

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas e instituições que tornaram possível a realização deste trabalho.

Agradeço à Bicafé, pela cedência das amostras, em especial à Eng.^a Graça pela disponibilidade demonstrada durante a realização deste trabalho.

A todos, muito obrigado.

Resumo

A valorização de resíduos agroalimentares em subprodutos de valor acrescentado é uma necessidade premente numa sociedade que visa a sustentabilidade ambiental, social e económica. Deste modo, promove-se a redução dos lixos a tratar, obtendo-se mais-valias onde só se tinha despesa.

O estudo que se apresenta usou a pele de prata do café, um subproduto da indústria alimentar (sem valor acrescentado), como possível fonte de compostos bioativos com ação antioxidante.

Estudou-se o efeito das principais variáveis que afetam os rendimentos de extração e a atividade antioxidante dos extratos, nomeadamente a polaridade dos solventes, a temperatura e o tempo de extração.

Quantificou-se o teor em compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos, bem como a atividade antioxidante, por métodos espectrofotométricos. A atividade antioxidante foi determinada pelo método do poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP) e pela capacidade de neutralização do radical DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo).

Os resultados mostraram que a composição dos extratos variou significativamente com as condições utilizadas. No entanto, é possível obter uma solução de compromisso entre os vários métodos de extração e os parâmetros analisados: a extração com 50% de etanol e 50% de água, durante 60 minutos, à temperatura de 40°C, permite a obtenção de extratos mais ricos em compostos fenólicos e, simultaneamente, com uma elevada capacidade antioxidante. Estas condições permitem, comparativamente com outras “mais eficazes” para um ou outro parâmetro, uma redução de custos, por economia de tempo e de energia.

Palavras – chave: pele de prata, compostos bioativos, atividade antioxidante, sustentabilidade.

Abstract

Recovery of waste and added value by-products in the food industry is mandatory in a society that aims environmental, social and economic sustainability. It promotes waste reduction, and gains instead of expenses.

In the present study, we used coffee silverskin, a by-product (with no added value) of coffee roast industry, as a possible source of bioactive compounds with antioxidant activity.

We studied the effect of the major variables affecting the yields of extraction and antioxidant activity of the extracts, including the polarity of solvents, temperature and extraction time.

Flavonoids, tannins and total phenolic contents, as well as antioxidant activity, were evaluated by spectrophotometric methods. Antioxidant activity was determined by using both the ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH•) assays.

The results showed that the extracts composition varied significantly with the extraction conditions used. However, it was possible to obtain a compromise between the several extraction methods and the analyzed parameters. Extraction with 50% ethanol and 50% water for 60 minutes at 40 °C resulted in extracts with a high content of phenolic compounds and, simultaneously, high antioxidant capacity. These conditions allowed, in comparison with other "more effective" for individual parameters, a cost reduction, saving time and energy.

Keywords: silverskin, bioactive compounds, antioxidant activity, sustainability.

Índice

AGRADECIMENTOS	1
ABSTRACT	3
ÍNDICE DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
INTRODUÇÃO	11
1. Enquadramento Teórico.....	11
2. Antioxidantes	12
2.1. Compostos fenólicos.....	14
2.1.1. Flavonoides	16
2.1.2. Taninos.....	17
3. Atividade antioxidante.....	18
4. Extração de compostos bioativos.....	19
5. Café.....	20
5.1. Subprodutos do café	21
5.1.1. Cascas e polpa do fruto	22
5.1.2. Borra de café.....	22
5.1.3. Pele de prata.....	22

OBJETIVOS.....	23
MATERIAL E MÉTODOS	24
1. Amostras.....	24
2. Reagentes.....	24
3. Equipamentos.....	25
4. Extração de compostos bioativos	25
4.1. Preparação da amostra.....	25
5. Determinação de compostos bioativos	28
5.1. Compostos fenólicos totais.....	28
5.2. Flavonoides totais.....	29
5.3. Taninos totais.....	30
5.4. Atividade antioxidante.....	30
5.4.1. DPPH•	30
5.4.2. FRAP	31
6. Análise estatística	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO	45
BIBLIOGRAFIA	46

ANEXOS.....	56
--------------------	-----------

Índice de Figuras

Fig. 1 - Classificação dos antioxidantes. Adaptado de Ratnam <i>et al.</i> , 2006	13
Fig. 2 - Produção de café em 2011/12 por continente.....	20
Fig. 3 - Corte transversal e longitudinal do fruto do cafeeiro	21
Fig. 4 - Amostras cedidas para estudo.....	24
Fig. 5 - Amostra A1 moída.....	24
Fig. 6 - Amostra (A1) em diferentes relações de amostra e solvente.....	26
Fig. 7 - Amostra 1 com a relação 1:10 (m/v).....	26
Fig. 8 - Amostra 1 com a relação 1:25 (m/v).....	26
Fig. 9 - Amostra 1 com a relação 1:50 (m/v)	26
Fig. 10 - Extração de compostos bioativos da pele de prata	27
Fig. 11 - Filtração de extratos.....	27
Fig. 12 - Extratos da pele de prata preparados usando diferentes condições extrativas.....	28
Fig. 13 - Curva de calibração de ácido gálico, utilizada para determinar os compostos fenólicos totais dos extratos	29
Fig. 14 - Curva de calibração de epicatequina, utilizada para determinar os flavonoides totais dos extratos.....	29
Fig. 15 - Curva de calibração de ácido tânico, utilizada para determinar os taninos totais dos extratos	30
Fig. 16 - Curva de calibração utilizada para determinar a capacidade de neutralização de radicais livres (DPPH) dos extratos	31
Fig. 17 - Curva de calibração utilizada para determinar a poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP) dos extratos	32
Fig. 18 - Extração de compostos fenólicos à temperatura ambiente, fazendo variar o solvente ao longo do tempo.....	34
Fig. 19 - Extração de compostos fenólicos à temperatura de 30 °C, fazendo variar o solvente ao longo do tempo.....	34
Fig. 20 - Extração de compostos fenólicos à temperatura de 40 °C, fazendo variar o solvente ao longo do tempo.....	35
Fig. 21 - Extração de compostos fenólicos à temperatura de 50 °C, fazendo variar o solvente ao longo do tempo.....	35
Fig. 22 - Extração de compostos fenólicos à temperatura de 60 °C, fazendo variar o solvente ao longo do tempo.....	36
Fig. 23 - Extração de compostos com poder redutor, fazendo variar o solvente à temperatura de ambiente e ao longo do tempo de extração	39
Fig. 24 - Extração de compostos com poder redutor, fazendo variar o solvente à temperatura de 30 °C, e ao longo do tempo de extração	40
Fig. 25 - Extração de compostos com poder redutor, fazendo variar o solvente à temperatura de 40 °C, e ao longo do tempo de extração	40
Fig. 26 - Extração de compostos com poder redutor, fazendo variar o solvente à temperatura de 50 °C, e ao longo do tempo de extração	41

Fig. 27 - Extração de compostos com poder redutor, fazendo variar o solvente à temperatura de 60 °C, e ao longo do tempo de extração 41

Índice de Tabelas

Tab. 1- Descrição das amostras.....	24
Tab. 2 - Melhores condições de extração para a obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos totais (EAG: equivalentes em ácido gálgico)	37
Tab. 3 - Melhores condições de extração para a obtenção de extratos ricos em flavonoides (EE: equivalentes em epicatequina)	37
Tab. 4 - Melhores condições de extração para a obtenção de extratos com elevada atividade anti-radicalar contra o DPPH • (ET: equivalentes em trolox)	38
Tab. 5 - Melhores condições de extração para a obtenção de extratos com elevado poder redutor	39
Tab. 6 - Resultados dos compostos bioativos, extraídos com o solvente 50% etanol e 50% água, das amostras à temperatura de 40 °C e 50 °C durante um período de extração de 60 e 90 minutos	42

Lista de Abreviaturas

ADN (ácido desoxirribonucleico)

AlCl₃ (cloreto de alumínio)

BHA (mistura dos isómeros 2-terc-butil-4-metoxifenol e 3-terc-butil-4-metoxifenol)

BHT (di-*terc*-butilmetilfenol)

DPPH[•] (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)

EAG (equivalentes ácido gálgico)

EC (epicatequina)

e.g. (*exempli gratia*)

eNOS (óxido nítrico endotelial)

HO[•] (radical hidroxilo)

HO₂[•] (radical hidroperoxilo)

¹O₂ (singleto de oxigénio)

O₂^{-•} (anião superóxido)

RFC (reagente Folin-Ciocalteu)

RNS (espécies reativas de azoto)

RO[•] (radical alcoxilo)

ROO[•] (radical peroxilo)

ROS (espécies reativas de oxigénio)

SOD (superóxido dismutase)

Introdução

1. Enquadramento Teórico

Atualmente garantir o fornecimento de alimentos a toda a população é um desafio global. Encontrar novas fontes sustentáveis, matérias-primas e processos para responder às necessidades crescentes, é fundamental. Urge criar sinergias e oportunidades entre os diversos setores.

Atingir um desenvolvimento sustentável, isto é, que responda às necessidades das gerações atuais, sem comprometer o futuro das próximas (Bond e Morrison-Saunders, 2011), tornou-se uma prioridade das entidades governamentais. Simultaneamente, a sensibilização do consumidor perante o uso pouco adequado das matérias-primas e respetivos resíduos tem vindo a intensificar-se. Está cada vez mais preocupado e atento com o impacto do processamento e distribuição dos alimentos na sua saúde. Está mais crítico e exigente e quer ser informado acerca das origens e processos de produção dos alimentos que consome, os níveis de segurança, a higiene, a presença de produtos químicos e outras questões ambientais associadas (Falguera, *et al.*, 2012).

Está a tornar-se comum considerar a qualidade, a segurança e a conformidade ambiental nas decisões de aquisição dos produtos. Por outro lado, os produtores têm de responder a estes requisitos, aumentando a sustentabilidade dos processos e produtos. Devem tentar incluir na informação sobre o produto os impactes na saúde e segurança dos consumidores e no ambiente, sempre num contexto económico aceitável. Economicamente, a utilização de processos sustentáveis deve repercutir-se na redução de custos/aumento de receita (Wognum *et al.*, 2011).

No setor agroalimentar são inúmeros os resíduos produzidos e rejeitados com teores consideráveis de compostos bioativos. No entanto, há já inúmeros exemplos de obtenção de compostos bioativos a partir de diferentes subprodutos, tal como casca e pele de avelã (Contini *et al.*, 2008; Locatelli *et al.*, 2010), casca de amêndoa (Pinelo *et al.*, 2004; Mandalari *et al.*, 2010) e casca de pistácio (Rajaei *et al.*, 2010). Também os subprodutos do azeite foram alvo de estudo, caso das águas ruças que podem ser incorporadas na produção de tijolos em Sfax na Tunísia (Mekki *et al.*, 2008), ou mesmo na rega dos solos, sendo uma mais-valia, tendo em conta que esta matriz é

rica em matéria orgânica e sais minerais (Cabrera *et al.*, 1996). As folhas da oliveira fornecem extratos com elevada capacidade antioxidante (Herrero *et al.*, 2011). Os subprodutos da cebola também foram estudados e mostraram-se ricos em antioxidantes. A casca da manga foi também alvo de estudo, tendo sido identificados, nos extratos obtidos, diferentes compostos fenólicos e carotenoides, com várias aplicações possíveis na indústria farmacêutica (Ajila *et al.*, 2010). Desta forma, é possível obter benefícios, com redução da quantidade de "resíduo" (questão ambiental) e, simultaneamente, obter ingredientes funcionais com possível aplicação na indústria alimentar, em alimentos processados, ou noutras indústrias (Roldán *et al.*, 2008).

Os compostos bioativos, de natureza antioxidante, naturalmente presentes nos alimentos e subprodutos, têm despertado interesse devido aos efeitos benéficos na saúde e bem-estar, e ainda na prevenção de doenças.

2. Antioxidantes

Estudos epidemiológicos demonstraram uma relação direta entre o consumo de produtos ricos em antioxidantes e a diminuição da morbilidade e mortalidade (Huang *et al.*, 2005). As evidências que implicam o stresse oxidativo no desenvolvimento de diversas doenças e desequilíbrios conduzem ao reconhecimento do papel dos antioxidantes na preservação da saúde humana e na prevenção e ajuda no tratamento de doenças (Niki, 2010).

Os compostos antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de retardar ou mesmo inibir substancialmente a oxidação do substrato (Niki, 2010).

Existem duas categorias de antioxidantes, os de origem natural e os designados sintéticos (Cheung *et al.*, 2003).

Na indústria alimentar, a prática da adição de antioxidantes de natureza sintética, como o 2- ou 3-*terc*-butil-4-metoxifenol (BHA) e o di-*terc*-butilmetilfenol (BHT), tem sido frequente para a preservação de alimentos. No entanto, paralelamente têm sido descritas propriedades carcinogénicas, perante o consumo destes tipos de antioxidantes. Desta forma, alguns investigadores defendem a sua substituição por antioxidantes naturais. (Contini, *et al.*, 2008; Dudonné *et al.*, 2009).

