orgânicos totais e os açúcares solúveis detetados (**Tabela 9**). Entre estes modelos, os construídos para o ácido quínico e a sacarose foram os que apresentaram um maior CV e um menor valor-F, respetivamente. No entanto, foram obtidos melhores resultados estatísticos para os modelos obtidos para os totais de ácidos orgânicos e açúcares solúveis. Assim, os níveis destes constituintes nos extratos poderão ser previstos aquando da maximização da extração dos compostos bioativos de interesse.

Os dados estatísticos dos modelos desenvolvidos para ECF, fibra bruta e alguns parâmetros de cor são apresentados na **Tabela 10**. O modelo desenvolvido para o parâmetro  $a^*$  (intensidade do vermelho) apresentou um valor-F de 4,63, enquanto para os demais modelos foi superior a 28. A precisão adequada e o CV também não foram tão bons. Ainda assim, todos os modelos foram significativos ( $p < 0,05$ ) e a falta de ajuste foi não significativa ( $p > 0,05$ ).

### 5.3. Efeitos das variáveis independentes e condições ótimas de extração

Os efeitos individuais e combinados das variáveis independentes tempo, temperatura e solvente nas diferentes variáveis de resposta, traduzidos pelos coeficientes dos modelos teóricos apresentados nas **Tabelas 9-11**, são discutidos abaixo. Para ilustrar visualmente as tendências de extração, foram gerados gráficos 3D e 2D, nos quais o fator ou fatores omitidos foram fixados no seu valor ótimo individual. Para a otimização numérica, para determinar as condições experimentais que atendem ao objetivo desejado (maximização dos rendimentos), as três variáveis independentes foram mantidas dentro da gama experimental (**Tabela 3**) e cada resposta alvo foi “maximizada”, mantendo o erro padrão “dentro do intervalo”.

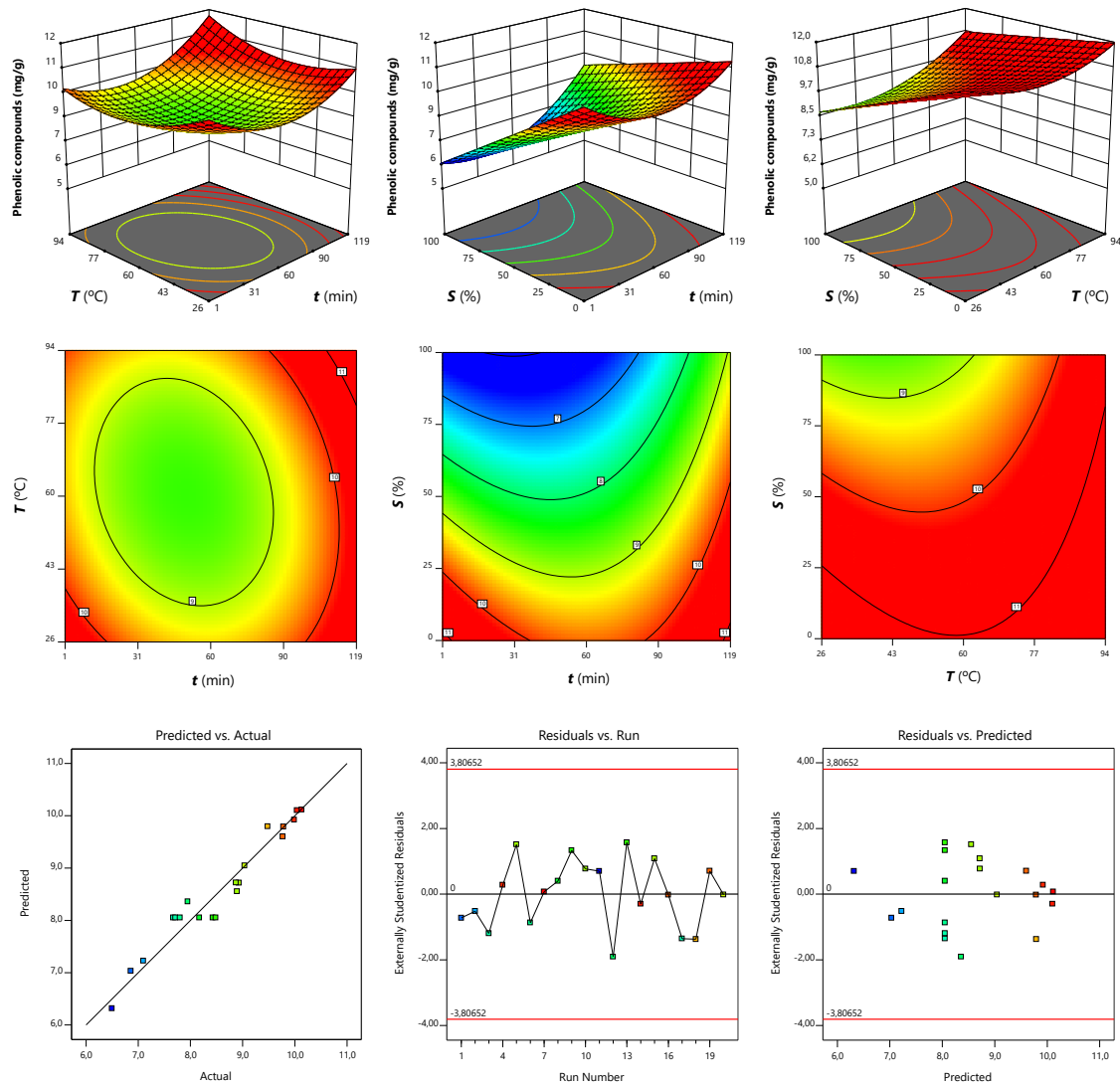
#### 5.3.1. Efeitos no rendimento de extração

Tal como representado na **Tabela 8**, a proporção de etanol foi a variável independente que mais afetou o rendimento de EB, por meio de efeitos lineares positivos (3,81) e quadráticos negativos (-2,67). A temperatura surgiu em segundo lugar com um efeito linear negativo (-1,98) e interagiu negativamente com o tempo (-1,54), variável que não

foi significativa ( $p < 0,05$ ), mas necessária para a hierarquia do modelo. Estas tendências de extração estão representadas visualmente na **Figura 9** e na **Figura A1** em anexo, onde se pode observar que proporções de etanol e temperaturas mais baixas favorecem o rendimento de EB, resultado que pode ser justificado pela maior taxa de recuperação de compostos hidrossolúveis, como açúcares e ácidos orgânicos, entre outros constituintes da casca do marmelo como a pectina. Também é interessante mencionar que, devido à interação tempo e temperatura, foram preferíveis tempos de extração mais longos ao aplicar temperaturas baixas e tempos mais curtos ao usar temperaturas altas. Assim, o maior rendimento de EB de  $69 \pm 2\%$  ( $m/m$ ) poderá ser obtido processando a casca de marmelo a  $26,7\text{ °C}$  durante  $64,4\text{ min}$  com  $33,4\%$  de etanol (**Tabela A1** em anexo).

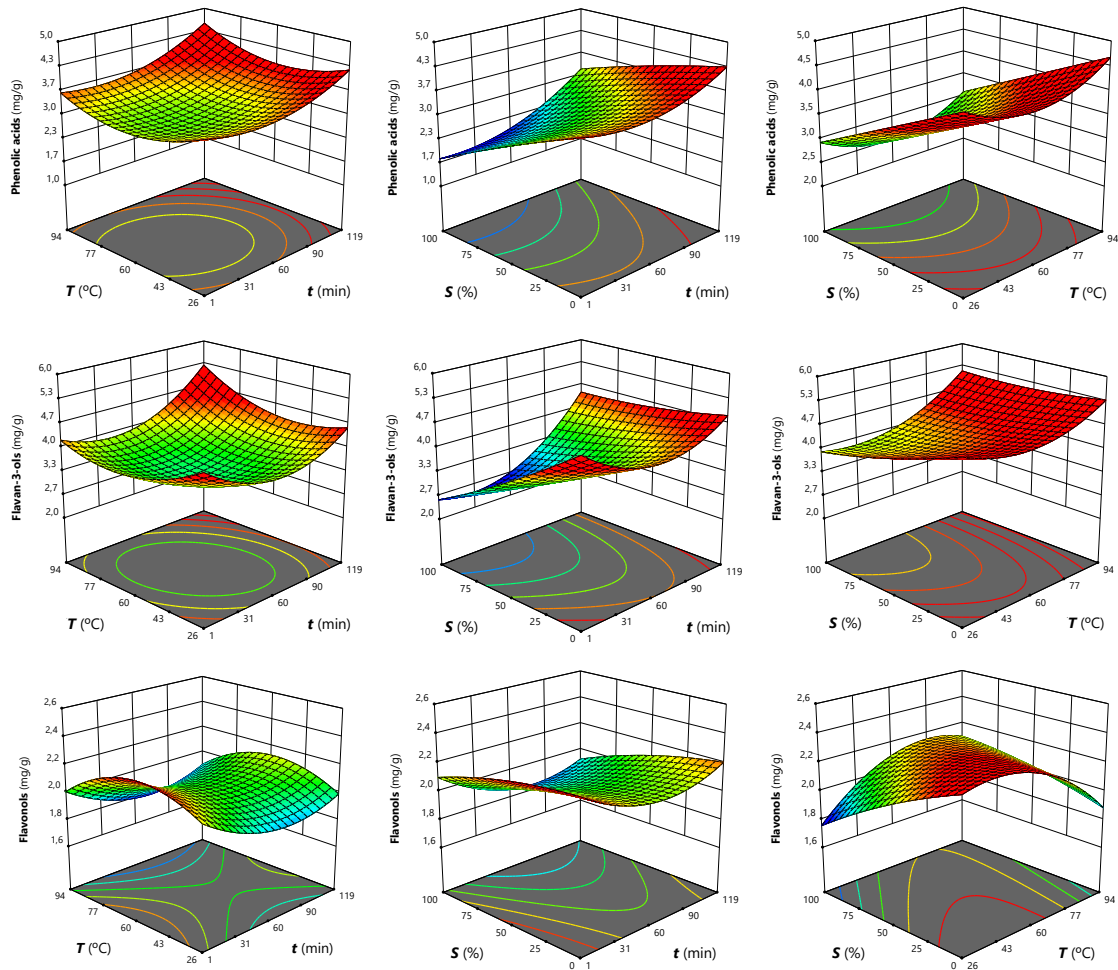
### 5.3.2. Efeitos nos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos quantificados no EB da casca de marmelo foram agrupados em ácidos fenólicos, flavan-3-óis e flavonóis (**Tabela 5**) e os dados experimentais (**Tabela 4**) foram ajustados à **Equação 2** para obter os modelos preditivos, cujos coeficientes estão apresentados na **Tabela 9**. A proporção de etanol afetou a recuperação dos compostos fenólicos através de efeitos lineares negativos ( $-1,03$ ), conforme verificado para as três classes fenólicas que constituem este grupo de compostos bioativos e também para o rendimento de EB. Os efeitos quadráticos de temperatura e tempo de extração também foram significativos e esta última variável interagiu positivamente com o solvente. Conforme mostrado nos gráficos de resposta da **Figura 10** e da **Figura A1** em anexo, poderá ser estabelecido mais do que um ponto ótimo devido aos efeitos das variáveis independentes já mencionados. Enquanto que a extração dos compostos fenólicos foi favorecida por proporções de etanol mais baixas, tanto tempos mais longos ou mais curtos e temperaturas mais altas ou mais baixas pareceram causar incrementos nos valores de resposta. Portanto, as condições que maximizam a recuperação de compostos fenólicos para o valor máximo de  $10,6 \pm 0,2\text{ mg/g}$  EB envolveram  $64,2\text{ min}$  de processamento a  $88,0\text{ °C}$  com  $0\%$  de etanol (apenas água). Além disso, também foram calculadas as condições que maximizam a extração dentro do possível, mas que minimizam os valores de tempo e temperatura. Neste caso,  $9,6 \pm 0,2\text{ mg/g}$  EB estiveram associados a  $8,5\text{ min}$  de extração a  $34,9\text{ °C}$  com  $39,8\%$  de etanol, condições que reduzem em aproximadamente  $87\%$  e  $60\%$  o tempo e a temperatura, respetivamente, com uma perda de compostos fenólicos de apenas  $9,4\%$ .



**Figura 10.** Gráficos de superfície de resposta com representações gráfica de dados estatísticos ilustrando os efeitos das variáveis independentes na extração de compostos fenólicos da casca de marmelo. Em cada gráfico 3D, a variável excluída foi fixada no seu valor ótimo.

Por outro lado, foi interessante averiguar se as diferentes classes de compostos fenólicos foram afetadas pelas variáveis do processo da mesma forma que o total de compostos fenólicos. Em geral, os flavan-3-óis e os ácidos fenólicos, que representam os principais constituintes da fração fenólica, apresentam tendências de extração muito semelhantes às descritas para o total de compostos fenólicos (**Tabela 9** e **Figura 11**). Ainda assim, os ácidos fenólicos foram melhor recuperados com tempos mais longos e proporções médias-baixas de etanol. Por sua vez, o grupo dos flavonóis foi extraído mais eficazmente ao usar tempos mais curtos e temperaturas de processamento mais baixas.

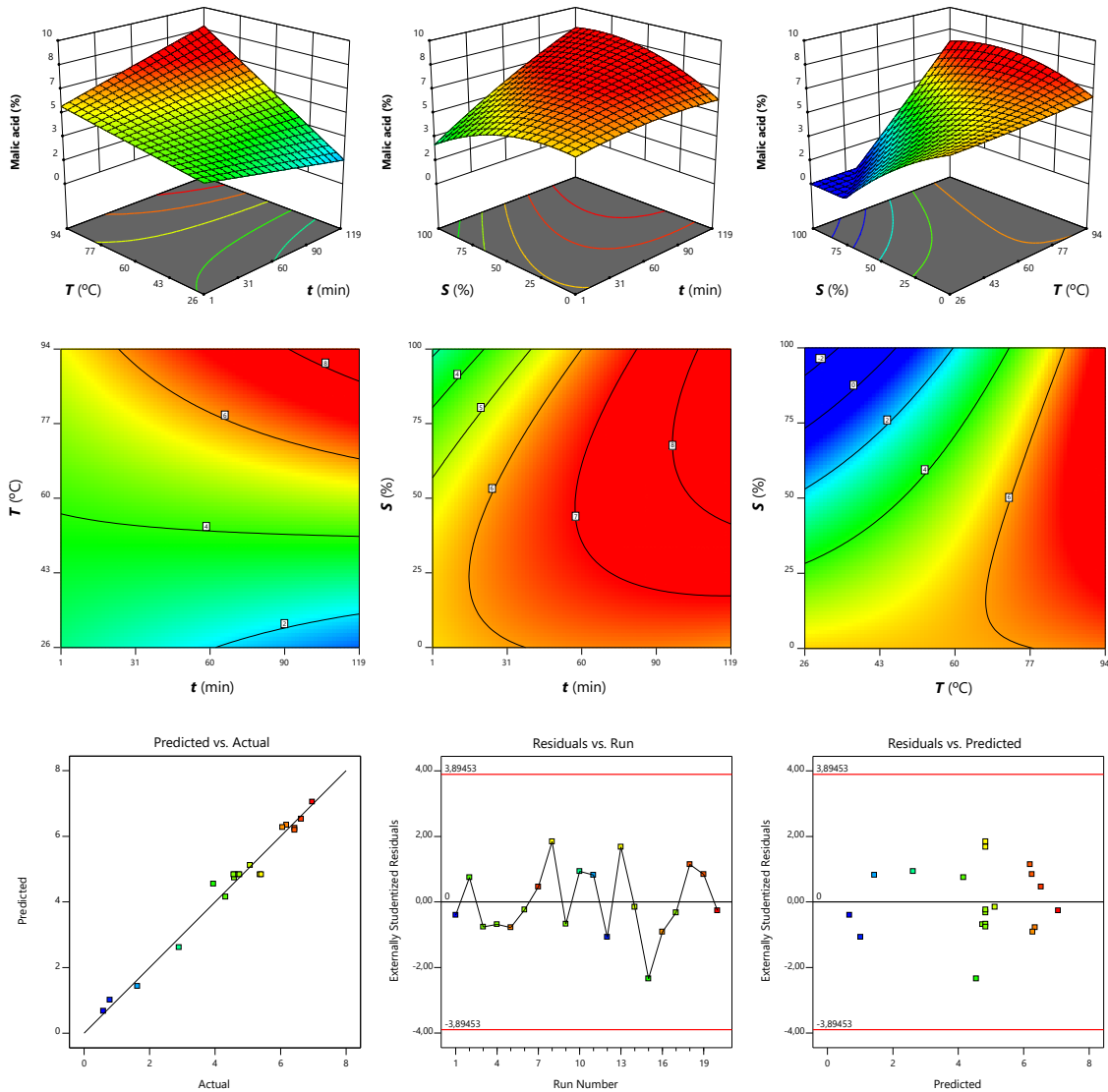


**Figura 11.** Gráficos de superfície de resposta ilustrando os efeitos das variáveis independentes na extração de ácidos fenólicos, flavan-3-óis e flavonóis a partir da casca de marmelo. Em cada gráfico 3D, a variável excluída foi fixada no seu valor ótimo.

### 5.3.3. Efeitos no ácido málico e outros ácidos orgânicos

Os padrões de extração de ácido málico foram caracterizados pela complexidade do modelo preditivo mostrado na **Tabela 8**, que envolveu interações entre todas as variáveis. A proporção de etanol induziu efeitos lineares (-1,44) e quadráticos (-0,35) negativos, mas interagiu positivamente com o tempo (0,46) e a temperatura (0,86). Conforme mostrado na **Figura 12** pelas zonas a vermelho das superfícies de resposta e das suas projeções e também na **Figura A1** em anexo, as proporções médias de etanol favorecem a extração de ácido málico. Por sua vez, as maiores concentrações foram obtidas ao extrair a temperaturas mais altas por mais tempo. Embora o efeito linear do tempo não tenha sido significativo ( $p < 0,05$ ), este interagiu com as outras duas variáveis do processo. Assim, tempos curtos funcionaram melhor com menores proporções de etanol. Para o ácido málico, as condições ideais de processamento (87,7 min, 92,7 °C, 54,4% etanol) estiveram

associadas a  $7,9 \pm 0,3$  g/100 g (**Tabela A1** em anexo). Para reduzir o tempo e a temperatura envolvidos na extração, foi realizada uma segunda otimização minimizando os valores destas duas variáveis independentes. As condições que atendem a este objetivo envolveram 10,0 min de extração a 44,4 °C com 26,5% de etanol, rendendo  $6,1 \pm 0,3$  g/100 g de ácido málico (cerca de 23% menos do que em condições ótimas).



**Figura 12.** Gráficos de superfície de resposta com representações gráfica de dados estatísticos ilustrando os efeitos das variáveis independentes na extração de ácido málico a partir da casca de marmelo. Em cada gráfico 3D, a variável excluída foi fixada no seu valor ótimo.

Além do ácido málico, os dados experimentais de ácido quínico e ácidos orgânicos totais também foram ajustados à **Equação 2** e os coeficientes do modelo obtidos são mostrados na **Tabela 9**. Enquanto a extração de ácidos orgânicos totais e ácido málico

apresentaram o mesmo comportamento durante a extração (dada a elevada proporção de ácido málico), o de ácido quínico diferiu principalmente pelos efeitos quadráticos positivos (0,10) da proporção de etanol e pela falta de interações entre as variáveis. De facto, conforme mostrado na **Tabela A1** em anexo, as condições ótimas de extração para o ácido quínico diferiram das do ácido málico e ácidos orgânicos totais principalmente pela percentagem de etanol necessária.

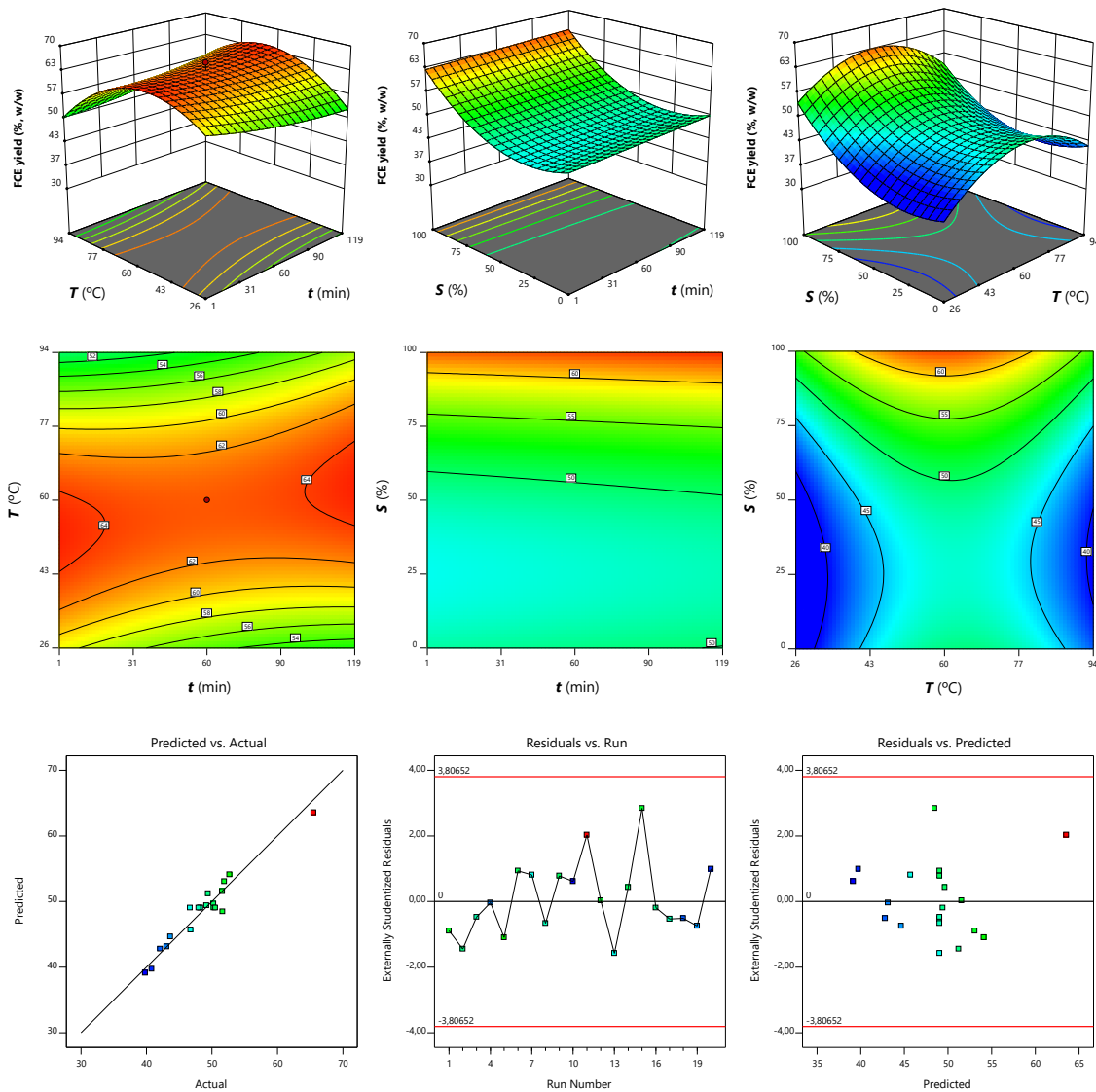
#### 5.3.4. Efeitos nos açúcares solúveis

Os açúcares solúveis representaram uma percentagem considerável dos extratos de casca de marmelo (**Tabela 6**). Portanto, ao extrair os compostos bioativos discutidos acima, é importante conhecer o perfil qualitativo e quantitativo dos açúcares e saber como esses constituintes serão afetados pelo processamento. A **Figura A2** em anexo ilustra os efeitos de cada variável independente na extração de açúcares solúveis da casca de marmelo. Como esperado, estes simples hidratos de carbono foram melhor extraídos usando apenas água (para a frutose) ou baixas proporções de etanol (para a glucose e a sacarose) (**Tabela A1** em anexo). O solvente interagiu com a temperatura, resultando em níveis mais altos de açúcar ao extrair a temperaturas médias-altas. As condições ótimas de processamento na **Tabela A1** em anexo mostram que é possível obter até  $65 \pm 1$  g de açúcares solúveis em 100 g de EB. No entanto, torna-se mais importante conhecer o teor de açúcar alcançado ao aplicar as condições ótimas de extração definidas para os compostos bioativos alvo. Portanto, os açúcares solúveis podem representar aproximadamente 54-55% do EB obtido na condição definida para o ácido málico e para os compostos fenólicos (**Tabela A1** em anexo), enquanto o EB obtido para rendimento máximo pode ser composto por 60% desses constituintes hidrossolúveis. A fração restante pode ser composta por outras substâncias de baixo peso molecular e pectinas solúveis em água, que, na casca do marmelo, possuem de cerca de 78% de ácido galacturónico (Dammak et al., 2020).