Os antioxidantes naturais dividem-se em dois grandes grupos, os enzimáticos e os não enzimáticos (Figura 1). Os antioxidantes enzimáticos incluem as principais enzimas antioxidantes, como as superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Alguns exemplos de antioxidantes não enzimáticos incluem a vitamina C, compostos fenólicos hidrossolúveis e compostos lipossolúveis (vitamina E e carotenoides) (Ratnam *et al.*, 2006; Ndhlala *et al.*, 2010). Ao longo deste trabalho será dado mais ênfase ao grupo dos não enzimáticos, mais especificamente, aos polifenóis.

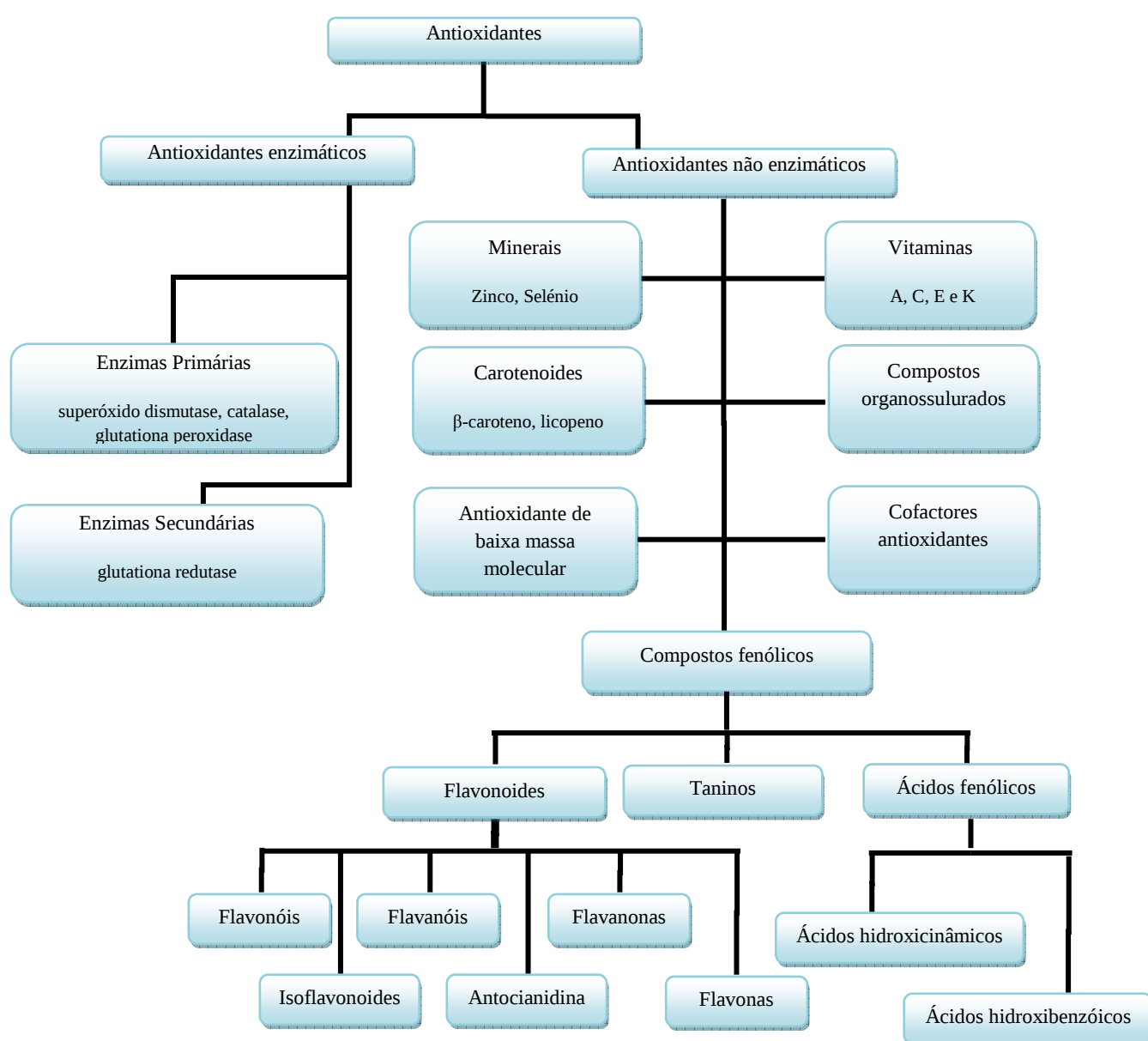


Fig. 1 - Classificação dos antioxidantes. Adaptado de Ratnam *et al.*, 2006

2.1. Compostos fenólicos

O grupo dos compostos fenólicos inclui os ácidos fenólicos (constituídos pelos ácidos hidroxibenzóicos (por ex. ácido gálico) e ácidos hidroxicinâmicos (por ex. ácido cafeico)), estilbenos (resveratrol), flavonoides (quercetina, cianidina e catequina) e compostos altamente polimerizados (lenhinas, melaninas e taninos) (Silva *et al.*, 2007).

As propriedades antioxidantes destes compostos consistem em retardar a oxidação de vários compostos "importantes para a vida", inibindo a iniciação ou a propagação de reações em cadeia (Amarowicz *et al.*, 2004). A sua presença contribui, ainda, para as características sensoriais dos alimentos, como a cor, o sabor e o aroma. Estão presentes em vários alimentos como os hortofrutícolas, chá verde e chá preto, café, azeite, vinho e chocolate, em quantidades apreciáveis (Silva *et al.*, 2007).

É necessário compreender as suas funções biológicas e o seu modo de atuar, tendo em conta a sua importância na alimentação humana. Desta forma, o interesse pelos compostos fenólicos tem aumentado de forma evidente, não só pela sua capacidade de neutralizar radicais livres associados a doenças, evidenciada por estudos que incluem ensaios da atividade antioxidante *in vitro* (Fresco *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2007). A nível cardiovascular, demonstraram efeito vasodilatador, sendo esta propriedade atribuída à capacidade que os polifenóis têm de aumentar a atividade da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) em mais de 400% (Nathan e Brumaghim, 2009).

Um ensaio comum consiste na quantificação dos compostos fenólicos totais, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (RFC). A natureza química exata do RFC não é conhecida, mas é genericamente aceite como complexos de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico. A química associada ao ensaio RFC é suportada na transferência de eletrões em meio alcalino de compostos fenólicos e outras espécies redutoras para o molibdénio, formando complexos azuis que podem ser monitorizados espectrofotometricamente a 750-765 nm (Magalhães *et al.*, 2008). Os compostos fenólicos reagem com o RFC apenas em condições alcalinas (conseguidas pela adição de uma solução de carbonato de sódio, que eleva o valor de pH até próximo de 10) (MacDonald-Wicks *et al.*, 2006). Singleton e Rossi aplicaram este ensaio à análise de fenóis totais em vinho e desde então outras matrizes têm sido estudadas (Huang *et al.*, 2005).

De forma a eliminar os resultados inconsistentes os mesmos investigadores especificaram as condições que minimizam a variabilidade:

- i. volume apropriado de base e RFC;
- ii. tempo e temperatura ideais para o desenvolvimento da cor;
- iii. monitorização da absorvância, permitindo a diminuição das interferências da amostra, que é muitas vezes corada;
- iv. utilização de padrões de referência como o ácido gálico (Prior *et al.*, 2005).

Apesar da natureza química indefinida do RFC, o ensaio de avaliação do teor de fenóis totais por este método é útil, simples e reprodutível (Huang *et al.*, 2005). Tem sido descrito com ensaios de capacidade antioxidante, sendo encontradas com frequência boas correlações lineares entre os perfis de fenóis totais e a atividade antioxidante (Karadag *et al.*, 2009). No entanto, apresenta algumas limitações como, por exemplo, o facto de outros padrões de referência (equivalentes em catequina, ácido tânico, ácido clorogénico, ácido cafeico e ácido ferúlico) terem sido utilizados, podendo esta falta de padronização conduzir a diferentes resultados. Além do mais, a absorvância final é, normalmente, proporcional ao número de grupos hidroxilo (HO•) fenólicos reativos, dependendo por isso da estrutura da molécula. Por outro lado, apesar de ser conhecido como ensaio de fenóis totais, o RFC não é específico para compostos fenólicos, uma vez que pode ser reduzido por muitos compostos não fenólicos, nomeadamente ácido ascórbico e açúcares redutores. Ao ser feito em meio aquoso, não tem aplicação em antioxidantes lipofílicos. Na verdade, o RFC mede a capacidade redutora de uma amostra, o que não é refletido na sua denominação (Karadag *et al.*, 2009). Para identificar e quantificar com maior rigor compostos fenólicos deverão utilizar-se técnicas cromatográficas, eventualmente adjuvadas por espetrometria de massa ou ressonância magnética nuclear.

Deste grande grupo de compostos, os flavonoides e os taninos foram estudados em particular.

2.1.1. Flavonoides

São os responsáveis pelas cores de plantas e frutos, contribuindo para a qualidade sensorial dos alimentos e bebidas (Harborne e Williams, 2000).

Os flavonoides são constituídos por um número alargado de famílias de compostos como os flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides (Ratnam *et al.*, 2006).

Estes compostos estão mesmo entre as moléculas com maior atividade antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1997; Robards *et al.*, 1999).

A posição do grupo HO^{*} na estrutura da molécula é crucial para as propriedades antioxidantes dos flavonoides. Para além da capacidade de ceder átomos de hidrogénio (H) ou eletrões, aos radicais livres, os flavonoides e, em particular, as isoflavonas, poderão exercer os seus efeitos através de mecanismos como a modulação das vias de sinalização celular, interações com a mitocôndria e alterações na expressão genética (Hernandez-Montes *et al.*, 2006).

Estudos descreveram benefícios para a saúde aquando do consumo de alimentos ricos em flavonoides, referindo melhorias na função cognitiva e atividade antidepressiva (Samman *et al.*, 2003). As isoflavonas são responsáveis pela prevenção de doenças como o cancro (Bektic *et al.*, 2005; Gikas e Mokbel, 2005), doenças cardiovasculares (Omoni e Aluko, 2005) e osteoporose (Weaver e Cheong, 2005). A estimulação de enzimas como a catalase, a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase e a glutathione redutase poderá estar relacionada com a capacidade das isoflavonas aumentarem as defesas antioxidantes da célula (Suzuki *et al.*, 2002).

Para além das suas propriedades biológicas, os flavonoides também são de grande interesse na alimentação, cosmética, e na indústria farmacêutica, devido ao facto de poderem ser usados como substitutos de antioxidantes sintéticos.

Atualmente, os teores em flavonoides de extratos vegetais são determinados, com frequência, seguindo um método colorimétrico. Neste método, a amostra é misturada com um reagente contendo cloreto de alumínio e nitrito de sódio, sendo formado um complexo flavonoide-alumínio de cor rosa em meio alcalino (Jia *et al.*, 1999). O AlCl₃ começou por ser utilizado na deteção de antocianinas. A partir da década de 60 do século XX, passou a ser largamente utilizado como reagente de desvios ("shift reagent") em espectrofotometria UV/Vis para a determinação estrutural de flavonoides, sendo posteriormente aplicado à determinação de flavonoides totais em plantas

(Vennat *et al.*, 1992). O Al^{3+} forma complexos estáveis com os flavonoides em metanol, ocorrendo um desvio para maiores comprimentos de onda (batocrómico) e uma intensificação da absorção. Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com $AlCl_3$, absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira, interferências nas medidas de absorvância. Assim, é possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos. No entanto, apesar do método fornecer desvios muito pequenos ou nulos entre ensaios com a mesma amostra, pode ser pouco exato, fornecendo valores diferentes (geralmente inferiores) em relação à quantidade de flavonoides totais realmente presente na amostra analisada (Chang *et al.*, 2002).

2.1.2. Taninos

São compostos fenólicos de grande interesse económico e ecológico que tem sido alvo de diversos estudos.

Segundo Haslam, os taninos são os compostos fenólicos com maior massa molecular (Haslam, 1998) e com grande capacidade de interagir com as proteínas salivares, dando origem a complexos insolúveis que provocam a sensação de adstringência (Soares *et al.*, 2012).

De acordo com a sua estrutura química, distinguem-se dois grandes grupos de taninos: os hidrolisáveis e os condensados (Okuda, 2005).

Os taninos condensados são muito mais comuns que os taninos hidrolisáveis (Santos-Buelga e Scalbert, 2000). Estes tipos de taninos são polímeros constituídos por unidades de flavanóis (Schofield, *et al.*, 2001).

Estes compostos estão presentes em concentrações relativamente importantes em frutos tais como a uva e maçãs e bebidas derivadas dos mesmos, no cacau e chocolate, entre outros (Santos-Buelga *et al.*, 2000).

Os taninos hidrolisáveis podem ser divididos em taninos gállicos e taninos elágicos (Chung *et al.*, 1998). Comparativamente com os taninos gállicos, os elágicos, também conhecidos por elagitaninos, são mais abundantes na natureza, e podem fazer parte da dieta através do consumo de um grupo restrito de frutos, tais como, a framboesa, morangos, amoras e castanha e de alguns frutos secos tais como avelã, caju e

pistácio. No caso dos frutos secos a maior concentração destes compostos encontra-se na parte não edível (casca e pele), pelo que o consumo deste tipo de taninos é muito baixo (Clifford e Scalbert, 2010).

As propriedades antimicrobianas dos taninos estão bem documentadas, tendo sido relatada a inibição do crescimento de bactérias, bolores, leveduras e vírus (Scalbert, 1991; Aerts *et al.*, 1999). Na indústria alimentar, os taninos são utilizados para clarificar vinhos, cervejas e sumos (Khanbabaee e van Ree, 2001). A utilização do ácido tânico no processamento e conservação de alguns produtos alimentares permite prolongar o tempo de prateleira (Chung *et al.*, 1998).

3. Atividade antioxidante

A literatura revela o interesse que existe nos antioxidantes e na sua capacidade de prevenir doenças provocadas pelo stresse oxidativo.

Atualmente a sociedade é movida pelo consumo exagerado de alimentos muito calóricos, associada à ausência de exercício físico regular e a uma vida sem horários, o que faz com que o organismo se manifeste aumentando a atividade metabólica. Durante este processo são formadas espécies reativas (Gomez-Pinilla e Nguyen, 2012) que podem ser genericamente divididas em espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de azoto (RNS) (Ferreira e Abreu, 2007).

As ROS incluem não apenas radicais livres como o $O_2^{\bullet-}$, o radical hidroperoxilo $HO_2^{\bullet-}$, o radical $HO^{\bullet}$, o radical peroxilo ($ROO^{\bullet}$) e o alcóxido $RO^{\bullet}$, mas também não radicais como o H_2O_2 , 1O_2 e o ácido hipocloroso (HClO).

As ROS podem reagir com componentes das células como a parede celular, os lípidos membranares, a mitocôndria e o ADN (Temple, 2000). O excesso de ROS no organismo pode provocar danos cumulativos nas proteínas, lípidos e ADN, resultando no designado stresse oxidativo, que pode ser definido como o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes (Fang *et al.*, 2002; Dudonné *et al.*, 2009).

O stresse oxidativo induzido por estes radicais é considerado um fator primário nas doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (Markesbery e Lovell, 2006; Gomez-Pinilla e Nguyen, 2012), doenças cardiovasculares como a aterosclerose (Vokurkova *et al.*, 2007; Bhattacharya, *et al.*, 2011), sendo também a causa principal

da morte celular e lesões tecidulares resultantes de enfartes do miocárdio (Ide *et al.*, 2001), processos inflamatórios e envelhecimento (Wang *et al.*, 2007) e cancro (Barnett *et al.*, 2006; Huang, 2003). Mais recentemente, foi demonstrado que o stresse oxidativo também pode ser a causa da diabetes tipo II (Dogru *et al.*, 2012). Além disso, existem cada vez mais evidências de que as lesões dérmicas induzidas pela radiação UV envolvem a geração de ROS e RNS, resultando em modificações estruturais e funcionais no tecido cutâneo (Herrling *et al.*, 2006).

A atividade dos antioxidantes referidos é de extrema importância, uma vez que o seu papel na preservação da saúde humana, na prevenção e ajuda no tratamento de doenças tem sido evidenciado. Vários métodos foram desenvolvidos para medir a eficácia antioxidante. As suas vantagens e desvantagens têm vindo a ser discutidas em termos de simplicidade, instrumentação necessária, mecanismos, método de quantificação e relevância biológica (Niki, 2010). Frequentemente recorre-se à espectrofotometria UV/Vis convencional para avaliar a capacidade dos antioxidantes para a captação de radicais livres (Niki, 2010).

4. Extração de compostos bioativos

Durante a pesquisa bibliográfica, verificou-se a existência de inúmeros estudos acerca da extração de compostos bioativos. Contudo, também se verificou que a maior parte desses estudos valorizava apenas a quantidade de compostos extraídos, utilizando vários tipos de solventes.

Foram utilizados solventes simples como acetato de etilo (Pinelo *et al.*, 2005; Russell *et al.*, 2008; Goulas, *et al.*, 2012), éter dietílico (Ross *et al.*, 2009), éter de petróleo (Sharififar *et al.*, 2009), isopropanol (Murthy e Naidu, 2010), hexano (Alonso Garcia *et al.*, 2004; Goulas, *et al.*, 2012) e metanol (Borreli, *et al.*, 2004; Mussato, *et al.*, 2011; Goulas, *et al.*, 2012), foram utilizados, simples ou em diferentes concentrações aquosas, não sendo ponderada a toxicidade dos mesmos nem o seu valor económico.

Estudos recentes utilizam a extração com água subcrítica para extrair compostos fenólicos de subprodutos (Singh e Saldaña, 2011; Narita e Inouye, 2012). Este método, embora descrito como sendo menos poluente em relação aos solventes orgânicos (Narita e Inouye, 2012), acaba por se tornar um método dispendioso, tendo em conta o equipamento necessário (Smith, 2002).

Pelo referido, é do maior interesse otimizar processos extrativos para obter produções máximas de antioxidantes, para a sua utilização em suplementos alimentares/alimentos funcionais, úteis como suporte nutricional na prevenção de inúmeras doenças, valorizando os subprodutos e contribuindo para a sustentabilidade ambiental sem descuidar a sustentabilidade dos processos.

5. Café

A indústria do café é uma das indústrias que movimenta mais capital, a nível mundial, logo a seguir ao petróleo (Franca *et al.*, 2008; Mussatto *et al.*, 2011).

A Organização Internacional do Café estima que a produção total dos países exportadores em 2011/2012 deverá rondar os 131,4 milhões de sacas, sendo a América do Sul o continente que mais contribui para a produção mundial, como se pode verificar pelo gráfico representado na figura 2. (*Relatório Mensal sobre o Mercado Cafeeiro – Julho de 2012 – Organização internacional do café*).

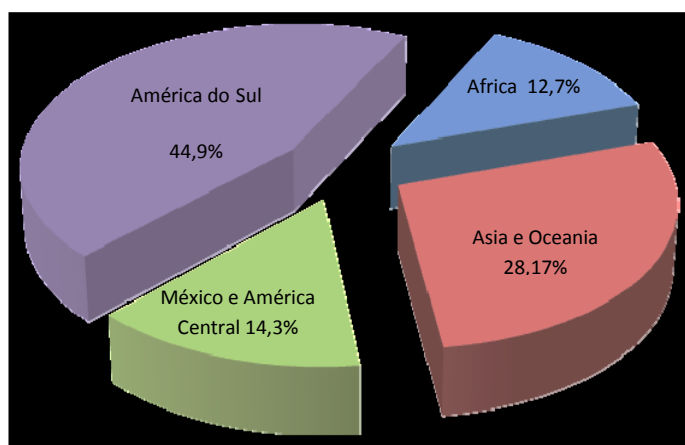


Fig. 2 - Produção de café em 2011/12 por continente

A bebida café tem origem na semente do fruto do cafeeiro. Esta planta pertence à família das Rubiaceae. Embora existam várias espécies de café, hoje em dia são essencialmente cultivadas duas espécies a nível mundial: *Coffea arabica* (café arábica) e *Coffea canephora* var. robusta (café robusta). O café arábica é a espécie de café mais antiga que se conhece, sendo considerada a espécie mais nobre. É responsável por 75-80% da produção mundial. O café robusta difere dos cafés arábica em termos de sabor (origina uma bebida mais amarga) e é mais resistente a pragas (Belitz *et al.*, 2009). Este tipo de café é essencialmente utilizado na produção de café expresso (a adição de um pouco de robusta melhora as características da espuma) e

na produção de café solúvel (pois tem um maior teor de sólidos solúveis, melhorando o rendimento do processo) (Alves, 2010).

O café, consumido essencialmente pelo seu efeito estimulante e propriedades organoléticas, possui uma composição química bastante diversificada e complexa. Estima-se que o grão de café torrado possua mais de 2000 compostos químicos, alguns destes com atividades biológicas. Quimicamente, estas espécies diferenciam-se pelo seu teor em diversos componentes: cafeína (o dobro no café robusta), minerais, compostos fenólicos, trigonelina, aminoácidos, aminas biogénicas, diterpenos, ácidos gordos, esteróis, β -carbólinas, entre muitos outros) (Alves, 2010).

5.1. Subprodutos do café

Durante o processamento do café são gerados resíduos sólidos como as cascas, a polpa do fruto, os grãos de baixa qualidade ou defeituosos, a pele de prata (Fig. 3) e a borra de café (Esquivel e Jiménez, 2011). É importante fazer um esforço na valorização dos inúmeros subprodutos resultantes da sua produção, de modo a tornar esta indústria mais sustentável (Mussato *et al.*, 2011).

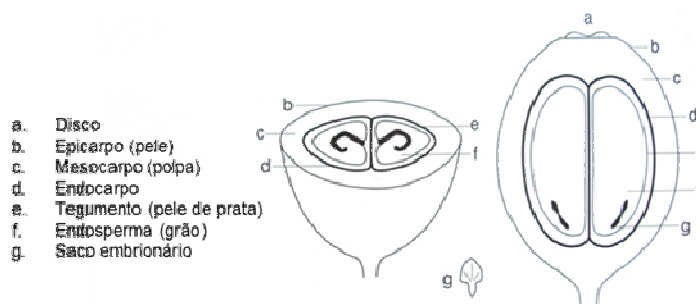


Fig. 3 - Corte transversal e longitudinal do fruto do cafeeiro

Estes subprodutos do café são fontes renováveis de baixo custo, uma vez que estudos demonstram que são ricos em hidratos de carbono, proteínas, pectinas e compostos bioativos (Murthy e Naidu, 2010). A valorização destes subprodutos tem interesse quer pela perspetiva ambiental, quer pela económica, pois irá contribuir para uma redução de resíduos de baixo custo, transformando-os em compostos de valor acrescentado e criação de postos de trabalho (Mussato *et al.*, 2011).

Existem alguns estudos para alguns destes subprodutos, mas ainda é muito escassa a informação sobre a sua valorização e reutilização noutras indústrias (Esquivel e Jiménez, 2012).

5.1.1. Cascas e polpa do fruto

As cascas e a polpa obtêm-se quando as bagas do café são processadas, quer por método a seco ou a húmido. A casca do café envolve o grão e representa 12% do peso fresco da baga e a polpa 29% (Murthy e Naidu, 2012).

Atualmente, são utilizadas para a produção de rações animais e obtenção de energia através da queima ou da compostagem (Saenger *et al.*, 2001). São subvalorizados, tendo em consideração o facto de serem ricos em hidratos de carbono, proteínas, fibras e minerais (Brand *et al.*, 2001).

5.1.2. Borra de café

A borra é um subproduto, que resulta da preparação das diferentes bebidas de café ou da produção de café solúvel (Esquivel e Jiménez, 2012). É rica em açúcares (manose e galactose) e proteínas (Mussato *et al.*, 2011).

A produção de biodiesel pode ser uma boa alternativa para a valorização deste subproduto (Kondamudi, *et al.*, 2008).

5.1.3. Pele de prata

A pele de prata é a película que está diretamente em contacto com o grão de café. Fortemente ligada ao grão verde, esta película só se destaca após a torra, por não se expandir da mesma forma que o grão, perante as elevadas temperaturas desta etapa do processamento (Esquivel e Jiménez, 2011). O uso da pele de prata, como ingrediente funcional, é recomendado por alguns autores, tendo por base a sua baixa concentração em lípidos e hidratos de carbono, alto teor em fibras solúveis (60% da composição total) e comprovada atividade antioxidante (Chiralertpong, 2010; Esquivel e Jiménez, 2011).

Em alguns países, uma forma de eliminar este resíduo é utilizando-o como combustível ou para compostagem (Saenger *et al.*, 2001).

Embora seja o resíduo maioritário da torrefação do café, a pele de prata é talvez o subproduto da indústria do café menos estudado e explorado.

Com este trabalho pretende-se, assim, promover a sua valorização, contribuindo para a redução dos resíduos da indústria de torrefação do café.

Objetivos

Com o intuito de valorizar o resíduo, o objetivo primordial deste trabalho consistiu em otimizar métodos sustentáveis de extração para obtenção de extratos com elevado teor de compostos bioativos e/ou atividade antioxidante, com viabilidade de utilização futura na indústria alimentar (aplicação em suplementos alimentares/alimentos funcionais) ou outras indústrias (por ex. cosmética).

Para isso, selecionaram-se solventes de baixa toxicidade e reduzido custo e desenvolveu-se um conjunto de tarefas laboratoriais, articuladas entre si, procurando respostas sequenciais e cumulativas para os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o efeito das principais variáveis que afetam o rendimento de extração e a atividade antioxidante dos extratos, nomeadamente a polaridade do solvente extrator, a temperatura e o tempo de extração;
- Quantificar o teor em compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos dos extratos obtidos;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos obtidos, utilizando duas metodologias diferentes e complementares (DPPH e FRAP);
- Selecionar o método extrativo mais conveniente com base nos parâmetros avaliados.