#### 5.3.5. Efeitos nos extratos concentrados em fibra

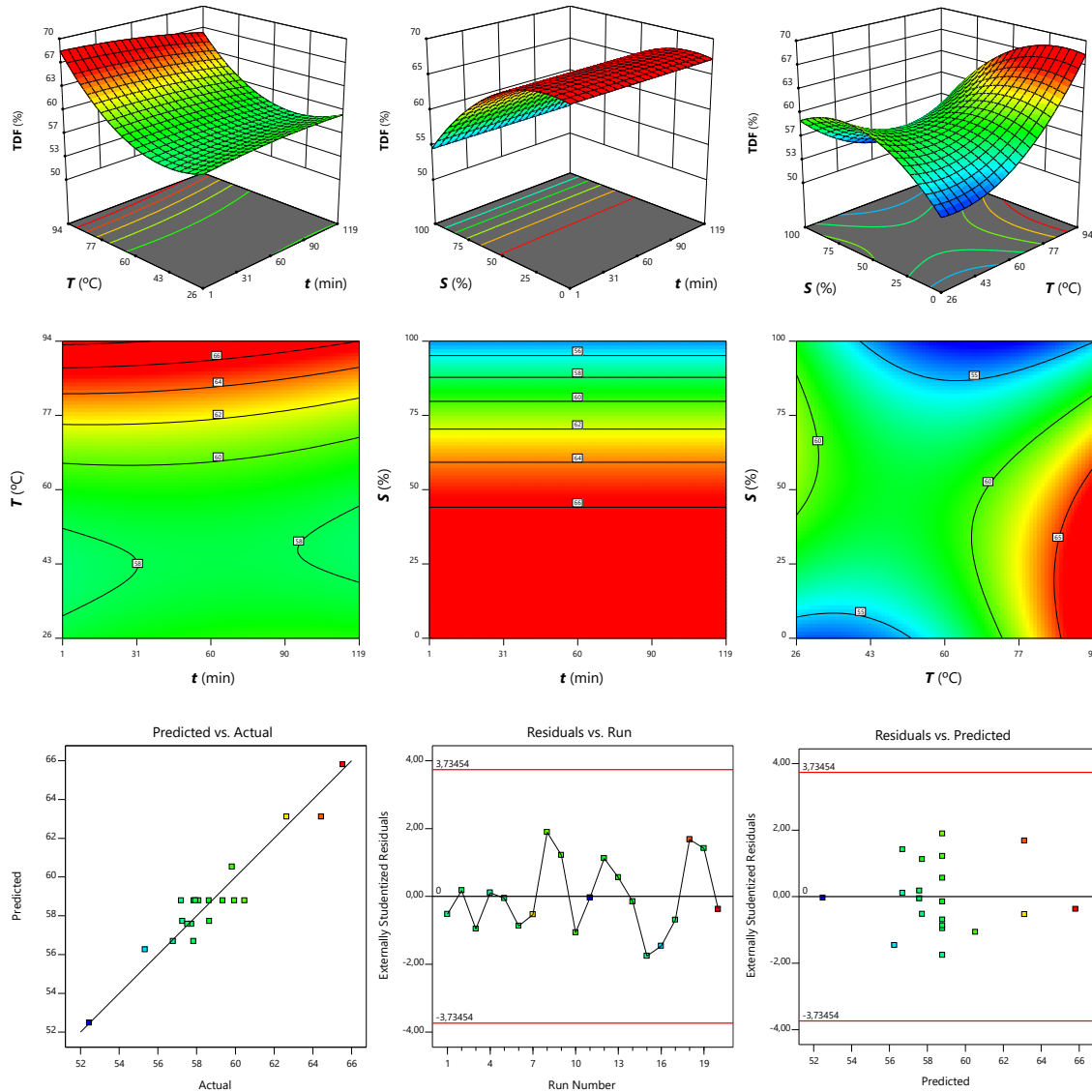
Paralelamente à obtenção do EB de casca de marmelo, também foram obtidos ECF e seguidamente caracterizados em termos de cor e teor de fibra alimentar, promovendo assim a valorização total deste subproduto ou desperdício zero. Os valores paramétricos que

traduzem as tendências de extração são mostrados na **Tabela 10**. Os efeitos mais marcantes foram causados pela proporção de etanol, através de efeitos lineares (4,21) e quadráticos (3,63) positivos. As maiores proporções de etanol foram, portanto, associadas a maiores rendimentos de ECF, ao contrário do que foi observado para o rendimento de EB. Conforme observado na **Figura 13**, o aumento da temperatura até cerca de 60 °C promoveu o rendimento da extração, o qual foi diminuído gradualmente a partir deste valor devido ao efeito quadrático. Essa variável interagiu positivamente com o tempo, que não teve impacto significativo ( $p > 0,05$ ) no processo de extração. Ao processar a casca de marmelo a 61,3 °C durante 69,1 min, usando 99,9% de etanol como solvente, poderá ser atingido um rendimento máximo de ECF de  $64 \pm 2\%$  ( $m/m$ ).



**Figura 13.** Gráficos de superfície de resposta com representações gráfica de dados estatísticos ilustrando os efeitos das variáveis independentes no rendimento de ECF obtido a partir de casca de marmelo. Em cada gráfico 3D, a variável excluída foi fixada no seu valor ótimo.

Ao comparar os gráficos de superfície de resposta na **Figura 13** e na **Figura 14** ou os efeitos de cada variável independente representada na **Figura A3** em anexo, foi possível concluir que os maiores rendimentos de ECF e de fibra alimentar não estão de acordo, tal como discutido anteriormente.



**Figura 14.** Gráficos de superfície de resposta com representações gráfica de dados estatísticos ilustrando os efeitos das variáveis independentes no conteúdo em fibra bruta obtido de casca de marmelo. Em cada gráfico 3D, a variável excluída foi fixada no seu valor ótimo.

De um modo geral, os maiores teores de fibra alimentar foram obtidos nos ECF obtidos com altas temperaturas e proporções médias-baixas de etanol (**Figura 14**). De facto, a extração apenas foi significativamente ( $p < 0,05$ ) afetada por estas duas variáveis

independentes, através de efeitos lineares, quadráticos e de interação (**Tabela 10**). Neste caso, o aumento da temperatura promoveu o teor de fibra alimentar ao utilizar proporções médias-baixas de etanol, mas esteve associado a menores valores de resposta quando combinado com altas proporções de etanol. Uma redução nos teores de fibra com o aumento da proporção de etanol também foi observada por Afifi et al. (2017) no ECF resultante de extrações de sementes de tâmaras. O ECF apresentou 79,4% de fibra bruta, resultante de uma extração de 3 h com 25% de etanol a 55°C; assim, embora o rendimento de ECF tenha sido relativamente baixo, este era de alta pureza. Por sua vez, Li et al. (2020) estudaram a extração de fibra alimentar com água supercrítica a partir de caroços de tâmara e alcançaram maiores rendimentos com a aplicação de temperaturas mais altas (~180 °C), enquanto as variáveis tempo (10–30 min) e concentração da mistura extrativa (2–10%, *m/m*) não induziram variações significativas. Segundo os autores, as fibras alimentares são termoestáveis dentro da faixa testada e não se esperava a sua degradação. Noutro trabalho, Al-Farsi & Lee (2008) quantificaram 57,9 g/100 g de fibra alimentar total (52,7% de fibra insolúvel) em sementes de tâmara e 83,5 e 82,2 g/100 g de fibra alimentar (cerca de 81,5% de fibra insolúvel) em ECF obtido por extrações com água e 50% de acetona, respetivamente. Este resultado foi relacionado com a extração de compostos fenólicos e outros constituintes, tais como proteínas e açúcares solúveis, o que levou ao aumento da fibra alimentar insolúvel (celulose e hemicelulose). Por sua vez, a maior parte da fibra solúvel (pectinas, inulina e gomas) foi recuperada nos EB, o que levou à sua redução no ECF.

Os coeficientes paramétricos apresentados na **Tabela 10** para a luminosidade ( $L^*$ ) dos ECF evidenciaram o envolvimento da proporção de etanol e da temperatura através de termos lineares, quadráticos e de interação. Conforme ilustrado na **Figura A3** em anexo, as tendências registadas para ECF e  $L^*$  estiveram em concordância e, portanto, os ECF mais claros foram aqueles associados a um maior rendimento. Ao contrário, os ECF com maiores proporções de fibra alimentar foram mais escuros e obtidos a temperaturas acima de 80 °C combinadas com 20 ou 50% de etanol. Para a intensidade do vermelho ( $a^*$ ), os dados experimentais possibilitaram o desenvolvimento de um modelo preditivo contando apenas com três coeficientes significativos ( $p < 0,05$ ), dentre os quais o termo de interação solvente  $\times$  temperatura (0,49) foi o mais expressivo.

#### 5.4. Validação experimental dos modelos preditivos

As condições de extração determinadas para compostos fenólicos (9 min, 35 °C e 40% de etanol) e ácido málico (88 min, 93 °C e 54% de etanol) apresentadas na **Tabela A1** em anexo foram aplicadas experimentalmente para obter extratos de casca de marmelo com níveis melhorados destes bioativos constituintes. Para a extração de compostos fenólicos, foram selecionadas as condições ótimas que minimizaram o tempo e a temperatura de extração. Além disso, também foram determinadas condições experimentais para extração simultânea de compostos fenólicos e ácido málico (117 min, 79 °C e 45% de etanol), maximizando simultaneamente ambas as variáveis de resposta.

A confirmação pós-análise realizada com o software Design Expert mostrou uma boa concordância entre os resultados práticos e os previstos pelo modelo, com um nível de confiança de 95%. Conforme apresentado na **Tabela 11**, não houve diferenças significativas entre os rendimentos de EB e ECF obtidos com as três extrações. O extrato enriquecido em CF teve cerca de 13% mais de compostos fenólicos do que os outros dois extratos, devido aos teores mais elevados de flavan-3-óis e flavonóis. Por outro lado, o extrato enriquecido em AM apresentou os maiores teores de ácido málico e também de ácidos fenólicos, seguido pelo extrato CF/AM. As configurações definidas para estes dois extratos parecem ter promovido a extração de compostos com uma função orgânica de ácido carboxílico, o que era de alguma forma esperado, pois não diferem muito daqueles (114,3 min, 82,8 °C e 36,3% de etanol) dos ácidos fenólicos (**Tabela A1** em anexo).

**Tabela 11.** Rendimento de extração, teores de compostos fenólicos (CF) e ácido málico (AM) e parâmetros de cor dos ECF obtidos em condições ótimas de extração a partir de casca de marmelo.