Material e métodos

1. Amostras

As amostras (Figura 4) analisadas foram cedidas por uma indústria de torrefação (Bicafé - Torrefacção e Comércio de Café Lda). Selecionaram-se 3 amostras de pele de prata (Tabela 1) resultantes da torrefação de 3 lotes de café comercial (2 *blends* e um estreme), representativas de uma grande parte do resíduo produzido.

Tab. 1- Descrição das amostras

Amostra	Composição
A1	49% robusta e 51% arábica
A2	100% robusta (proveniente da Índia)
A3	80% robusta e 20% arábica



Fig. 4 - Amostras cedidas para estudo



Fig. 5 - Amostra A1 moída

Após receção das amostras, as mesmas foram moídas em moinho Retsch GM200, (Figura 5) e posteriormente utilizadas na determinação dos vários parâmetros propostos.

2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico:

Acetato de sódio (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)

Ácido gálico, (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)

Ácido tânico (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A)

Carbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha)

Cloreto férrico (*SIGMA Chemical Co.*, St. Louis, U.S.A)

Cloreto de alumínio (*SIGMA Chemical Co.*, St. Louis, U.S.A)

DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) (*SIGMA Chemical Co.*, St. Louis, U.S.A)

Epicatequina (*SIGMA Chemical Co.*, St. Louis, U.S.A)

Etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha)

Folin–Ciocalteu (*SIGMA Chemical Co.*, St. Louis, U.S.A)

Hidróxido de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha)

Nrito de sódio (*SIGMA Chemical Co.*, St. Louis, U.S.A)

Sulfato ferroso (*SIGMA Chemical Co.*, St. Louis, U.S.A)

Trolox (*SIGMA Chemical Co.*, St. Louis, U.S.A)

TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina), (*SIGMA Chemical Co.*, St. Louis, U.S.A)

3. Equipamentos

Moinho (GM 200, RETSCH, Haan, Alemanha)

Placa de agitação (VARIOMAG, TELEMODUL 40 CT, H+P Labortechnik, Alemanha)

Vortex (VWR INTERNATIONAL, Darmstadt, Alemanha).

Esfetofotómeto (SHIMADZU, UV-1800)

Leitor microplacas (BioTek Synergy HT, GENS5).

4. Extração de compostos bioativos

De modo a estudar as condições ótimas de extração testaram-se diferentes misturas de solventes (diferentes polaridades), tempos de extração e temperaturas.

4.1. Preparação da amostra

Num estudo preliminar, procedeu-se à avaliação da melhor relação entre a massa de pele prata e a quantidade de solvente.

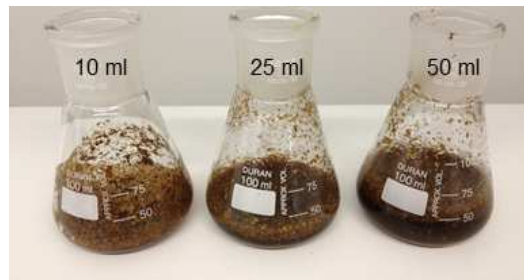


Fig. 6 - Amostra (A1) em diferentes relações de amostra e solvente

A relação 1:10 e 1:25 (m/v), não permitiram ter solvente suficiente para efetuar a extração como se pode verificar nas figuras 7 e 8.

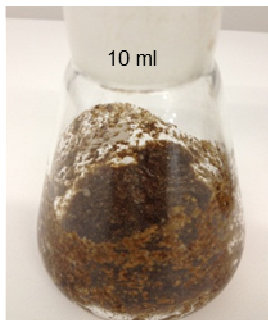


Fig. 8 – Amostra 1 com a relação 1:10 (m/v)

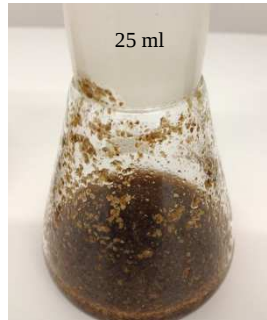


Fig. 7 – Amostra 1 com a relação 1:25 (m/v)

Apenas com a relação 1:50 (m/v) foi possível proceder à extração dos compostos (Fig. 9).

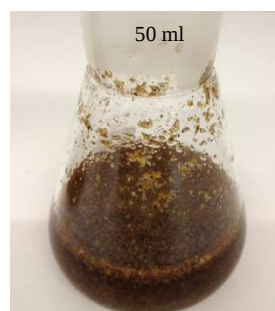


Fig. 9 - Amostra 1 com a relação 1:50 (m/v)

Prepararam-se diferentes extratos (1 g/50 ml) em duplicado a partir de um lote de pele de prata (A1) para determinar as condições mais adequadas aos objetivos do trabalho.

Após a seleção das condições ótimas, as 3 amostras em estudo, foram sujeitas ao processo extrativo escolhido em triplicado.

As variáveis selecionadas foram as seguintes:

- Solventes:
 - o 100% água
 - o 75% água e 25% etanol absoluto
 - o 50% água e 50% etanol absoluto
 - o 25% água e 75% etanol absoluto
 - o 100% etanol absoluto
- Tempos de extração:
 - o 30 min
 - o 60 min
 - o 90 min
 - o 180 min
- Temperaturas de extração:
 - o Temperatura ambiente (25°C)
 - o 30°C
 - o 40°C
 - o 50°C
 - o 60°C

A extração foi efetuada em placa de aquecimento com agitação constante de 600 rpm (Figura 10) e os extratos obtidos filtrados (Figura 11) para posterior análise. Os extratos foram congelados a -25 °C até serem analisados.



Fig. 10 - Extração de compostos bioativos da pele de prata

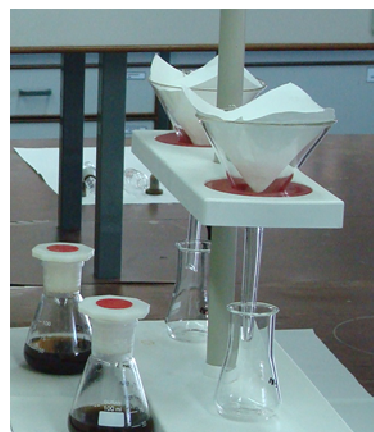


Fig. 11 - Filtração de extratos

A Figura 12 permite deduzir a diferente composição dos extratos obtidos, com diferentes solventes, tendo em conta as tonalidades apresentadas.



Fig. 12 - Extratos da pele de prata preparados usando diferentes condições extrativas

5. Determinação de compostos bioativos

Na determinação dos compostos fenólicos incluíram-se os fenóis totais, flavonoides e taninos). Na atividade antioxidante consideraram-se os métodos do DPPH e FRAP conforme referido anteriormente.

5.1.Compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos aquosos foi efetuada por um método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin–Ciocalteu, segundo metodologia previamente descrita (Alves *et al.*, 2010). Para elaborar a curva de calibração utilizou-se um padrão de ácido gálico (Figura 13).

Colocaram-se 500 μ L de extrato num tubo de ensaio adicionando 2,5 ml de RFC diluído em água desionizada (1:10). Adicionaram-se 2,0 ml de carbonato de sódio para alcalinizar a solução e colocou-se em banho-maria a 45 °C durante 15 minutos ao abrigo da luz.

Deixou-se em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos. Efetuaram-se as leituras a 765 nm.

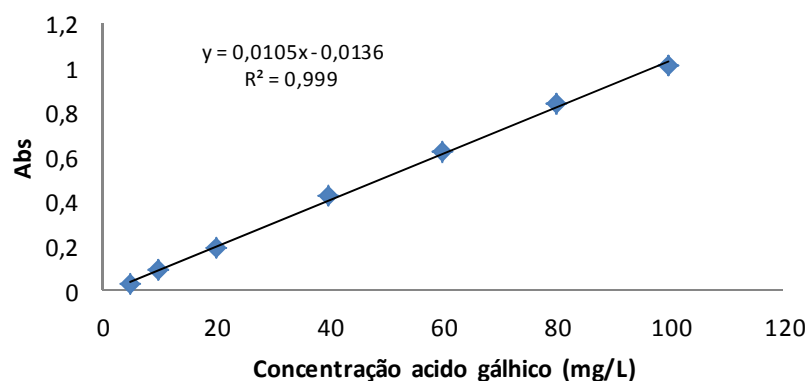


Fig. 13 - Curva de calibração de ácido gálico, utilizada para determinar os compostos fenólicos totais dos extratos

5.2. Flavonoides totais

Os flavonoides totais foram determinados por um método espectrofotométrico seguindo uma metodologia previamente descrita (Barroso *et al.*, 2011) com ligeiras modificações. A técnica envolveu a medida da absorvência, a 510 nm, do complexo AlCl_3 -flavonoide, utilizando a reta de calibração de epicatequina (Fig. 14), efetuada aquando das determinações.

Num tubo de ensaio colocou-se 1 ml de extrato, 4 ml de água destilada e 300 μL de nitrito de sódio a 25%. Após 5 minutos adicionaram-se 300 μL de AlCl_3 a 10% e aguardou-se 1 minuto. Adicionaram-se 2 ml de solução de hidróxido de sódio 1mol/L e 2,4 ml de água destilada. Agitou-se em vortex e efetuaram-se as leituras a 510 nm.

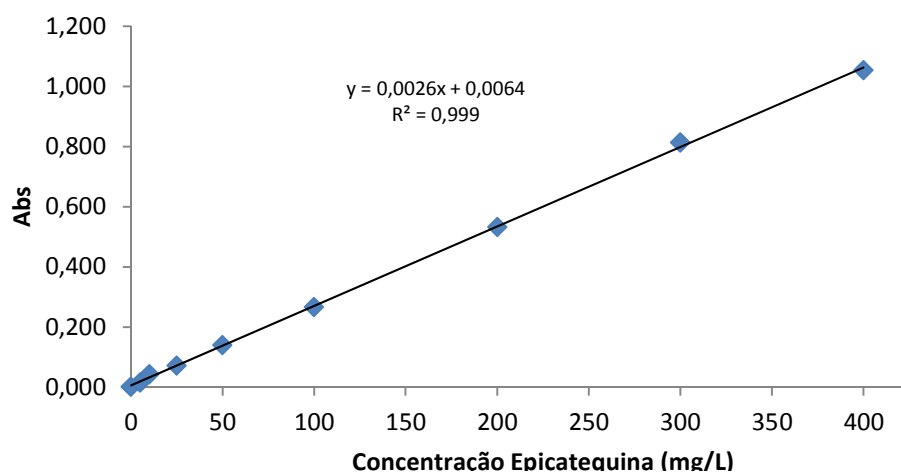


Fig. 14 - Curva de calibração de epicatequina, utilizada para determinar os flavonoides totais dos extratos

5.3. Taninos totais

Para a determinação dos taninos totais utilizou-se o RFC, segundo metodologia previamente descrita (Shad *et al.*, 2012) com ligeiras modificações, utilizou-se a curva de calibração de ácido tânico (Fig. 15) elaborada aquando dos ensaios.

A 500 µL de amostra adicionaram-se 2,5 ml de reagente RFC (1:10). Agitou-se vigorosamente e após 3 minutos adicionaram-se 2 ml de solução de carbonato de sódio e deixou-se repousar durante 2 horas ao abrigo da luz.

As leituras foram efetuadas a 725 nm.

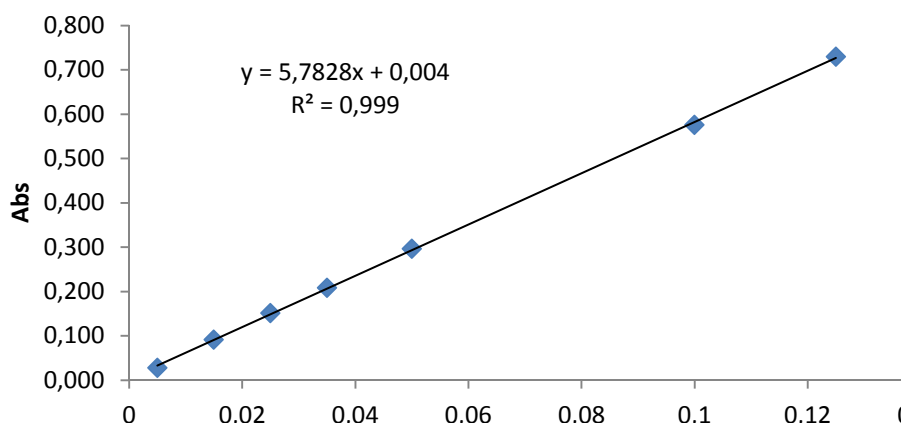


Fig. 15 - Curva de calibração de ácido tânico, utilizada para determinar os taninos totais dos extratos

5.4. Atividade antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante foram realizados dois ensaios, segundo metodologias previamente descritas (Benzie e Strain, 1996; Barroso *et al.*, 2011):

- determinação da capacidade de neutralização do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH•);
- avaliação do poder antioxidante por redução do ião férrico (método FRAP).

5.4.1. DPPH•

Efetuaram-se algumas alterações ao método descrito por Barroso *et al.* (2011). O método consistiu em adicionar a 14 µL de extrato, 186 µL de solução etanólica de

DPPH• ($9,3 \times 10^{-5}$ mol/L), agitar e efetuar as leituras a 525 nm, de 10 em 10 minutos, até a reação estabilizar. Baixos valores de absorvência indicam maior capacidade de neutralizar radicais livres.

Foi preparada uma curva de calibração (Figura 16) com trolox e o branco com uma solução de etanol e acetato de sódio (2:1).

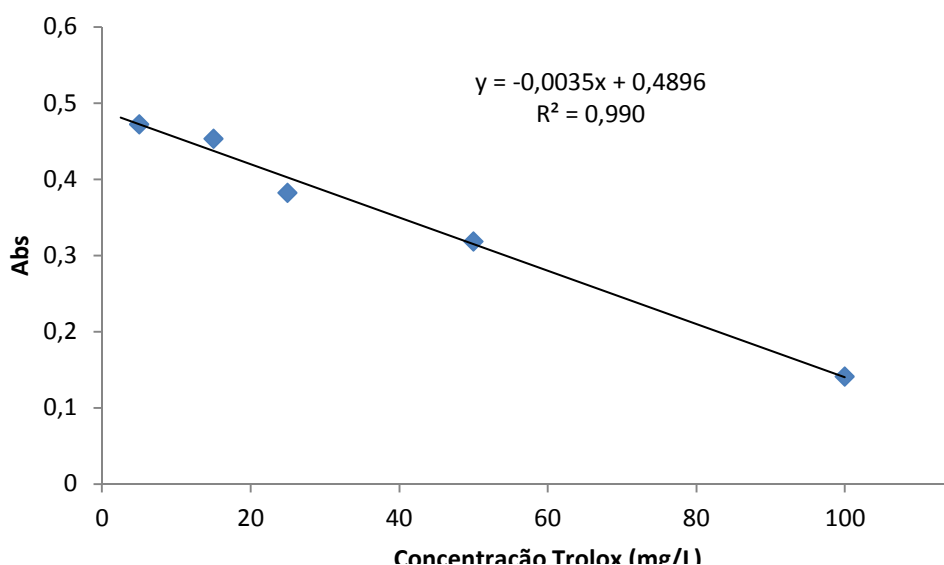


Fig. 16 - Curva de calibração utilizada para determinar a capacidade de neutralização de radicais livres (DPPH) dos extratos

5.4.2. FRAP

O método consiste na redução do complexo Fe(III)/ferricianeto $[\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a Fe(II), forma ferrosa, pela presença do composto antioxidante na solução.

Assim, determinou-se o poder antioxidante por redução do íon férrico, segundo metodologia previamente descrita (Benzie e Strain, 1996), utilizando-se uma curva de calibração (Fig. 17) de sulfato ferroso.

Num tubo de ensaio, colocaram-se 90 μl de extrato, 270 μl de água destilada e 2,7 ml de reagente FRAP (750 ml de tampão acetato 0,3 M, 75 ml solução TPTZ 10 mM e 75 ml cloreto férrico 20 mM).

Homogeneizou-se e colocou-se em banho-maria a 37 °C.

Após 30 minutos efetuaram-se as leituras a 595 nm.

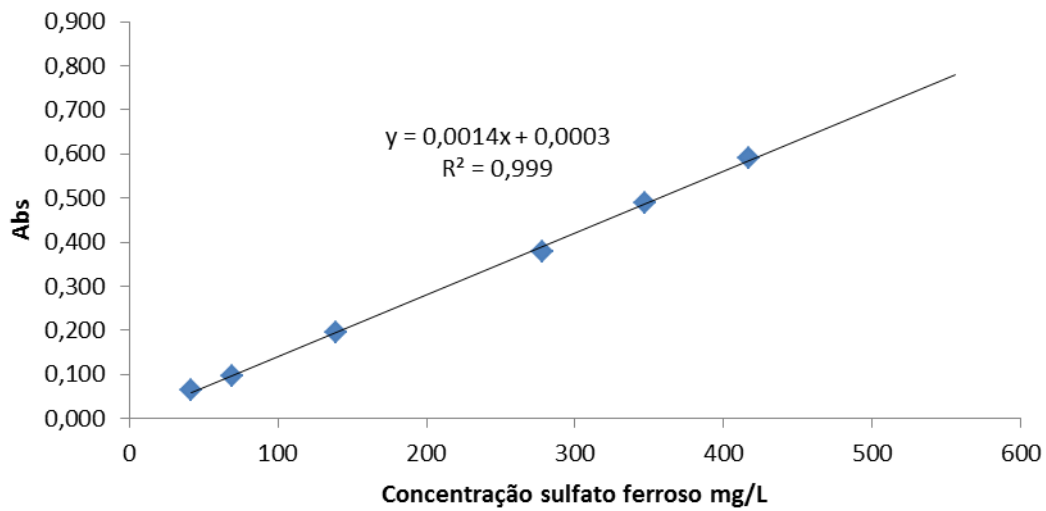


Fig. 17 - Curva de calibração utilizada para determinar a poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP) dos extratos

6. Análise estatística

Todos os ensaios foram efetuados em triplicado. Os valores foram expressos como médias aritméticas $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatísticas foram avaliadas seguindo a análise da variância (ANOVA) a três fatores. Foram fixados os fatores: solventes (100, 75, 50, 25 e 0 % de água), tempo de extração (30, 60, 90 e 180 minutos) e temperaturas (25, 30, 40, 50, e 60 °C). As médias foram comparadas utilizando um teste de Tukey para comparações entre grupos utilizando o programa IBM SPSS Statistics 20 sendo consideradas diferenças significativas para $p < 0,05$ (com um intervalo de confiança de 95%).

Resultados e Discussão

Conforme referido anteriormente, a base deste trabalho visa encontrar condições ótimas para valorização de um resíduo da indústria do café, a pele de prata.

Frequentemente, faz-se a valorização de resíduos sem considerar a sustentabilidade do processo. Elimina-se o resíduo, transformando-o numa matéria-prima sem viabilidade económica.

Neste sentido, optou-se por considerar apenas a água e o etanol, como solventes extratores pois são económicos e o produto resultante da extração pode ser utilizado na indústria alimentar (devido à sua inocuidade).

Dada a ausência de estudos nesta matriz, e de acordo com alguns trabalhos efetuados noutras matrizes, optou-se por estudar isoladamente cada solvente e em mistura, tendo em conta a polaridade dos mesmos. Assim, nesta parte do estudo fizeram-se cinco ensaios (100, 75, 50, 25 e 0% de água).

Outras variáveis consideradas na otimização do método foram os tempos e temperaturas de extração.

Relativamente aos tempos de extração optou-se por quatro ensaios (30, 60, 90 e 180 minutos). Não se procedeu à extração durante períodos mais longos, por questões de sustentabilidade económica. Embora este ensaio tenha sido efetuado em microescala, o objetivo futuro será a sua transposição para escala industrial.

Em relação às temperaturas de extração e com base no mesmo princípio, testaram-se cinco temperaturas (temperatura ambiente, 30, 40, 50 e 60 °C).

Com os vários métodos de extração utilizados, obtiveram-se extratos com colorações distintas (Fig. 12), o que comprova a sua diferente composição química. De facto, de acordo com os resultados obtidos para os parâmetros analisados, verificou-se que a variação das condições de extração influenciava significativamente a quantidade e a qualidade dos compostos bioativos extraídos (Tabela I, II, III, IV e V, em anexo). Como tal, é possível escolher as condições ótimas de extração, para se obter um produto com as propriedades desejadas. No entanto, essas condições variam consoante o parâmetro analisado.

Na primeira fase experimental, de escolha das condições de extração (solvente, temperatura e tempo) avaliou-se a qualidade dos extratos obtidos, recorrendo à determinação dos compostos fenólicos totais.

- Os solventes (água e álcool) isoladamente, apresentaram o pior comportamento na extração, para todas as temperaturas estudadas.

- Com as misturas de solventes, verificaram-se comportamentos variáveis com o aumento da temperatura. Assim, à temperatura ambiente a melhor mistura, foi 75% etanol/25% água. Nas restantes temperaturas ensaiadas, prevaleceu a mistura 50% etanol/50% água. As figuras 18 a 22 exemplificam o referido.

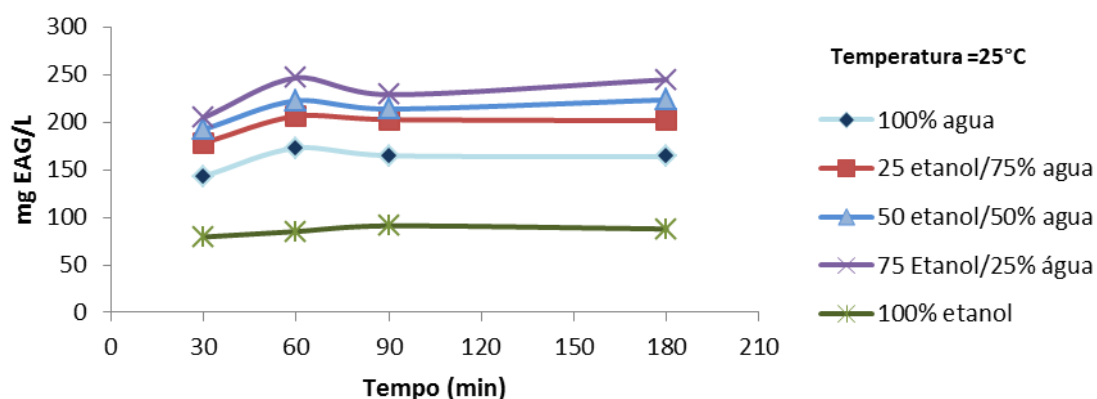


Fig. 18 - Extração de compostos fenólicos à temperatura ambiente, fazendo variar o solvente ao longo do tempo

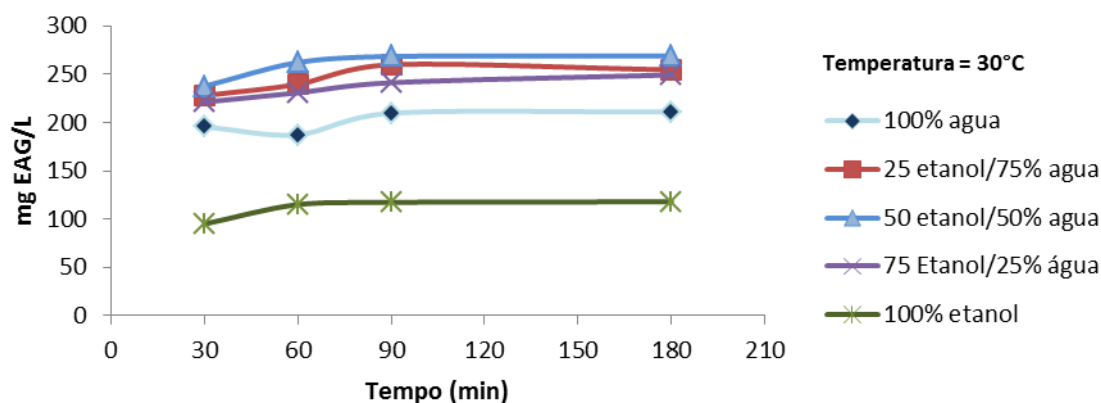


Fig. 19 - Extração de compostos fenólicos à temperatura de 30 °C, fazendo variar o solvente ao longo do tempo

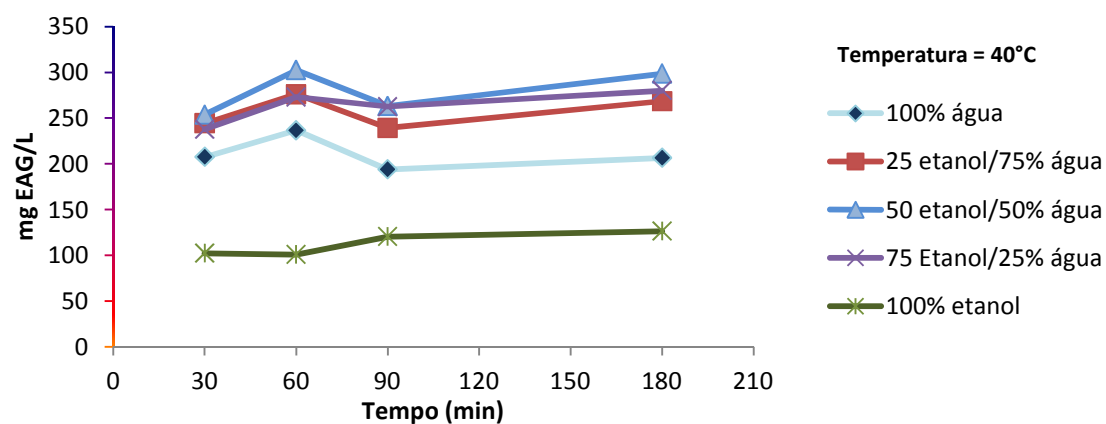


Fig. 20 - Extração de compostos fenólicos à temperatura de 40 °C, fazendo variar o solvente ao longo do tempo