	Extrato CF	Extrato AM	Extrato CF/AM
Rendimento de EB (% , <i>m/m</i> )	48 ± 3 <sup>a</sup>	49 ± 3 <sup>a</sup>	50 ± 2 <sup>a</sup>
Compostos fenólicos (mg/g EB)	9,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	8,1 ± 0,4 <sup>b</sup>	8,1 ± 0,6 <sup>b</sup>
Ácidos fenólicos (mg/g EB)	2,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	3,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,3 <sup>a,b</sup>
Flavan-3-óis (mg/g EB)	4,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	3,0 ± 0,2 <sup>b</sup>	3,7 ± 0,3 <sup>b</sup>
Flavonóis (mg/g EB)	2,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,62 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,30 ± 0,03 <sup>c</sup>
Ácido málico (g/100 g)	4,5 ± 0,2 <sup>c</sup>	7,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	6,0 ± 0,1 <sup>b</sup>
Rendimento de ECF (% , <i>m/m</i> )	51 ± 1 <sup>a</sup>	50 ± 8 <sup>a</sup>	47 ± 1 <sup>a</sup>
Valor de <i>L</i> *	54,9 ± 0,7 <sup>a</sup>	35,8 ± 0,2 <sup>c</sup>	41,4 ± 1,1 <sup>b</sup>
Valor de <i>a</i> *	7,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	8,2 ± 0,2 <sup>a</sup>
Valor de <i>b</i> *	23,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	17,1 ± 0,3 <sup>c</sup>	19,4 ± 0,5 <sup>b</sup>
Cor RGB			

Em cada linha, as letras (a-c) indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre amostras.

Os ECF também apresentaram uma cor dentro da faixa esperada (**Tabela 11**); o resultante da extração de compostos fenólicos foi mais claro (maior valor de  $L^*$ ) e mais amarelado (maior valor  $b^*$ ), enquanto que o da extração de ácido málico foi mais escuro. Como discutido acima, estas tonalidades de cor representados visualmente na **Tabela 11** poderão, em parte, ter sido causadas pelas diferentes temperaturas usadas nas extrações.

De um modo geral, estes resultados evidenciam a adequação dos processos de extração desenvolvidos para recuperar compostos de alto valor agregado a partir de casca de marmelo. No entanto, como é difícil obter rendimentos máximos com apenas uma configuração de extração, poderá ser selecionada aquela que visar o maior rendimento do(s) composto(s) desejado(s) ou que for mais sustentável para exploração em larga escala, tendo em consideração os ganhos e perdas associados (*e.g.*, custo energético e consumo de solvente).

## 5.5. Propriedades bioativas dos extratos obtidos em condições ótimas

### 5.5.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos obtidos nas condições ótimas referidas na secção 5.4. foi avaliada *in vitro* através dos ensaios OxHLIA e TBARS e os resultados são apresentados na **Tabela 12**. Para ambos os ensaios, a melhor atividade antioxidante foi mostrada pelo Trolox, um análogo sintético do alfa-tocoferol.

**Tabela 12.** Atividade antioxidante de extratos de casca de marmelo obtidos em condições que promovem a extração de compostos fenólicos (CF), ácido málico (AM) e ambos os constituintes (CF/AM) e dos controlos positivos (ascorbato de cálcio (E223), metabissulfito de sódio (E302) e Trolox).

	Extratos de casca de marmelo			Controlos positivos		
	CF	AM	CF/AM	E302	E223	Trolox
TBARS	$83 \pm 1^d$	$26 \pm 1^b$	$45 \pm 2^c$	$284 \pm 9^f$	$229 \pm 9^e$	$5,4 \pm 0,3^a$
OxHLIA	$\Delta t$ 60 min	$187 \pm 9^d$	$105 \pm 3^c$	$223 \pm 7^e$	sa	$21,7 \pm 0,4^a$
	$\Delta t$ 120 min	$471 \pm 12^d$	$234 \pm 5^c$	$458 \pm 9^d$	$84 \pm 2^b$	sa

Para TBARS e OxHLIA, os resultados são dados como valores de  $EC_{50}$  e  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ), respetivamente. Em cada linha as letras (a-f) indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre amostras. sa: sem atividade hemolítica nas concentrações testadas.

No ensaio TBARS, o extrato AM foi o que melhor inibiu a formação de TBARS, seguido do extrato PC/MA e depois do extrato CF. A atividade antioxidante dos aditivos alimentares foi curiosamente menor do que a dos extratos de casca de marmelo. O E302 é um sal de ácido ascórbico aprovado pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) como antioxidante alimentar (EFSA, 2015), enquanto o E223 é um aditivo sintético usado como antioxidante, conservante e desinfetante associado a algumas incertezas sobre a sua reatividade em diferentes alimentos e os produtos de reação resultantes (EFSA, 2018). Portanto, os extratos de casca de marmelo podem ser mais eficazes em retardar a rancificação do que os aditivos testados, representando assim uma alternativa natural com potencial a ser explorada pelo setor alimentar.

O extrato AM foi também o que melhor protegeu os eritrócitos ovinos contra o dano oxidativo causado pelos radicais livres derivados do AAPH (**Tabela 12**), com uma eficiência superior à do extrato aquoso ( $160 \pm 4 \mu\text{g/mL}$  para o  $\Delta t$  de 60 min e  $296 \pm 11 \mu\text{g/mL}$  para o  $\Delta t$  de 120 min) testado por Othman (2021), mas comparável à do seu extrato hidroetanólico ( $115 \pm 2 \mu\text{g/mL}$  para o  $\Delta t$  de 60 min e  $230 \pm 6 \mu\text{g/mL}$  para o  $\Delta t$  de 120 min). Os extratos CF e CF/AM surgiram com menor atividade; embora o extrato CF tenha sido mais eficiente para o  $\Delta t$  mais curto, ambos os extratos mostraram uma proteção semelhante ( $p > 0,05$ ) para o  $\Delta t$  de 120 min. Este comportamento antioxidante foi avaliado com o bioensaio OxHLIA, uma vez que a ação protetora dos compostos antioxidantes depende de vários fatores, incluindo a cinética de reação de curto e longo prazo. Assim, enquanto alguns antioxidantes podem reagir mais rapidamente e ficarem esgotados no sistema reacional, outros podem ter uma ação prolongada ao longo do tempo e proteger para  $\Delta t$  mais longos. Como apresentado na **Tabela A2**, o ácido málico correlacionou-se melhor do que os ácidos fenólicos para tempos de exposição mais longos.

O aditivo alimentar E302 foi mais eficaz em proteger a membrana dos eritrócitos do que os extratos de casca de marmelo (**Tabela 12**). No entanto, o E223 não apresentou efeitos anti-hemolíticos na faixa de concentração testada. De acordo com estudos anteriores, este composto inorgânico com sulfitos induzir nos eritrócitos a forma típica de foice, comprometendo assim a integridade da sua membrana e levando à sua hemólise, o que pode justificar estes resultados (Atabo et al., 2016; Nanfack et al., 2013).

Em relação a estudos anteriores de atividade antioxidante, Magalhães et al. (2009) correlacionaram a atividade anti-hemolítica de extratos metanólicos de casca e polpa de

marmelo com ácidos cafeoilquínicos. Alesiani et al. (2010) atribuíram uma forte atividade de eliminação de radicais livres aos flavonóis do tipo quercetina encontrados na casca de marmelo e uma capacidade moderada a outros compostos, incluindo ácidos fenólicos. Em geral, uma maior atividade antioxidante tem sido atribuída aos extratos da casca do que aos da polpa deste fruto e relacionada à composição fenólica (Fattouch et al., 2007; Branca M. Silva et al., 2005). Apesar disso, Szychowski et al. (2014) descreveram que, embora os compostos fenólicos contribuam muito para a atividade antioxidante da polpa, estes fitoquímicos estão fracamente correlacionados com a atividade da casca e, deste modo, outros compostos como o ácido málico podem estar envolvidos.

### 5.5.2. Atividade antimicrobiana

Além dos efeitos antioxidantes, também é importante que os ingredientes naturais a serem usados como aditivos alimentares tenham propriedades antimicrobianas para prevenir o crescimento microbiano e a deterioração dos alimentos. Os extratos de casca de marmelo desenvolvidos e os controles positivos foram testados contra bactérias e micromicetes transmitidos por alimentos e os resultados obtidos estão representados na **Tabela 13**.

Alguns extratos foram mais eficazes em inibir o crescimento microbiano visível e em matar o inóculo original do que pelo menos um dos de aditivos alimentares controle. Por exemplo, os três extratos de casca de marmelo foram mais eficazes do que o E224 contra *Bacillus cereus*, um bastonete Gram-positivo formador de esporos e anaeróbio facultativo responsável por intoxicações alimentares, vômitos e diarreia (Jessberger et al., 2020). O E224 e o extrato AM tiveram a mesma capacidade de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, a bactéria mais perigosa do gênero *Staphylococcus*, e *Enterobacter cloacae*. Por sua vez, quando comparadas ao E211, estas duas bactérias foram particularmente bem inibidas ou mortas pelo extrato CF e principalmente pelo extrato AM, bem como *Enterobacter cloacae* pelo extrato AM. Além disso, o E211 teve as mesmas MIC e MBC que os três extratos contra *Listeria monocytogenes*, os extratos CF e AM contra *Escherichia coli* e o extrato AM contra *Salmonella Typhimurium*. Com base nessas observações, a atividade antimicrobiana dos extratos de casca de marmelo pode ser classificada da seguinte forma: extrato AM > extrato CF > extrato CF/AM. Também é interessante notar que as MIC e MFC alcançadas com o extrato AM foram menores do que as obtidas por Othman (2021) para as mesmas estirpes bacterianas.

**Tabela 13.** Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos de casca de marmelo obtidos nas condições que promovem a extração de compostos fenólicos (CF), ácido málico (AM) e ambos os constituintes (CF/AM) e dos controlos positivos (benzoato de sódio (E211), metabissulfito de potássio (E224), estreptomomicina, ampicilina, cetoconazol e bifonazol).

	Extratos de casca de marmelo						Controlos positivos							
	Extrato PC		Extrato MA		Extrato PC/MA		E211		E224		Estreptomomicina		Ampicilina	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Bactérias Gram-positivo														
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	8	1	2	4	8	4	4	1	1	0,04	0,1	0,25	0,45
<i>Bacillus cereus</i>	1	2	1	2	1	2	0,5	0,5	2	4	0,1	0,2	0,25	0,4
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	2	1	2	1	2	1	2	0,5	1	0,2	0,3	0,4	0,5
Bactérias Gram-negativo														
<i>Escherichia coli</i>	1	2	1	2	4	8	1	2	0,5	1	0,2	0,3	0,4	0,5
<i>Salmonella Typhimurium</i>	2	4	1	2	4	8	1	2	1	1	0,2	0,3	0,75	1,2
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	2	0,5	1	4	8	2	4	0,5	0,5	0,2	0,3	0,25	0,5
											Cetoconazol		Bifonazol	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	2	1	2	2	4	1	2	1	1	0,25	0,5	0,15	0,2
<i>Aspergillus niger</i>	2	4	1	2	2	4	1	2	1	1	0,2	0,5	0,15	0,2
<i>Aspergillus versicolor</i>	>8	>8	1	2	4	8	2	2	1	1	0,2	0,5	0,1	0,2
<i>Penicillium funiculosum</i>	2	4	2	4	2	4	1	2	0,5	0,5	0,2	0,5	0,2	0,25
<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>	>8	>8	>8	>8	>8	>8	2	4	1	1	0,2	0,3	0,1	0,2
<i>Trichoderma viride</i>	2	4	2	4	2	4	1	2	0,5	0,5	2,5	3,5	0,2	0,25

Os resultados são apresentados como MIC, MBC e MFC (mg/mL).

O aditivo alimentar E224, que ofereceu maior capacidade antibacteriana, também se destacou pelo seu efeito antifúngico, embora menos eficaz que os antifúngicos azólicos (exceto contra *Trichoderma viride*). Tanto o E224 quanto o extrato AM originaram a mesma MIC contra os três *Aspergillus* spp. Por sua vez, os valores de MIC/MFC obtidos para o E211 foram iguais aos dos extratos AM e CF para *Aspergillus fumigatus* e do extrato AM para *Aspergillus niger*, e superiores aos do extrato AM para *Aspergillus versicolor*. Por outro lado, a dose de extrato de casca de marmelo necessária para inibir ou matar *Penicillium funiculosum* e *Trichoderma viride* foi o dobro da obtida para o E211. Ainda assim, os extratos foram mais ativos que o cetoconazol contra *Trichoderma viride*. Entre os seis micromicetes tratados com os extratos de casca de marmelo, o *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*, capaz de produzir a potente neurotoxina verrucosidina (Hodge et al., 1988), pareceu ter o maior grau de resistência (MIC/MFC > 8 mg/mL).

Os resultados deste trabalho são comparáveis aos de Othman (2021), que relatou MIC e MFC ligeiramente mais baixos para a maioria das estirpes fúngicas testadas, exceto para *Aspergillus niger*, para o qual nossos extratos foram mais promissores. Outros estudos atribuíram maior atividade antimicrobiana aos extratos aquosos de acetona da casca de marmelo do que da sua polpa, especialmente contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, mas também *Escherichia coli* e *Candida albicans* (Fattouch et al., 2007). Extratos etanólicos de casca de marmelo também foram descritos como tendo capacidade de romper biofilmes formados por *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Typhimurium, com MIC variando de 5 a 60 µg/mL (Stojković et al., 2018). Todos estes resultados sugerem que os extratos de casca de marmelo podem ser úteis para prevenir ou combater algumas contaminações microbianas. No entanto, será importante elucidar quais são os constituintes do extrato que mais contribuem mais para estes efeitos antimicrobianos e os mecanismos de ação envolvidos.



## 6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

### 6.1. Notas de conclusão

O tema desta dissertação de mestrado surgiu devido à elevada quantidade de casca de marmelo descartada pelo setor industrial e ao seu potencial para ser integrada na indústria alimentar, biotecnológica e farmacêutica, entre outras, sob a forma de ingredientes enriquecidos em polifenóis e ácidos orgânicos, compostos que conferem potencial antioxidante e antimicrobiano, ou como concentrados de fibra alimentar com potencial fortificante. Para isso, após ajustar os dados experimentais obtidos com o RSM-DCCR implementado a uma equação polinomial de segunda ordem, foi possível obter modelos teóricos estatisticamente válidos, os quais ilustraram os efeitos das três variáveis independentes ( $t$ ,  $T$  e  $S$ ) envolvidas no processo de extração nas variáveis de resposta em análise. Estes modelos permitiram determinar as condições ótimas de processamento.

Os rendimentos de extração de EB e ECF variaram de 34,47 a 67,09% ( $m/m$ ) e de 39,82 a 65,52% ( $m/m$ ), respetivamente. Nos EB foi possível identificar 17 compostos fenólicos, incluindo 5 ácidos fenólicos, 9 flavan-3-óis e 2 flavonóis glicosilados, os ácidos oxálico, quínico e málico e os açúcares livres frutose, glucose e sacarose. O teor total de compostos fenólicos variou de 6,5 a 10,13 mg/g EB. No ponto central do desenho experimental, os flavan-3-óis e os ácidos fenólicos representaram 40,3% e 34,6% da fração fenólica, respetivamente, e os flavonóis corresponderam a 25,1%. Entre os ácidos orgânicos detetados, o ácido málico foi o mais abundante (representando mais 95% do total de ácidos orgânicos), com teores chegando a 6,97 g/100 g EB. A casca de marmelo surgiu assim como uma fonte alternativa deste composto amplamente utilizado no setor alimentar e farmacêutico e como precursor de importantes produtos químicos. Quanto aos açúcares solúveis, a frutose foi o mais abundante (60-79%), seguido pela glucose (11-25%). Estes dois açúcares redutores juntamente com a sacarose representaram 44 a 62,8% dos EB obtidos e, como esperado, os teores mais baixos estiveram associados ao uso de maiores proporções de etanol. Os modelos preditivos permitiram determinar as condições ótimas de processamento para o rendimento de EB (66,4 min, 28,4 °C e 42,6% de etanol), compostos fenólicos (64,2 min, 88,0 °C e 0% etanol) e ácido málico (87,7 min, 92,7 °C e 54,4% etanol) que permitiram alcançar as respostas de  $69 \pm 2\%$  ( $m/m$ ),  $10,6 \pm 0,2$  mg/g EB e  $7,9 \pm 0,3$  g/100 g EB, respetivamente.

Para os ECF, as maiores proporções de etanol estiveram associadas a maiores rendimentos, mas a menores teores de fibra alimentar (a qual representou 52,5–65,6% dos ECF). Isto deveu-se provavelmente à maior extração de açúcares e outros compostos hidrossolúveis de baixa massa molecular, justificando assim as menores proporções de fibra alimentar. Além disso, quanto maior a percentagem de açúcares, mais claras (valores de  $L^*$  mais elevados) foram as amostras. Pelo contrário, os ECF com maior proporção de fibra foram mais escuros, o que também poderá ter resultado do processamento a altas temperaturas com 20–50% de etanol. A obtenção de ECF foi promovida por 69,1 min de extração a 61,3 °C, usando 99,9% de etanol. Já o máximo de fibra alimentar ( $67 \pm 1$  g/100 g ECF) esteve associado ao processamento a 92,2 °C com 35,5% de etanol, enquanto que a variável tempo não teve um efeito significativo.

Seguidamente, as condições associadas a máximos de extração de compostos fenólicos e ácido málico foram usadas pela obtenção de extratos de casca de marmelo enriquecidos nestes compostos bioativos, o que permitiu validar experimentalmente os modelos preditivos com uma boa concordância entre dados quantitativos teóricos e experimentais. Depois disso, o potencial conservante destes extratos foi avaliado pela medição da sua atividade antioxidante via inibição da peroxidação lipídica e da hemólise oxidativa e antimicrobiana contra bactérias e fungos associados a contaminações alimentares. Os extratos destacaram-se em vários aspetos face a aditivos alimentares usados como controlo positivo, principalmente os enriquecidos em ácido málico.

Os resultados desta dissertação de mestrado destacam o potencial inexplorado da casca de marmelo, a qual poderá ser inserida na cadeia de valor alimentar sob a forma de ingredientes naturais bioativos e fortificantes e, deste modo, promotores de saúde.

## 6.2. Estudos futuros

Seria interessante testar métodos de extração intensificados por ultrassons, micro-ondas ou outras tecnologias inovadoras, bem como implementar estratégias que permitam separar os compostos bioativos dos açúcares que constituem uma grande fração dos EB da casca de marmelo. Também será importante caracterizar os ECF com recurso a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e avaliar as suas propriedades funcionais. Além disso, o potencial conservante do extrato enriquecido em ácido málico será testado em produtos alimentares, nomeadamente em smoothies.



**REFERÊNCIAS**

- Afifi, H. S., Hashim, I. B., & Altubji, S. I. (2017). Optimizing extraction conditions of crude fiber, phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity of date seed powder. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(13), 4149–4161. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2854-7>
- Al-Farsi, M. A., & Lee, C. Y. (2008). Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. *Food Chemistry*, *108*(3), 977–985. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.009>
- Albuquerque, B. R., Pinela, J., Barros, L., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2020). Anthocyanin-rich extract of jaboticaba epicarp as a natural colorant: optimization of heat- and ultrasound-assisted extractions and application in a bakery product. *Food Chemistry*, *316*, 126364.
- Albuquerque, B. R., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Rodrigues, A. E., 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. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.050>
- Alesiani, D., Canini, A., D'Abrosca, B., DellaGreca, M., Fiorentino, A., Mastellone, C., Monaco, P., & Pacifico, S. (2010). Antioxidant and antiproliferative activities of phytochemicals from quince (*Cydonia vulgaris*) peels. *Food Chemistry*, *118*(2), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.098>
- Antonio, A. L., Pereira, E., Pinela, J., Heleno, S., Pereira, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Determination of antioxidant compounds in foodstuff. In *Food Safety: Innovative Analytical Tools for Safety Assessment* (pp. 179–220). John Wiley & Sons, Inc.
- AOAC. (2019). *Official Methods of Analysis* (21st ed.).
- Aschemann-Witzel, J., & Stangherlin, I. D. C. (2021). Upcycled by-product use in agri-food systems from a consumer perspective: a review of what we know, and what is missing. *Technological Forecasting and Social Change*, *168*, 120749. <https://doi.org/10.1016/j.techfore.2021.120749>

- Ashraf, M. U., Muhammad, G., Hussain, M. A., & Bukhari, S. N. A. (2016). *Cydonia oblonga* M., a medicinal plant rich in phytonutrients for pharmaceuticals. *Frontiers in Pharmacology*, 7(JUN), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00163>
- Atabo, S., Umar, I. A., James, D. B., & Mamman, A. I. (2016). Sickled erythrocytes reversal and membrane stabilizing compounds in *Telfairia occidentalis*. *Scientifica*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1568061>
- Aydar, A. Y. (2018). Utilization of response surface methodology in optimization of extraction of plant materials. *Statistical Approaches With Emphasis on Design of Experiments Applied to Chemical Processes*, March. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73690>
- Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: An underexploited and highly disseminated species. *Industrial Crops and Products*, 89, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.065>
- Brownlee, I. A., Chater, P. I., Pearson, J. P., & Wilcox, M. D. (2017). Dietary fibre and weight loss: where are we now? *Food Hydrocolloids*, 68, 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.029>
- Caleja, C., Barros, L., Prieto, M. A., Barreiro, F. M. F., Oliveira, M. B. 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.
- Cámara, M. M., Díez, C., Torija, M. E., & Cano, M. P. (1994). HPLC determination of organic acids in pineapple juices and nectars. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 198(1), 52–56. <https://doi.org/10.1007/BF01195284>
- Carvalho, M., Branca, M. S., Silva, R., Valentão, P., & Paula, B. A. (2010). First report on *Cydonia oblonga* Miller anticancer potential: differential antiproliferative effect against human kidney and colon cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3366–3370. <https://doi.org/10.1021/jf903836k>
- Cho, S. S., Qi, L., Fahey, G. C., & Klurfeld, D. M. (2013). Consumption of cereal fiber,

- mixtures of whole grains and bran, and whole grains and risk reduction in type 2 diabetes, obesity, and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 98(2), 594–619. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.067629>
- Cornatosky, M. A., & Andrada, C. A. (2000). *Consideraciones nutricionales sobre el membrillo* (E. La Colmena (Ed.)).
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The role of polyphenols in human health and food systems: a mini-review. *Frontiers in Nutrition*, 5(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>
- D. Blanco, G., Gutiérrez, M. J. M., Alvarez, M. D. G., & J.J. Mangas, A. (1988). Application of HPLC to characterization and control of individual acids in apple extracts and ciders. *Chromatographia*, 25(12).
- Dai, Z., Zhou, H., Zhang, S., Gu, H., Yang, Q., Zhang, W., Dong, W., Ma, J., Fang, Y., Jiang, M., & Xin, F. (2018). Current advance in biological production of malic acid using wild type and metabolic engineered strains. *Bioresource Technology*, 258(January), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.001>
- Dammak, M. I., Mzoughi, Z., Chakroun, I., Mansour, H. Ben, Le Cerf, D., & Majdoub, H. (2020). Optimization of polysaccharides extraction from quince peels: partial characterization, antioxidant and antiproliferative properties. *Natural Product Research*, 34(10), 1470–1474. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1514403>
- de Escalada Pla, M. F., Uribe, M., Fissore, E. N., Gerschenson, L. N., & Rojas, A. M. (2010). Influence of the isolation procedure on the characteristics of fiber-rich products obtained from quince wastes. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.07.018>
- De Tommasi, N., Piacente, S., De Simone, F., & Pizza, C. (1996). Constituents of *Cydonia vulgaris*: isolation and structure elucidation of four new flavonol glycosides and nine new  $\alpha$ -ionol-derived glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(7), 1676–1681. <https://doi.org/10.1021/jf950547a>
- Decreto-Lei n.º 97/84 de 28 de Março. (1984). *Diário Da República*, 97/87, 015–1021.
- Dias, M. I., Barros, L., Morales, P., Sánchez-Mata, M. C., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Nutritional parameters of infusions and decoctions