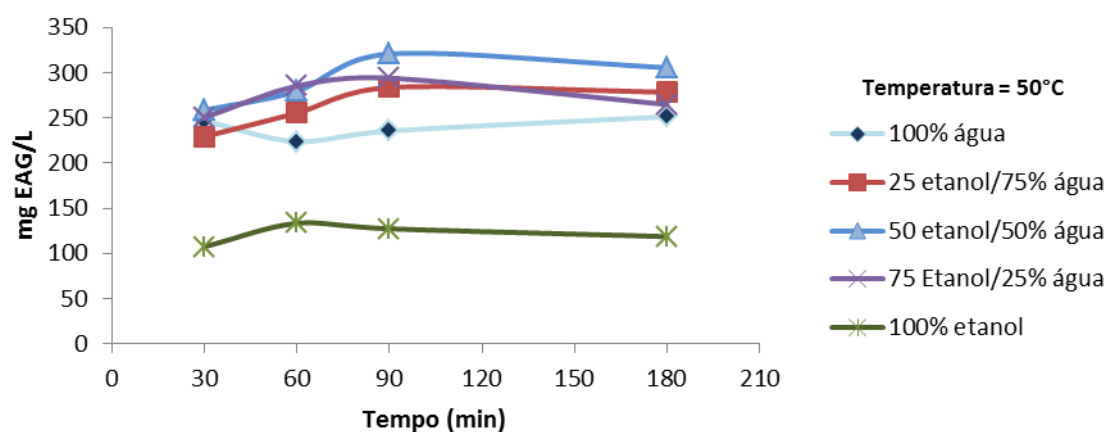


Fig. 21 - Extração de compostos fenólicos à temperatura de 50 °C, fazendo variar o solvente ao longo do tempo

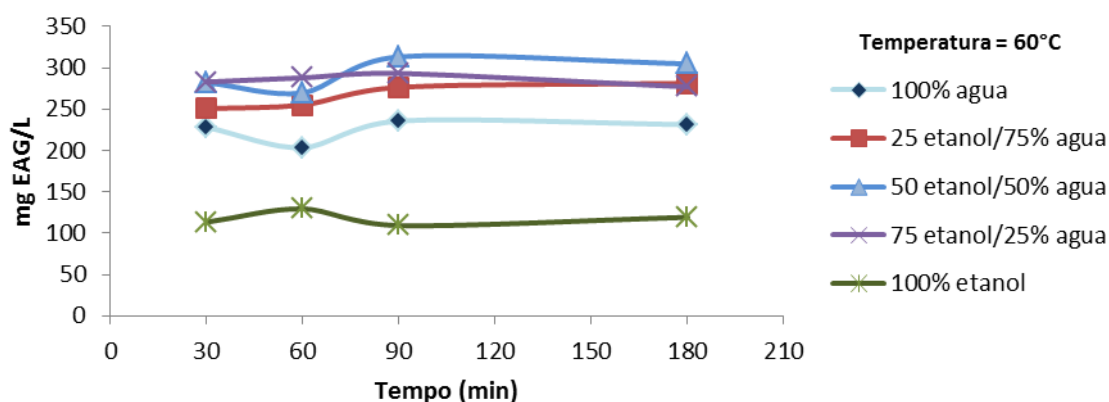


Fig. 22 - Extração de compostos fenólicos à temperatura de 60 °C, fazendo variar o solvente ao longo do tempo

Na escolha da temperatura que permitiu obter o extrato com maior teor de compostos fenólicos, e de acordo com as figuras 18 a 22, verificou-se que as temperaturas de 50 °C e 40 °C permitiram obter extratos com valores superiores de compostos fenólicos (Fig. 20 e Fig. 21). Dada a similaridade de valores, a escolha ficou dependente do tempo de extração.

A figura 20 mostra claramente que à temperatura de 40 °C, a mistura 50% etanol/50% água, tem o melhor desempenho aos 60 minutos.

Com a temperatura de 50 °C atingiu-se um valor máximo de compostos fenólicos aos 90 minutos (Fig. 21). Contudo, a diferença de valores (303-321 mg EAG/L, tabela I em anexo) não justifica os custos acrescidos com o aumento do tempo de extração. Deste modo optou-se pela mistura 50/50, à temperatura de 40 °C após um tempo de extração de 60 minutos. A tabela 2 justifica a escolha feita. Embora o extrato escolhido não seja o melhor posicionado, é o que apresenta melhores resultados a nível de sustentabilidade e viabilidade a nível industrial.

Tab. 2 - Melhores condições de extração para a obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos totais (EAG: equivalentes em ácido gálico)

	Solventes		Temperatura (°C)	Tempo (min)	C. fenólicos (mg EAG/L)
	% água	% etanol			
1º	 50	 50	50	 90	320,7 ± 0,1
2º	 50	 50	60	 90	313,2 ± 0,6
3º	 50	 50	50	 180	305,6 ± 0,2
4º	 50	 50	60	 180	304,7 ± 0,1
5º	 50	 50	40	 60	302,5 ± 0,5
6º	 50	 50	40	 180	298,5 ± 0,2
7º	 25	 75	50	 90	293,9 ± 0,6
8º	 25	 75	60	 90	293,1 ± 0,7
9º	 25	 75	60	 60	287,8 ± 0,3
10º	 25	 75	50	 60	285,2 ± 0,3

Embora a escolha das condições de extração fosse baseada nos teores de fenóis totais foram igualmente determinados todos os outros parâmetros mencionados na secção material e métodos.

A tabela 3 apresenta o “ranking” dos melhores extratos, considerando os teores de flavonoides (mg EE/L). As condições escolhidas não estão contempladas na referida tabela, uma vez que estes compostos são mais eficazmente extraídos com solventes menos polares e temperaturas mais elevadas. No entanto, e de acordo com a tabela II em anexo, verifica-se um comportamento atípico. Inicialmente, aos 30 minutos, os teores determinados foram elevados, baixaram ao fim de 1 hora e subiram ligeiramente a 90 e 180 minutos.

Tab. 3 - Melhores condições de extração para a obtenção de extratos ricos em flavonoides (EE: equivalentes em epicatequina)

	Solventes		Temperatura (°C)	Tempo (min)	Flavonoides (mg EE/L)
	% água	% etanol			
1º	 25	 75	60	 90	144,0 ± 1,0
2º	 25	 75	60	 30	140,0 ± 15,4
3º	 50	 50	50	 90	125,8 ± 0,2
4º	 25	 75	60	 60	123,4 ± 10,0
5º	 25	 75	50	 90	119,4 ± 1,0
6º	 50	 50	60	 90	118,4 ± 6,2
7º	 25	 75	60	 180	118,1 ± 5,8
8º	 25	 75	50	 60	116,6 ± 0,2
9º	 50	 50	60	 180	113,6 ± 2,1
10º	 50	 50	40	 180	113,4 ± 6,6

Pelos resultados obtidos parece possível inferir:

- para a obtenção de extratos ricos em flavonoides um tempo de extração de 30 minutos é suficiente.
- trata-se de uma fração instável (possíveis alterações na estrutura química levando à formação de outros compostos ao longo do tempo).

Considerando a atividade anti-radicalar contra o DPPH• (mg ET/L), a tabela 4 sumariza os resultados obtidos, considerando os parâmetros solventes, temperaturas e tempos de extração.

Tab. 4 - Melhores condições de extração para a obtenção de extratos com elevada atividade anti-radicalar contra o DPPH • (ET: equivalentes em trolox)

	Solventes		Temperatura (°C)	Tempo (min)	Atividade anti-radicalar contra o DPPH• (mg ET/L)
	% água	% etanol			
1º	 25	 75	 30	 60	416,0 ± 2,9
2º	 25	 75	 50	 30	386,0 ± 27,1
3º	 25	 75	 50	 60	384,6 ± 25,7
3º	 100	 0	 25	 180	384,6 ± 48,6
4º	 75	 25	 40	 60	381,7 ± 74,3
5º	 25	 75	 30	 180	380,3 ± 7,1
6º	 25	 75	 40	 180	370,3 ± 2,9
7º	 25	 75	 40	 60	368,9 ± 10,0
8º	 25	 75	 40	 30	364,6 ± 20,0
9º	 0	 100	 25	 60	361,7 ± 37,1
10º	 25	 75	 40	 90	357,0 ± 64,3

Neste caso, verifica-se que a relação de solventes 25% água/75% etanol é a que resulta numa capacidade anti-radicalar mais elevada.

Todos os resultados obtidos estão na tabela em anexo (Tabela IV).

A tabela 5 sumariza os ensaios efetuados para o poder redutor (mg de sulfato ferroso/L).

Tab. 5 - Melhores condições de extração para a obtenção de extratos com elevado poder redutor

	Solventes		Temperatura (°C)	Tempo (min)	Poder redutor (mg sulfato ferroso/L)
	% água	% etanol			
1º	50	50	40	60	1791,9 ±89,3
2º	50	50	50	90	1734,8 ±25,0
3º	50	50	60	90	1656,2 ±303,6
4º	75	25	50	90	1641,9 ±203,6
5º	75	25	60	180	1556,2 ±60,7
6º	50	50	40	30	1499,0 ±175,0
7º	50	50	25	180	1477,6 ±125,0
8º	75	25	60	90	1474,0 ±85,7
9º	100	0	60	50	1474,0 ±300,0
10º	25	75	60	90	1474,0 ±42,9

Os valores mais elevados do poder redutor correspondem às condições consideradas ótimas para a valorização do subproduto pele de prata.

As figuras 23 a 27 justificam a escolha feita.

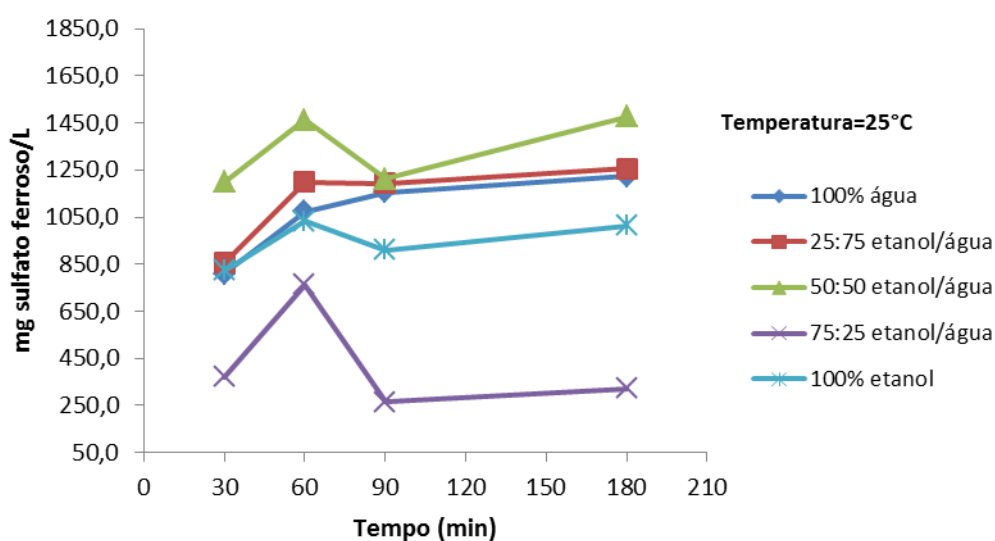


Fig. 23 - Extração de compostos com poder redutor, fazendo variar o solvente à temperatura de ambiente e ao longo do tempo de extração

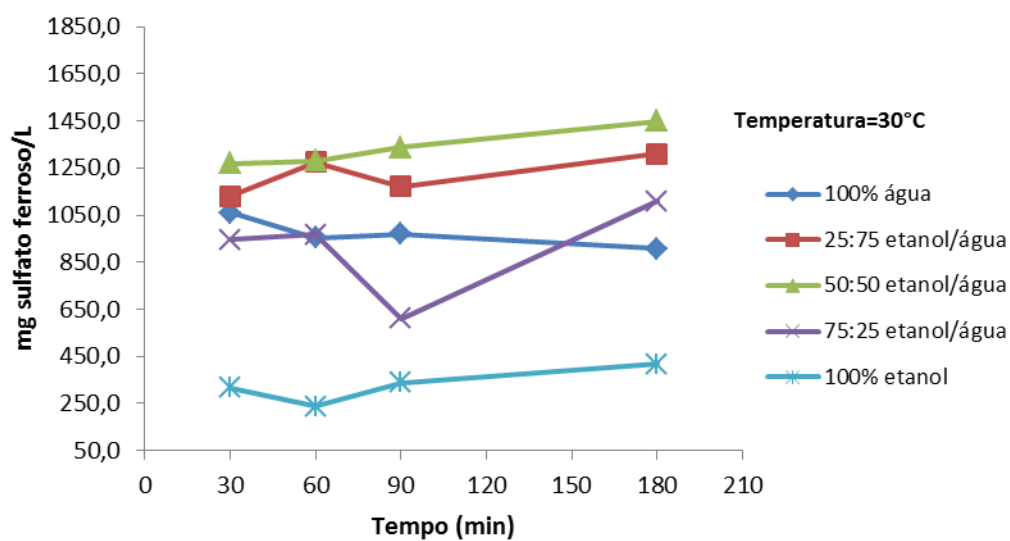


Fig. 24 - Extração de compostos com poder redutor, fazendo variar o solvente à temperatura de 30 °C, e ao longo do tempo de extração

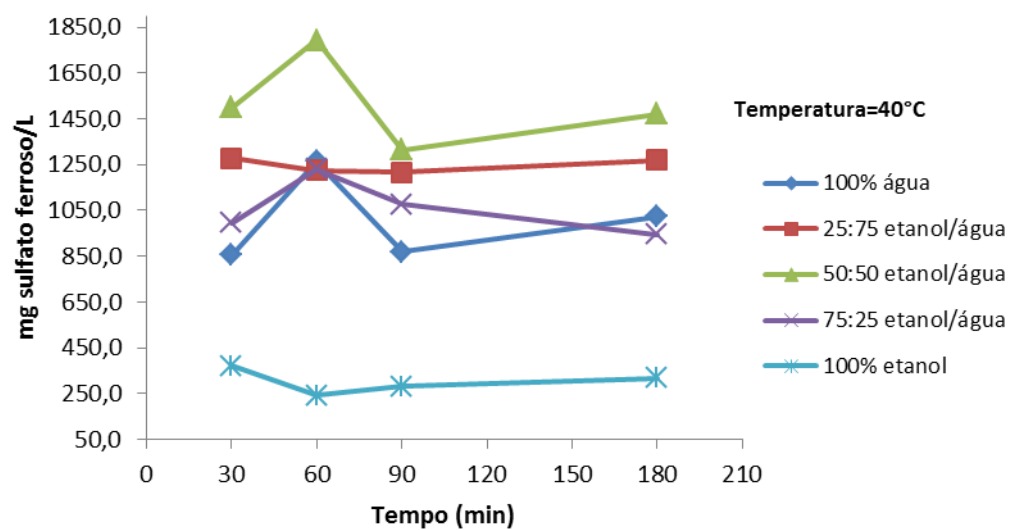


Fig. 25 - Extração de compostos com poder redutor, fazendo variar o solvente à temperatura de 40 °C, e ao longo do tempo de extração

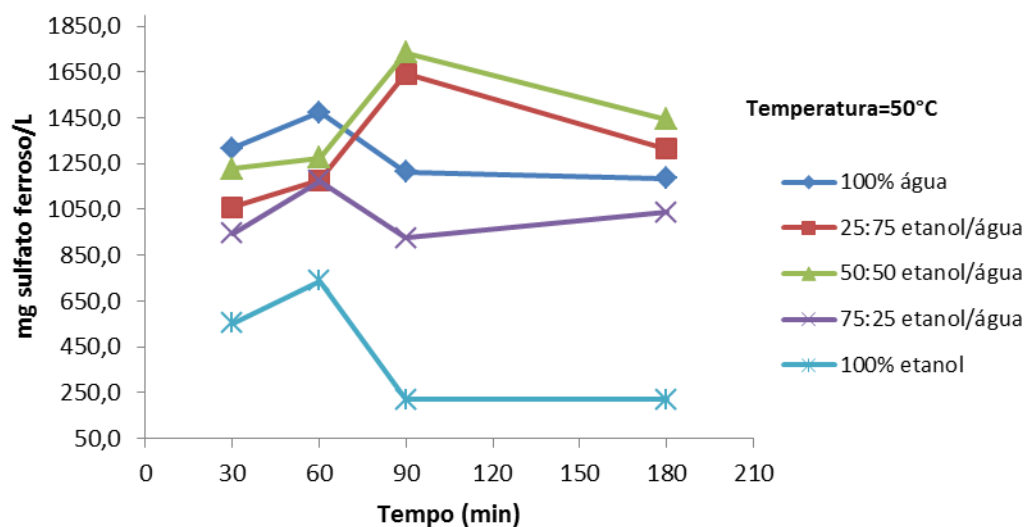


Fig. 26 - Extração de compostos com poder redutor, fazendo variar o solvente à temperatura de 50 °C, e ao longo do tempo de extração

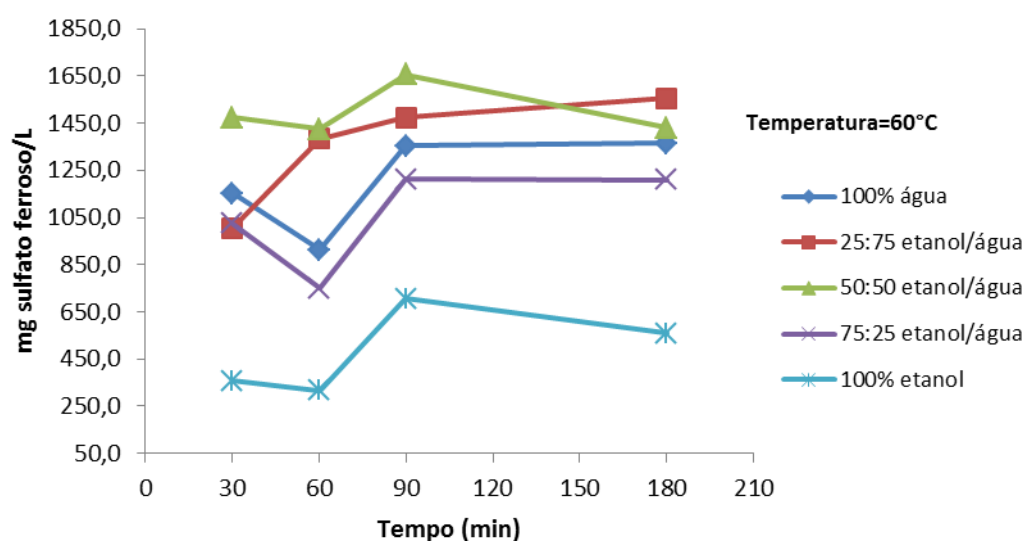


Fig. 27 - Extração de compostos com poder redutor, fazendo variar o solvente à temperatura de 60 °C, e ao longo do tempo de extração

De um modo mais robusto, da avaliação dos resultados da Anova a 3 fatores, com interação, resulta um efeito significativo nas cinco variáveis em análise, para todos os fatores e respectivas interações duplas, com exceção do efeito do tempo para o ensaio da atividade anti-radicalar DPPH) e o interativo tempo/solvente, para o ensaio do DPPH e o ensaio do poder redutor (FRAP) (ver Tabela VI, em anexo).

Ao nível dos fatores individuais, da análise de comparação múltipla por aplicação do teste de Tuckey resulta que, para o ensaio do DPPH o melhor solvente para a extracção é 25% de água. Para todos os outros compostos obteve-se uma extracção máxima para 50% água, temperaturas de 50 °C e 60°C, com tempos de extracção de 90 a 180 minutos (ver Tabela VII, em anexo).

Em resumo, as condições ótimas de extracção, variaram consoante o parâmetro analisado. No entanto, de acordo com os resultados obtidos, a mistura de solventes que melhor extrai os compostos de interesse neste trabalho é constituído por 50% etanol e 50% água. Em relação à temperatura e ao tempo de extracção, considerando a sustentabilidade económica e ambiental do processo optou-se pelas seguintes condições:

- temperatura de 40 °C e tempo de extração de 60 minutos
- temperatura de 50 °C e tempo de extração de 90 minutos.

Na segunda parte do trabalho procedeu-se à análise das três amostras fornecidas pela indústria torrefatora.

Conforme já referido, trata-se de duas misturas (*blends*) constituídas num caso por 49% robusta e 51% arábica (A1) e noutro 80% robusta e 20% arábica (A3). Uma terceira amostra foi obtida na torrefação de um lote de café constituído por 100% robusta proveniente da India (A2).

Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 6.

Tab. 6 - Resultados dos compostos bioativos, extraídos com o solvente 50% etanol e 50% água, das amostras à temperatura de 40 °C e 50 °C durante um período de extração de 60 e 90 minutos

				Compostos fenólicos totais	Flavonoides	Taninos	DPPH	FRAP
				mg EAG/L	mg EEC/L	mg EAT/L	mg ET/L	mg ESF/L
T °C	40	Min	60	A1	383,6 ±6,7	115,4 ±3,2	0,39 ±0,02	1 426,4 ±35,6
				A2	302,5 ±7,2	73,1 ±2,4	0,33 ±0,02	997,9 ±37,9
				A3	351,6 ±29,0	117,0 ±3,9	0,41 ±0,02	1 257,4 ±153,2
	50	Min	90	A1	360,1 ±8,8	140,9 ±33,9	0,37 ±0,03	1 302,6 ±46,3
				A2	288,1 ±13,9	79,3 ±6,0	0,39 ±0,04	921,7 ±73,4
				A3	343,0 ±23,8	101,8 ±16,1	0,42 ±0,10	1 078,8 ±312,6

A amostra 100% robusta é a que obteve para todos os parâmetros analisados os valores mais baixos, com a exceção dos taninos que acaba por ter um valor ligeiramente superior, em relação à amostra 1 (49% robusta e 51% arábica) nas condições de temperatura de 50 °C com um período de extração de 90 minutos.

No que concerne aos teores de flavonoides verifica-se que os *blends* apresentaram valores semelhantes (115-117 mg EE/L).

Em relação aos teores de taninos os resultados obtidos permitiram verificar que as misturas parecem diferentes entre si, tendo em conta as percentagens de robusta. Tais factos levam a deduzir que os cafés que deram origem a este subproduto teriam origens diferentes.

O parâmetro seguinte, a atividade anti-radicalar (DPPH), apresentou um comportamento similar ao reportado para os flavonoides.

O poder redutor (FRAP) das amostras também variou de modo semelhante ao descrito nos taninos. As misturas, embora em percentagem diferentes, dos cafés robusta e arábica, apresentaram valores semelhantes.

Pelo referido, não parece ser possível prever a capacidade antioxidante deste subproduto pela composição dos *blends*. Seria necessário uma maior numero de amostras para se obterem resultados mais conclusivos, conhecendo em pormenor as características da torra e a origem geográfica dos cafés. Seria de esperar, de acordo com a bibliografia (Alves, *et al.*, 2010) descrita para o café, que a amostra 100% robusta apresentasse maior atividade antioxidante, o que não se verificou. No entanto, os resultados na bibliografia para o café (grão e bebida) podem não ser diretamente comparáveis com os da pele de prata, pois embora esta se liberte do grão aquando da torra, os estudos prévios efetuados no nosso laboratório sobre outros compostos químicos, tem mostrado que a sua composição química difere bastante da do grão de café, uma vez que é uma parte distinta do fruto.

Pelos resultados obtidos na extração de compostos bioativos das amostras nos diferentes binómios temperatura/tempo, é possível obter uma solução de compromisso entre os vários métodos de extração e os referidos parâmetros. De uma maneira geral, não se encontraram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dois métodos selecionados (Tab.6).

Assim, optou-se pelas seguintes condições de extração:

- solvente constituído por 50% de etanol e 50% de água,
- temperatura de 40°C,
- tempo de extração de 60 minutos.

Estas parecem ser a escolha acertada para produzir um extrato simultaneamente rico em compostos fenólicos e com elevada capacidade antioxidante. Comparativamente com outras condições, “mais eficazes”, para um ou outro parâmetro, a escolha feita permite uma redução de custos, por poupança de tempo e de energia.

Terminada esta fase de trabalho, é de todo o interesse prosseguir com um estudo de viabilidade do processo desenvolvido, para futura aplicação industrial.

Este trabalho está integrado numa investigação mais abrangente que visa caracterizar pormenorizadamente a composição da pele de prata relativamente a outros compostos bioativos (*e.g.*: cafeína, aminoácidos, fibra) e contaminantes (*e.g.*: hidroximetilfurfural, furfural, acrilamida). Estes estudos estão já a decorrer e pretende-se divulgar os resultados num futuro próximo.

Conclusão

A produção de resíduos da indústria agroalimentar é uma problemática que preocupa a sociedade atual. Estão descritos vários processos de valorização de resíduos, contudo nem sempre são tidas as condições de sustentabilidade do processo. Cientificamente são trabalhos com interesse, no entanto, sem viabilidade a nível energético, económico e, frequentemente, ambiental.

O estudo apresentado visou selecionar as condições ótimas de extração de um resíduo da indústria torrefatora de café, a pele de prata. Trata-se do resíduo maioritário desta indústria, contudo são escassos os estudos que visam a sua valorização e reutilização.

Para colmatar esta lacuna, procedeu-se ao trabalho apresentado, dando prioridade ao estudo da capacidade antioxidante e de alguns compostos relacionados (DPPH, FRAP, compostos fenólicos totais, flavonoides totais e taninos). As variáveis estudadas incluíram solventes (água e etanol em diferentes proporções), temperatura e tempo de extração.