- obtained from *Fragaria vesca* L. roots and vegetative parts. *Lwt*, 62(1), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.034>
- DIRECTIVA 2009/32/CE. (2010). Aproximação das legislações dos Estados-Membros sobre os solventes de extracção utilizados no fabrico de géneros alimentícios e dos respectivos ingredientes. *Jornal Oficial Da União Europeia*.
- Dolenc-Šturm, K., Štampar, F., & Usenik, V. (1999). Evaluating of some quality parameters of different apricot cultivars using HPLC method. *Accreditation and Quality Assurance*, 4(12), 297–309.
- EFSA. (2014). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for folate. *EFSA Journal*, 12(11), 1–59. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3893>
- EFSA. (2015). Scientific opinion on the re-evaluation of ascorbic acid (E300), sodium ascorbate (E301) and calcium ascorbate (E302) as food additives. *EFSA Journal*, 13(5), 1–124. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4087>
- EFSA. (2018). Scientific opinion on the re-evaluation of sulfur dioxide (E220), sodium sulfite (E221), sodium bisulfite (E222), sodium metabisulfite (E223), potassium metabisulfite (E224), calcium sulfite (E226), calcium bisulfite (E227) and potassium bisulfite. *EFSA Journal*, 14(4). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4438>
- European commission: Directorate-General for Research and Innovation. (2017). *Future-proofing our food systems through research and innovation* (K. Fabbri (Ed.); Food 2030). <https://doi.org/10.2777/249082>
- Eusébio, J., & Isabel, J. (2013). *Implantação de uma Indústria de Marmelada*. 54. <http://pt.scribd.com/doc/201453981/Implantacao-de-uma-Industria-de-Marmelada-pdf#scribd>
- Evans, B. C., Nelson, C. E., Yu, S. S., Beavers, K. R., Kim, A. J., Li, H., Nelson, H. M., Giorgio, T. D., & 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 : JoVE*, 73, 7–11. <https://doi.org/10.3791/50166>
- FAOSTAT. (2022). *FAOSTAT*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C. I. G., Angioni, A., Dessi, S.,

- Marzouki, N., & Cabras, P. (2007). Antimicrobial activity of tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenols extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 963–969. <https://doi.org/10.1021/jf062614e>
- Food and Nutrition Board Institute of Medicine. (2001). *Dietary reference intakes: proposed definition of dietary fiber*.
- Galanakis, C. M. (2018). Food waste recovery: prospects and opportunities. In *Sustainable Food Systems from Agriculture to Industry*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811935-8.00012-3>
- Ganopoulos, I., Merkouropoulos, G., Pantazis, S., Tsipouridis, C., & Tsaftaris, A. (2011). Assessing molecular and morpho-agronomical diversity and identification of ISSR markers associated with fruit traits in quince (*Cydonia oblonga*). *Genetics and Molecular Research*, 10(4), 2729–2746. <https://doi.org/10.4238/2011.November.4.7>
- Griñán, I., Galindo, A., Rodríguez, P., Morales, D., Corell, M., Centeno, A., Collado-González, J., Torrecillas, A., Carbonell-Barrachina, A. A., & Hernández, F. (2019). Volatile composition and sensory and quality attributes of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) fruits as affected by water stress. *Scientia Horticulturae*, 244(August 2018), 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.09.013>
- Griñán, I., Rodríguez, P., Nouri, H., Wang, R., Huang, G., Morales, D., Corell, M., Pérez-López, D., Centeno, A., Martín-Palomo, M. J., Hernández, F., Torrecillas, A., & Galindo, A. (2019). Leaf mechanisms involved in the response of *Cydonia oblonga* trees to water stress and recovery. *Agricultural Water Management*, 221(December 2018), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2019.04.017>
- He, B., Zhang, L. L., Yue, X. Y., Liang, J., Jiang, J., Gao, X. L., & Yue, P. X. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*, 204, 70–76.
- Hegedús, A., Papp, N., & Stefanovits-Bányai, É. (2013). Review of nutritional value and putative health-effects of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) fruit. *International Journal of Horticultural Science*, 19(3–4), 29–32.

- <https://doi.org/10.31421/ijhs/19/3-4./1098>
- Heleno, S. A., Stojković, D., Barros, L., Glamočlija, J., Soković, M., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A comparative study of chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Morchella esculenta* (L.) Pers. from Portugal and Serbia. *Food Research International*, 51(1), 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.020>
- Hemmati, A. A., Kalantari, H., Jalali, A., Rezai, S., & Zadeh, H. H. (2012). Healing effect of quince seed mucilage on T-2 toxin-induced dermal toxicity in rabbit. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(3), 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.08.004>
- Hodge, R. P., Harris, C. M., & Harris, T. M. (1988). Verrucofortine, a major metabolite of *Penicillium verrucosum* var. *Cyclopium*, the fungus that produces the mycotoxin verrucosidin. *Journal of Natural Products*, 51(1), 66–73.
- Honglian, S., & Noriko, N. (2001). Introducing natural antioxidants. In J. Pokorny, N. Yanishlieva, & M. Gordon (Eds.), *Antioxidants in Food - Practical Applications* (pp. 147–158). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/9781855736160.3.147>.
- Hyoung S. Lee. (1993). HPLC method for separation and determination of non volatile organic acids in orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(11). <https://doi.org/10.1021/jf00035a033>
- Iberahim, N., Sethupathi, S., Goh, C. L., Bashir, M. J. K., & Ahmad, W. (2019). Optimization of activated palm oil sludge biochar preparation for sulphur dioxide adsorption. *Journal of Environmental Management*, 248(July), 109302. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109302>
- Jessberger, N., Dietrich, R., Granum, P. E., & Märtlbauer, E. (2020). The *Bacillus cereus* food infection as multifactorial process. *Toxins*, 12(11), 1–37. <https://doi.org/10.3390/toxins12110701>
- Karar, M. G. E., Pletzer, D., Jaiswal, R., Weingart, H., & Kuhnert, N. (2014). Identification, characterization, isolation and activity against *Escherichia coli* of quince (*Cydonia oblonga*) fruit polyphenols. *Food Research International*, 65(PA), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.040>

- Langfield, R. D., Scarano, F. J., Heitzman, M. E., Kondo, M., Hammond, G. B., & Neto, C. C. (2004). Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2–3), 279–281. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.013>
- Legua, P., Serrano, M., Melgarejo, P., Valero, D., Martínez, J. J., Martínez, R., & Hernández, F. (2013). Quality parameters, biocompounds and antioxidant activity in fruits of nine quince (*Cydonia oblonga* Miller) accessions. *Scientia Horticulturae*, 154, 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.02.017>
- Leong, L. P., & Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, 76(1), 69–75. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00251-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00251-5)
- Li, B., Akram, M., Al-Zuhair, S., Elnajjar, E., & Munir, M. T. (2020). Subcritical water extraction of phenolics, antioxidants and dietary fibres from waste date pits. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(6), 104490. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104490>
- Lockowandt, L., Pinela, J., Roriz, C. L., Pereira, C., Abreu, R. M. V., Calhella, R. C., Alves, M. J., Barros, L., Bredol, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Chemical features and bioactivities of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) capitula: The blue flowers and the unexplored non-edible part. *Industrial Crops and Products*, 128, 496–503.
- Lorenzón, E. N., Cespedes, G. F., Vicente, E. F., Nogueira, L. G., Bauab, T. M., Castro, M. S., & Cilli, E. M. (2012). Effects of dimerization on the structure and biological activity of antimicrobial peptide Ctx-Ha. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(6), 3004–3010. <https://doi.org/10.1128/AAC.06262-11>
- Magalhães, A. S., Silva, B. M., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentão, P., & Carvalho, M. (2009). Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1372–1377. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.03.017>
- Magalhães, A. S. M. de. (2009). *Estudo do efeito protector da espécie Cydonia oblonga Miller na danificação oxidativa em eritrócitos humanos*. Universidade Fernando Pessoa.

- Mandim, F., Barros, L., Calhelha, R. C., Abreu, R. M. V., Pinela, J., Alves, M. J., Heleno, S., Santos, P. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). *Calluna vulgaris* (L.) hull: chemical characterization, evaluation of its bioactive properties and effect on the vaginal microbiota. *Food and Function*, *10*(1), 78–89. <https://doi.org/10.1039/c8fo01910j>
- Mendes, A. R. (2011). *Implementação e validação de uma metodologia para análise de fibra alimentar*. Universidade de Coimbra.
- Nanfack, P., Biapa, N., CA, P., VJ, A. M., Moukette, B., & J, N. Y. (2013). The *in vitro* antisickling and antioxidant effects of aqueous extracts *Zanthoxylum heitzii* on sickle cell disorder. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *13*(162), 1–7.
- Oakes, K. D., & Van Der Kraak, G. J. (2003). Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology*, *63*(4), 447–463. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00204-7)
- Oliveira, A. P., Costa, R. M., Magalhães, A. S., Pereira, J. A., Carvalho, M., Valentão, P., Andrade, P. B., & Silva, B. M. (2012). Targeted metabolites and biological activities of *Cydonia oblonga* Miller leaves. *Food Research International*, *46*(2), 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.021>
- Oliveira, A. P., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentão, P., Seabra, R. M., & Silva, B. M. (2007). Phenolic profile of *Cydonia oblonga* Miller leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(19), 7926–7930. <https://doi.org/10.1021/jf0711237>
- Oliveira, A. P., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentão, P., Seabra, R. M., & Silva, B. M. (2008). Organic acids composition of *Cydonia oblonga* Miller leaf. *Food Chemistry*, *111*(2), 393–399. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.004>
- ONU. (2015). *Objetivos de Desenvolvimento Sustentável*. <https://unric.org/pt/objetivos-de-desenvolvimento-sustentavel/>
- Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., Lima, M. E. L., Kaneko, T. M., Nishikawa, S. O., & Freitas, B. R. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *18*(2), 301–307. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2008000200026>

- Othman, S. (2021). *Valorisation of quince (Cydonia oblonga Mill.) peel as a source of nutrients and bioactive polyphenols* [Instituto Politécnico de Bragança (IPB)]. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/24937>
- Pereira, E., Barros, L., Calhella, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Bioactivity and phytochemical characterization of *Arenaria montana* L. *Food and Function*, 5(8), 1848–1855. <https://doi.org/10.1039/c4fo00210e>
- Phillips, K. M., Haytowitz, D. B., & Pehrsson, P. R. (2019). Implications of two different methods for analyzing total dietary fiber in foods for food composition databases. *Journal of Food Composition and Analysis*, 84, 103253. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103253>
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmer' varieties in northeastern Portugal homegardens. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3–4), 829–834. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.045>
- 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 & Emerging Technologies*, 41, 160–171.
- Pinela, J., Prieto, M. A., Pereira, E., Jabeur, I., Barreiro, M. F., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Optimization of heat- and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* calyces for natural food colorants. *Food Chemistry*, 275(September 2018), 309–321. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.118>
- Rasheed, M., Hussain, I., Rafiq, S., Hayat, I., Qayyum, A., Ishaq, S., & Awan, M. S. (2018). Chemical composition and antioxidant activity of quince fruit pulp collected from different locations. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 2320–2327. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1514631>
- Rocha, R., Pinela, J., Abreu, R. M. V., Añibarro-Ortega, M., Pires, T. C. S. P., Saldanha, A. L., Alves, M. J., Nogueira, A., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2020). Extraction

- of anthocyanins from red raspberry for natural food colorants development: processes optimization and *in vitro* bioactivity. *Processes*, 8(11), 1447.
- Rodríguez-Guisado, I., Hernández, F., Melgarejo, P., Legua, P., Martínez, R., & Martínez, J. J. (2009). Chemical, morphological and organoleptical characterisation of five spanish quince tree clones (*Cydonia oblonga* Miller). *Scientia Horticulturae*, 122(3), 491–496. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.06.004>
- Rop, O., Balík, J., Řezníček, V., Juríková, T., Škardová, P., Salaš, P., Sochor, J., Mlček, J., & Kramářová, D. (2011). Chemical characteristics of fruits of some selected quince (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivars. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(1), 65–73. <https://doi.org/10.17221/212/2009-cjfs>
- Santos-Buelga, C. (2021). Polyphenols and human beings: from epidemiology to molecular targets. *Molecules*, 26(14). <https://doi.org/10.3390/molecules26144218>
- Santos, J. (2013). *Determinação Do Teor De Fibra Alimentar em Produtos Hortofrutícolas* [Universidade de Lisboa]. [https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/6486/1/tese versao definitiva.pdf](https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/6486/1/tese%20versao%20definitiva.pdf)
- Shinomiya, F., Hamauzu, Y., & Kawahara, T. (2009). Anti-allergic effect of a hot-water extract of quince (*Cydonia oblonga*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(8), 1773–1778. <https://doi.org/10.1271/bbb.90130>
- Silva, B. M., Andrade, P. B., Mendes, G. C., Valentão, P., Seabra, R. M., & Ferreira, M. A. (2000). Analysis of phenolic compounds in the evaluation of commercial quince jam authenticity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2853–2857. <https://doi.org/10.1021/jf9911040>
- Silva, Branca M., Andrade, P. B., Ferreres, F., Domingues, A. L., Seabra, R. M., & Ferreira, M. A. (2002). Phenolic profile of quince fruit (*Cydonia oblonga* Miller) (pulp and peel). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4615–4618. <https://doi.org/10.1021/jf0203139>
- Silva, Branca M., Andrade, P. B., Ferreres, F., Seabra, R. M., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, M. A. (2005). Composition of quince (*Cydonia oblonga* Miller) seeds: phenolics, organic acids and free amino acids. *Natural Product Research*, 19(3), 275–281. <https://doi.org/10.1080/14786410410001714678>

- Silva, Branca M., Andrade, P. B., Mendes, G. C., Seabra, R. M., & Ferreira, M. A. (2002). Study of the organic acids composition of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit and jam. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2313–2317. <https://doi.org/10.1021/jf011286+>
- Silva, Branca M., Andrade, P. B., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R. M., & Ferreira, M. A. (2004). Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4705–4712. <https://doi.org/10.1021/jf040057v>
- Silva, Branca M., Andrade, P. B., Valentão, P., Mendes, G. C., Seabra, R. M., & Ferreira, M. A. (2000). Phenolic profile in the evaluation of commercial quince jellies authenticity. *Food Chemistry*, 71(2), 281–285. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00134-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00134-5)
- Silva, F. G., & Oliveira, G. L. (2013). Conhecimento popular e atividade antimicrobiana de *Cydonia oblonga* Miller (Rosaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15(1), 98–103. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000100014>
- Słowiński, M., Miazek, J., Dasiewicz, K., & Chmiel, M. (2021). The effect of the addition of fiber preparations on the color of medium-grounded pasteurized and sterilized model canned meat products. *Molecules*, 26(8). <https://doi.org/10.3390/molecules26082247>
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & Van Griensven, L. J. L. D. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15(11), 7532–7546. <https://doi.org/10.3390/molecules15117532>
- Soković, M., & Van Griensven, L. J. L. D. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology*, 116(3), 211–224. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9053-0>
- Stojanović, B. T., Mitić, S. S., Stojanović, G. S., Mitić, M. N., Kostić, D. A., Paunović, D., Arsić, B. B., & Pavlović, A. N. (2017). Phenolic profiles and metal ions analyses of pulp and peel of fruits and seeds of quince (*Cydonia oblonga* Mill.). *Food Chemistry*, 232, 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.041>

- Stojković, D., Jevremović, K., Smiljković, M., Živković, J., & Soković, M. (2018). Inhibition of microbial biofilm formation by *Cydonia oblonga* Mill. fruit peel and leaf ethanolic extracts. *Lekovite Sirovine*, 38(38), 58–61. <https://doi.org/10.5937/leksir1838058s>
- Szychowski, P. J., Lech, K., Sendra-Nadal, E., Hernández, F., Figiel, A., Wojdyło, A., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2018). Kinetics, biocompounds, antioxidant activity, and sensory attributes of quinces as affected by drying method. *Food Chemistry*, 255(August 2017), 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.075>
- Szychowski, P. J., Munera-Picazo, S., Szumny, A., Carbonell-Barrachina, Á. A., & Hernández, F. (2014). Quality parameters, biocompounds, antioxidant activity and sensory attributes of spanish quinces (*Cydonia oblonga* Miller). *Scientia Horticulturae*, 165, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.028>
- Takebayashi, J., Chen, J., & Tai, A. (2010). A method for evaluation of antioxidant activity based on inhibition of free radical-induced erythrocyte hemolysis. In *Advanced Protocols in Oxidative Stress II, Methods in Molecular Biology* (Vol. 594, pp. 287–296).
- Tamri, P., Hemmati, A., & Boroujerdnia, M. G. (2014). Wound healing properties of quince seed mucilage: *in vivo* evaluation in rabbit full-thickness wound model. *International Journal of Surgery*, 12(8), 843–847. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2014.06.016>
- Tate, & Lyle. (2008). Dossiê: fibras alimentares. In *Food Ingredients Brasil*. [www.revista-fi.com/materias/63.pdf](http://www.revista-fi.com/materias/63.pdf)
- Wojdyło, A., Teleszko, M., & Oszmiański, J. (2014). Antioxidant property and storage stability of quince juice phenolic compounds. *Food Chemistry*, 152, 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.124>
- Zapata, P. J., Martínez-Esplá, A., Gironés-Vilaplana, A., Santos-Lax, D., Noguera-Artiaga, L., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2019). Phenolic, volatile, and sensory profiles of beer enriched by macerating quince fruits. *Lwt*, 103(September 2018), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.002>
- Zhang, L., Rocchetti, G., Zengin, G., Ak, G., Saber, F. R., Montesano, D., & Lucini, L. (2021). The UHPLC-QTOF-MS phenolic profiling and activity of *Cydonia oblonga*

Mill. reveals a promising nutraceutical potential. *Foods*, 10(6).  
<https://doi.org/10.3390/foods10061230>



## ANEXOS

$$\text{Rendimento (\% m/m)} = \frac{\text{massa de extrato seco (g)}}{\text{massa de material vegetal (g)}} \times 100$$

**Equação A1.** Equação utilizada para calcular o rendimento de extração (% , *m/m*).

$$\text{Fibra (\%)} = \frac{(R - P - C)}{MA} \times 100$$

**Equação A2.** Equação utilizada para calcular o teor de fibra alimentar (%). MA: massa da amostra; R: conteúdo de resíduos digeridos; P: conteúdo de proteínas; C: conteúdo de cinzas.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{P_2 - P_1}{P_0} \times 100$$

**Equação A3.** Equação utilizada para calcular o teor de cinzas (%). P<sub>0</sub>: 250 mg de amostra no crisol de porcelana; P<sub>1</sub>: massa do crisol de porcelana seco e limpo; P<sub>2</sub>: massa do crisol de porcelana após dessecar.

$$\text{Porcentagem de inibição (\%)} = \frac{AC - AE}{AC} \times 100$$

**Equação A4.** Equação utilizada para determinar a inibição da peroxidação lipídica (%). AC: absorvância do controle; AE: absorvância da solução de extrato.

$$\text{População de eritrócitos intacta (\%)} = \left( \frac{S_t - CH_0}{S_0 - CH_0} \right) \times 100$$

**Equação A5.** Equação utilizada para determinar os eritrócitos que permaneceram intactos (%). S<sub>t</sub> e S<sub>0</sub>: densidade ótica da solução de extrato nos instantes *t* e 0 min, respetivamente; CH<sub>0</sub>: densidade ótica da mistura onde ocorreu hemólise completa (promovida pela adição de água destilada) no tempo 0 (primeira leitura).

$$\Delta t \text{ (min)} = Ht_{50}(\text{amostra}) - Ht_{50}(\text{controle})$$

**Equação A6.** Equação utilizada para calcular o tempo de atraso de hemólise; Ht<sub>50</sub>: tempo (min) correspondente a 50% de hemólise obtido graficamente a partir da curva de hemólise de cada uma das concentrações de extrato e do controle (PBS).

**Tabela A1.** Condições ótimas de extração para compostos de alto valor agregado e outros constituintes dos extratos de casca de marmelo e respectivos valores de resposta ótimos.

Respostas	Condições ótimas de processamento			Resposta ótima
	$X_1: t$ (min)	$X_2: T$ (°C)	$X_3: S$ (% v/v)	Valores previstos pelo modelo
<i>Condições individuais para cada resposta</i>				
Rendimento EB	66,4	26,7	33,4	69 ± 2% (m/m)
Compostos fenólicos	64,2	88,0	0,0	10,6 ± 0,2 mg/g
Compostos fenólicos #	8,5	34,9	39,5	9,6 ± 0,2 mg/g
Ácidos fenólicos	114,3	82,8	36,3	4,1 ± 0,1 mg/g
Flavan-3-óis	40,4	85,9	0,0	4,7 ± 0,2 mg/g
Flavonóis	10,6	52,8	0,0	2,31 ± 0,03 mg/g
Ácido málico	87,7	92,7	54,4	7,9 ± 0,3 g/100 g
Ácido málico #	10,0	44,4	26,5	6,1 ± 0,3 g/100 g
Ácido quínico	96,7	91,8	8,5	0,74 ± 0,07 g/100 g
Ácidos orgânicos	89,2	92,5	56,2	8,2 ± 0,3 g/100 g
Frutose	1,0	69,2	0,0	43,7 ± 0,7 g/100 g
Glucose	7,4	36,5	34,1	14,3 ± 0,5 g/100 g
Sacarose	18,4	76,7	16,8	7,8 ± 0,3 g/100 g
Açúcares solúveis	5,01	70,7	0,0	65 ± 1 g/100 g
Rendimento ECF	69,1	61,3	99,9	64 ± 2% (m/m)
Fibra alimentar	-	92,2	35,5	67 ± 1 g/100 g
Luminosidade ( $L^*$ )	-	65,9	99,2	71 ± 1 (0–100)

O erro padrão foi mantido “dentro do intervalo” em todos os casos.

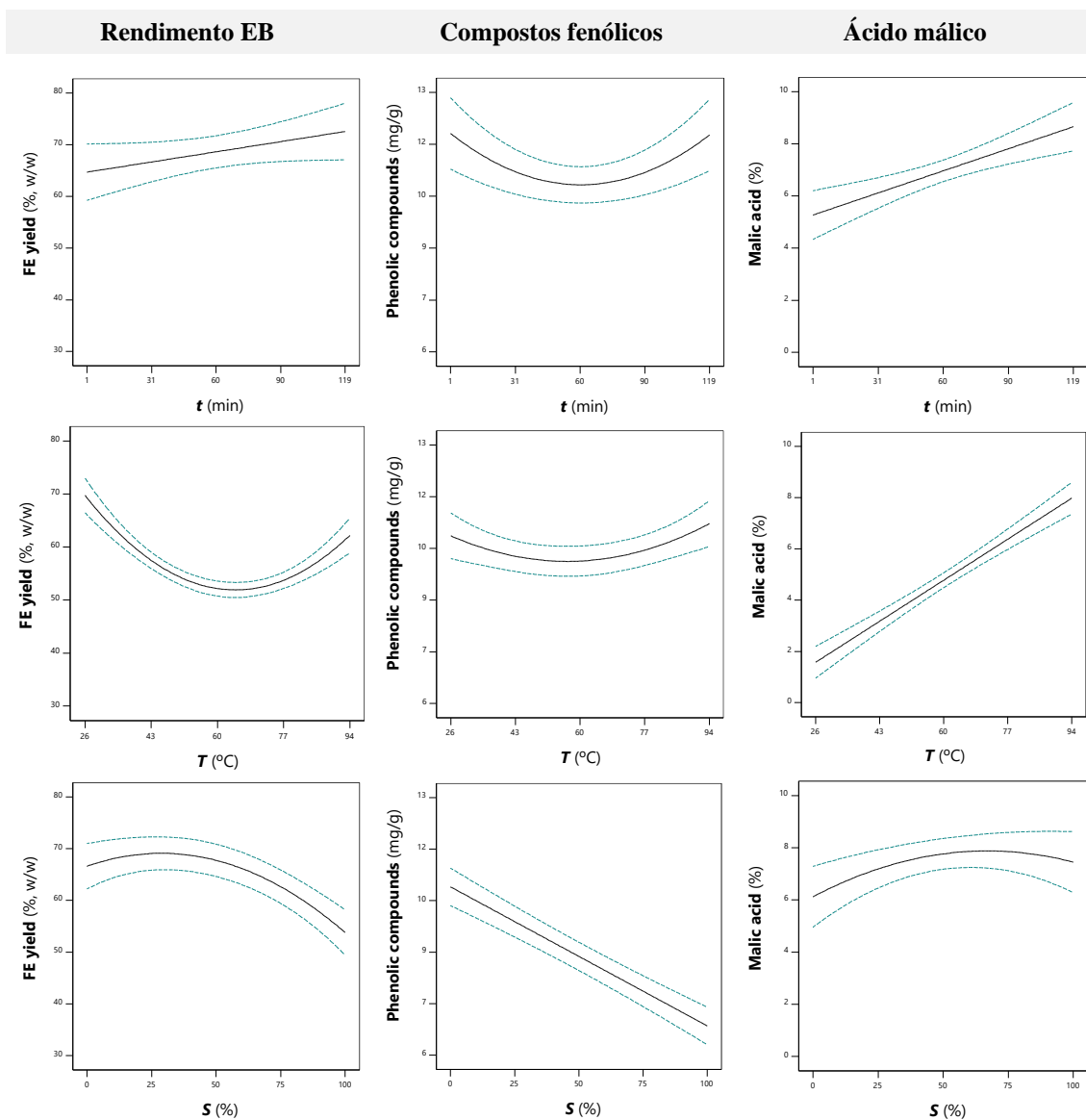
# Condições de extração obtidas minimizando os valores de tempo e temperatura.

- A variável não foi significativa ( $p < 0,05$ ).

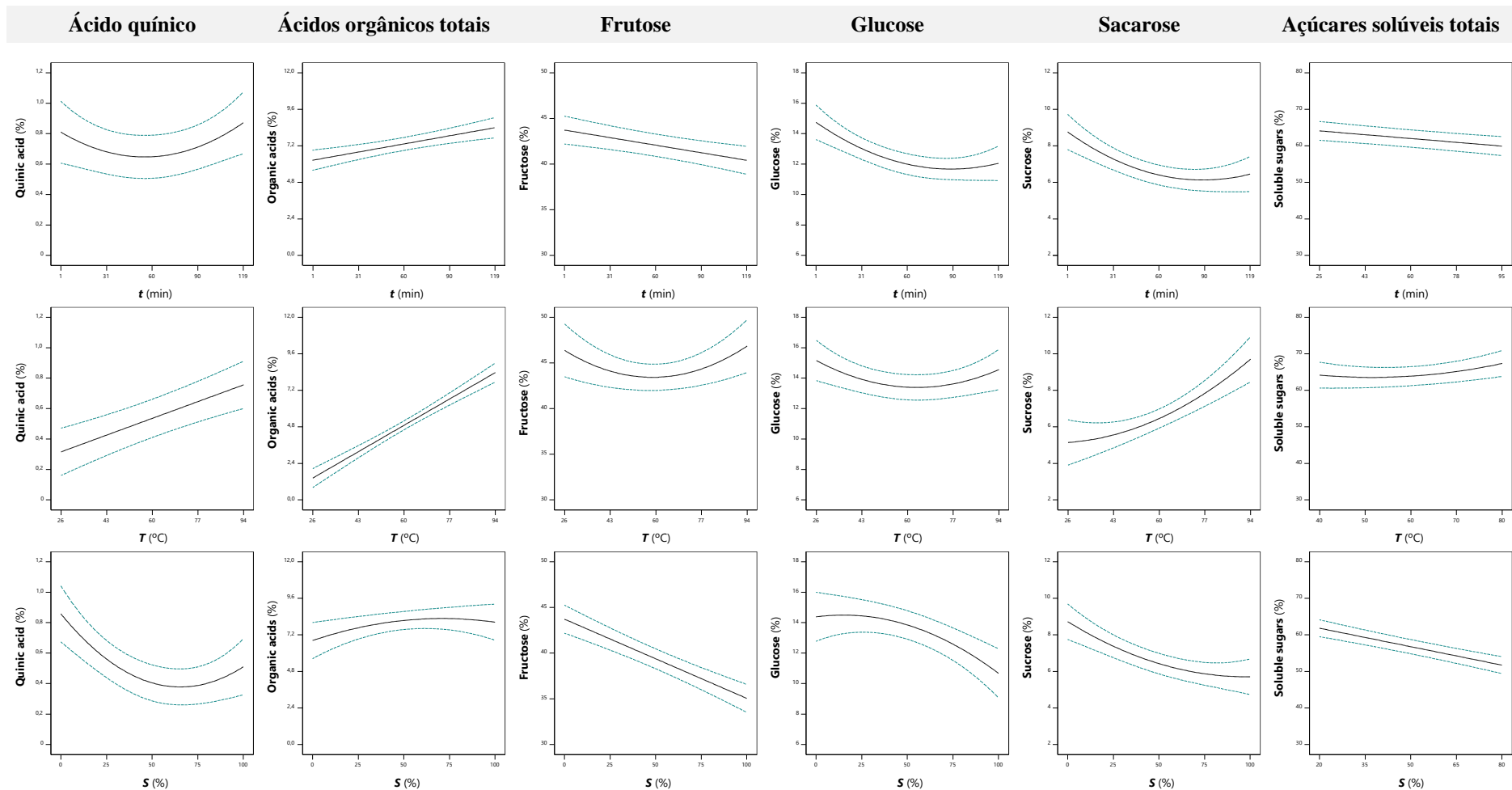
**Tabela A2.** Coeficientes de correlação de Pearson (*R*) dos constituintes do extrato com atividade antioxidante.

		TBARS	OxHLIA	
			$\Delta t$ 60 min	$\Delta t$ 120 min
Compostos fenólicos	R	0,654	-0,207	0,0117
	Sig.	0,056	0,593	0,763
Ácidos fenólicos	R	<b>-0,754</b>	<b>-0,566</b>	<b>-0,720</b>
	Sig.	0,019	0,112	0,029
Flavan-3-óis	R	0,864**	0,103	0,427
	Sig.	0,003	0,792	0,252
Flavonóis	R	0,777*	-0,109	0,236
	Sig.	0,014	0,780	0,542
Ácido málico	R	<b>-0,964</b>	<b>-0,660</b>	<b>-0,875</b>
	Sig.	0,000	0,053	0,002

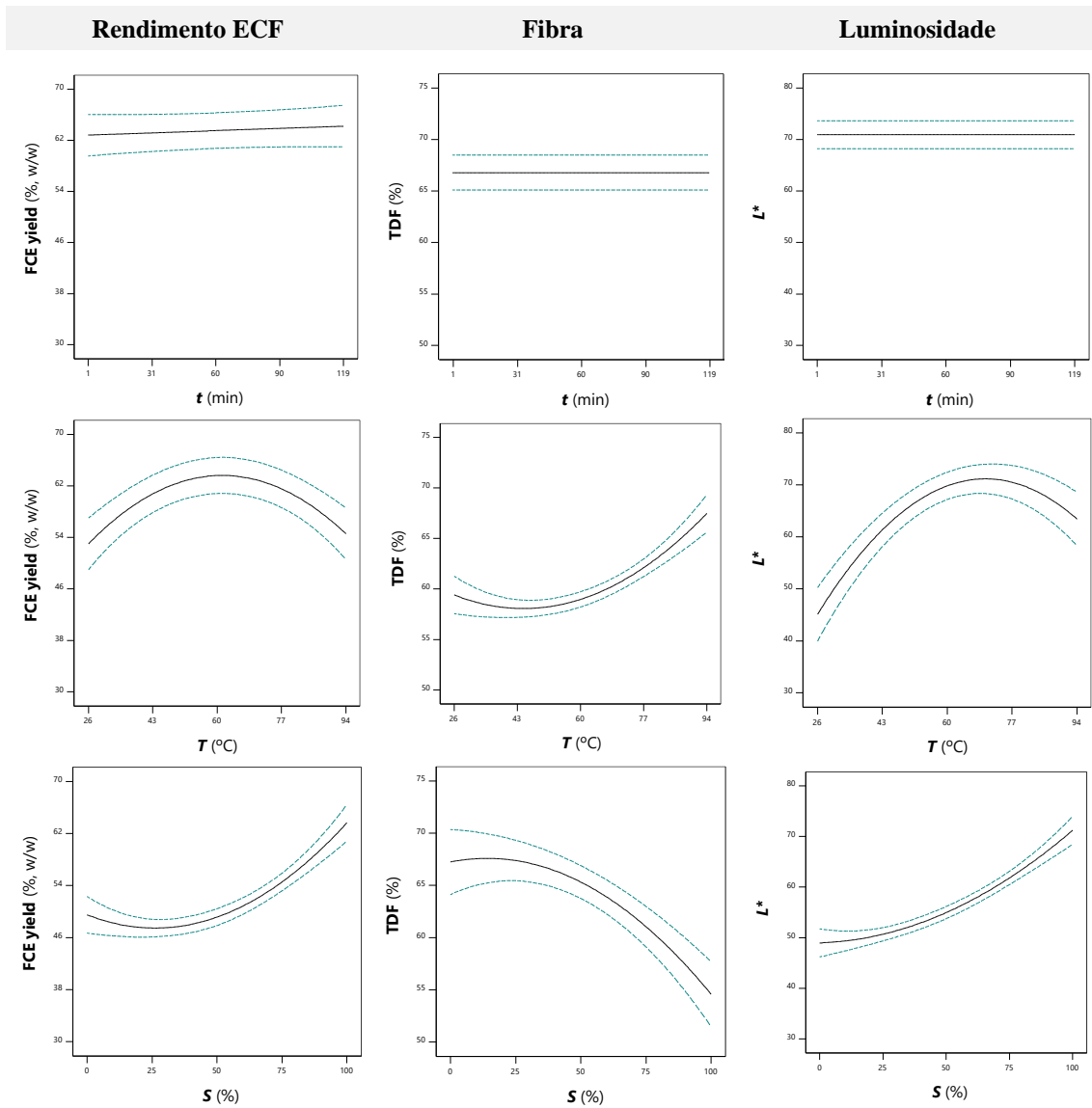
Correlação muito forte:  $\geq 0,9$  (■); Correlation forte: 0,7–0,9 (■); Correlação moderada: 0,5–0,7 (□).



**Figura A1.** Gráficos de resposta para os efeitos de cada variável independente no rendimento de EB e teores de compostos fenólicos e ácido málico obtidos da casca de marmelo. Em cada gráfico 2D, as variáveis excluídas foram fixadas no seu valor ótimo.



**Figura A2.** Gráficos de resposta para os efeitos de cada variável independente na extração de ácidos orgânicos e açúcares solúveis da casca de marmelo. Em cada gráfico 2D, as variáveis excluídas foram fixadas no seu valor ótimo.



**Figura A3.** Gráficos de resposta para os efeitos de cada variável independente no rendimento de ECF, teor de fibra bruta e luminosidade de ECF resultante da extração de casca de marmelo. Em cada gráfico 2D, as variáveis excluídas foram fixadas no seu valor ótimo.