As condições ótimas de extração variaram consoante o parâmetro analisado. No entanto, de acordo com os resultados obtidos, é possível obter uma solução de compromisso entre os vários métodos de extração e os referidos parâmetros. Assim, as seguintes condições de extração, solvente constituído por 50% de etanol e 50% de água, temperatura de 40°C e tempo igual a 60 minutos permitem obter um extrato rico em compostos fenólicos e com elevada capacidade antioxidante individual, poupando-se tempo, energia e gastos económicos comparativamente com outras condições analisadas.

O desenvolvimento destas condições em microescala parece cumprir o pressuposto inicial de valorização de um resíduo de forma sustentável. O ideal seria implementar o processo à escala industrial e confirmar o que se verificou a nível laboratorial.

Além do referido acresce a vantagem de não ser necessário separar lotes, uma vez que a diferente composição das amostras não afeta significativamente a composição dos extratos obtidos, tornando este processo expedito.

Bibliografia

- Aerts, J., Barry, T. e McNabb, W. (1999). Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. **75**: 1-12.
- Ajila, C., Aalami, M., Leelavathi, K. e Prasada Rao, U. (2010). Mango peel powder: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **11**: 219-224.
- Alonso Garcia, A., Cancho Grande, B., e Simal-Gandara, J. (2004). Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultravioleta absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. *Journal of Chromatography A*. **1054**: 175-180.
- Alves, R., Costa, A., Jerez, M., Casal, S., Sineiro, J., Núñez, M. e Oliveira, B. (2010). Antiradical activity, phenolics profile, and hydroxymethylfurfural in espresso coffee: influence of technological factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**: 12221-12229.
- Alves, RC. (2010), *Café expresso: melhoria da qualidade química visando a saúde do consumidor*. Tese de doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- Amarowicz, R., Pegg, R., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B. e Weil, J. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*. **84**: 551-562.
- Barroso, M., Noronha, J., Delerue-Matos, C. e Oliveira, B. (2011). Flavored waters: influence of ingredients on antioxidant capacity and terpenoid profile by HS-SPME/GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **59**: 5062-5072.
- Barnett, R. N., Bongiorno, A., Cleveland, C. L., Joy, A., Landman, U. e Schuster, G. B. (2006). Oxidative damage to DNA: counterion-assisted addition of water to ionized DNA. *Journal of the American Chemical Society*. **128**: 10795-10800.

- Bhattacharya, S., Ahmed, K. e Chakraborty, S. (2011). Free Radicals and Cardiovascular Diseases: An Update. *Free Radicals and Antioxidants*. **1**: 17-22.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., e Schieberle, P. (2009). Food Chemistry. Coffee, Tea, Cocoa. 4^o edição, Springer.
- Benzie, I. e Strain, J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. **239**: 70-76.
- Bektic, J., Guggenberger, R., Eder, I. E.; Pelzer, A. E., Berger, A. P.; Bartsch, G., Klocker, H. (2005). Molecular effects of the isoflavonoid genistein in prostate cancer. *Clinical Prostate Cancer*. **4**: 124-129.
- Bond, A. e Morrison-Saunders, A. (2011). Re-evaluating sustainability assessment: aligning the vision and the practice. *Environmental Impact Assessment Review*. **31**: 1-17.
- Borrelli, R., Esposito, F., Napolitano, A., Ritieni, A. e Fogliano, V. (2004). Characterization of a New potencial Functional Ingredient: Coffee Silverskin. *Journal of agricultural and Food Chemistry*. **52**: 1338-1343.
- Brand, D., Pandey, A., Rodriguez-Leon, J., Roussos, S., Brand, I e Soccol, C. (2001). Packed Bed Column Fermenter and (Kinetic Modeling for Upgrading the Nutritional Quality of Coffee Husk in Solid-State Fermentation. *Biotechnology Progress*. **17**: 1065-1070.
- Cabrera, F., Lopez, R., Martinez-Bordiú, Dupuy de Lome, E. e Mutrillo, J. (1996). Land treatment of olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **38**: 215-225.
- Caridi, D., Trenerry, V.C., Rochfort, S., Laughter, D. e Jones, R. (2007). Profiling and quantifying quercetina glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. **105**: 691-699.
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.M. e Chern, J.-C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. **10**: 178-182.

- Cheung, L.M., Cheung, P.C.K. e Ooi, V.E.C. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*. **80**: 249-255.
- Chiralertpong, A. (2010). Modifying coffee quality by chemical manipulation [dissertação de doutoramento]. Nottingham: Universidade de Nottingham, Inglaterra
- Chung, K-T., Wong, T., Wei, C., Huang, Y-W., e Lin, Y. (1998). Tannins and Human Health: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **38**: 421-464.
- Clifford, M. e Scalbert, A. (2000). Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **80**: 1118-1125.
- Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R. e Anelli, G. (2008). Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chemistry*. **110**: 659-669.
- Dogru, Z., Nacar, T., Unal, D., Aksak, S., Albayrak, A., Odabasoglu, F., Cetin, N., Karakus, E., Gundogdu, C., Gumustekin, K. e Unal, B. (2012). Effects of diabetes mellitus and postmenopausal period on the lungs of rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **6**: 1989-2010.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M. e Mérillon, J.M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**: 1768-1774.
- Esquivel, P. e Jiménez, M. (2012). Functional Properties of Coffee and Coffee By-products. *Food Research International*. **46**: 488-495.
- Falguera, V., Aliguer, N. e Falguera, M. (2012). An integrated approach to current trends in food consumption: Moving toward functional and organic products? *Food Control*. **26**: 274-281.
- Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. **18**: 872-879.
- Franca, S. e Oliveira, S. Chemistry of defective coffee beans. In: Koeffer, E. N. (Editor) *Food Chemistry Research Developments*. New York: Nova Publishers; 2008, p. 105-138.

Ferreira, ICFR; Abreu, Rui M.V. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*. **2**: 32-39.

Ferreira, I, Baptista, P., Vilas-Boas, M. e Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*. **100**: 1511-1516.

Fresco, P., Borges, F., Diniz, C. e Marques, M. P. M. (2006). New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal Research Reviews*. **26**: 747-766.

Gomez-Pinilla, F. e Nguyen, T. (2012). Natural mood foods: the actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. *Nutr Neurosci*. **15**(3):127-33.

Goulas,V., Gomez-Caravaca, A., Exarchou, V., Gerothanassis, I., Segura-Carretero, A., e Gutiérrez, A. (2012). Exploring the antioxidant potential of Teucrium polium extracts by HPLC-SPE-NMR and on-line radical-scavenging activity detection. *LWT - Food Science and Technology*. **46**: 104-109.

Gikas, P. D., Mokbel, K. (2005). Phytoestrogens and the risk of breast cancer: a review of the literature. *International Journal of Fertility and Women's Medicine*. **50**: 250-258.

Harborne, J. B., Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. **55**: 481-504.

Haslam, E (1998). *Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action*. Edição, Cambridge University Press.

Hernandez-Montes, E., Pollard, S. E., Vauzour, D., Jofre-Montseny, L., Rota, C., Rimbach, G., Weinberg, P. D. e Spencer, J. P. E. (2006). Activation of glutathione peroxidase via Nrf1 mediates genistein's protection against oxidative endothelial cell injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **346**: 851-859.

Herrero, M. Termizoda, T., Segura-Carretero, A., Quirantes, R., Plaza, M. e Ibañez, E. (2011). New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *Journal of Chromatography A*. **1218** (42): 7511-7520.

- Herrling, T., Jung, K. e Fuchs, J. (2006). Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin. *Spectrochimica Acta A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **63**: 840-845.
- Huang, D., Ou, B. e Prior R., L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 1841-1856.
- Huang, X. (2003). Iron overload and its association with cancer risk in humans: Evidence for iron as a carcinogenic metal. *Mutation Research*. **533**: 153-171.
- Ide, T., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Kang, D., Suematsu, N., Nakamura, K., Utsumi, H., Hamasaky, N. e Takeshita, A. (2001). Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circulation Research*. **88**: 529-535.
- Jia, Z., Tang, M. e Wu, J. (1999). The determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. **64**: 555-559.
- Karadag, A., Ozcelik, B. e Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*. **2**: 41-60.
- Khanbabaee, K. e van Ree, T. (2001). Tannins: Classification and Definition. *Natural Products Report*. **18**: 641-649.
- Kondamudi, N., Mohapatra, S. e Misra, M. (2008). Spent Coffee Grounds as a Versatile Source of Green Energy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**: 11757-11760.
- Locatelli, M., Tracaglia, F., Coisson, J., Martelli, A., Stévigini, C. e Arlorio, M. (2010). Total antioxidant activity of hazelnut skin (Nocciola Piemonte PGI): Impact of different roasting conditions. *Food chemistry*. **119**: 1647-1655.
- Mac-Donald-Wicks, L. K., Wood, L. G. e Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of science of Food and Agriculture*. **86**: 2046-2056.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S. e Lima, J. L. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*. **613**. 1-19.

- Mandalari, G., Tomaino, A., Arcoraci, T., Martorana, M., Lo Turco, V., Cacciola, F., Rich, G., Bisignano, C., Saija, A., Dugo, P., Cross, K., Parker, M., Waldron, K. e Wickham, M. (2010). Characterization of polyphenols, lipids and dietary fibre from almond skins (*Amygdalus communis* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*. **23**: 166-174.
- Markesbery, W. R. e Lovell, M. A. (2006). DNA oxidation in Alzheimer"s disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. **8**: 2039-2045.
- Mekki, H., Anderson, M., Benzina, M e Aammar, E. (2008). Valorization of olive mill wastewater by its incorporation in building bricks. *Journal of Hazardous Materials*. **158**: 308-3015.
- Mussatto, S., Machado, E., Martins, S. e Teixeira, J. (2011). Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology* **4**: 661-672.
- Mussatto, S., Ballesteros, L., Martins, S. e Teixeira, J. (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*. **83**: 173-179.
- Murthy, P. e Naidu, M. (2010). Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. *Food Bioprocess Technol*. **5**: 897-903.
- Narita, Y. e Inouye K. (2012). High antioxidant activity of coffee silverskin with subcritical water. *Food Chemistry*. **135**: 943-949.
- Nathan, R. P. e Brumaghim, J. L. (2009). A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*. **53**: 75-100.
- Ndhlala, R., Moyo, M. e Van Staden, J. (2010). Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? *Molecules*. **15**: 6905-6930.
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*. **49**: 503-515.

- Omoni, A. O. e Aluko, R. E. (2005). Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of action. *Nutrition Reviews*. **63**: 272-283.
- Okuda, T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*. **66**: 2012-2031.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J. e Nuñez, M. (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry*. **85**: 267-273.
- Pinelo, M., Del Fabro, P., Manzocco, L., Nuñez, M. e Nicoli, M. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*. **92**: 109-117
- Prior, R., Wu, X. e Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity of phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 4290-4302.
- Ratnam, D., Ankola, D., Bhardwaj, V., Sahana, D. e Kumar M. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*. **113**: 189-207.
- Rajaei, A., Barzegar, M., Mobarez, A., Sahari, M. e Esfahani, Z. (2010). Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract. *Food and Chemical Toxicology*. **48**: 107-112.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. e Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. **2**: 152-159.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G.; Swatsitang, P. e Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their roles in oxidative process in fruits. *Food Chemistry*. **66**: 401-436.
- Roldán, E., Sánchez-Moreno, C., Ancos, B. e Cano, M. (2008). Characterization of onion (*Allium cepa* L.). *Food Chemistry*. **108**: 907-916.
- Ross, A., Beta, T. e Arntfields, D. (2009). A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food chemistry*. **113**: 336-344.

- Russel, W., Labat, A., Scobbie, L., Duncan, G. e Duthie, G. (2009). Phenolic acid content of fruits commonly consumed and locally produced in Scotland. *Food Chemistry*. **115**: 100-104.
- Saenger, M., Hartge, E.-U., Werther, J., Ogada, T. e Siagi, Z. (2001). *Renewable Energy*. **23**: 103–121.
- Samman, S., Sivarajah, G., Man, J. C., Ahmad, Z. I., Petocz, P. e Caterson, I. D. (2003). A mixed fruit and vegetable concentrate increases plasma antioxidant vitamins and folate and lowers plasma homocysteine in men. *Journal of Nutrition*. **133**: 2188-2193.
- Santos-Buelga, C. e Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **80**: 1094-1117.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. **30**: 3875-3883.
- Schofield, P., Mbugua, D. e Pell, A. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*. **91**: 21-40.
- Shad, M., Nawaz, H., Rehman, T., Ahmad, H., e Hussain, M. (2012). Optimization of extraction efficiency of tannins from *Cichorium intybus* L.: Application of response surface methodology. *Journal of Medicinal Plants Research*. **6**: 4467-4474.
- Sharma, A., Bhardwaj, S., Mann, A., Jain, A. e Kharya, M. (2007). Screening methods of antioxidant activity: an overview. *Pharmacognosy Review*. **1**: 232-238.
- Sharififar, F., Dehghn-Nudeh, G. e Mirtajaldini, M. (2009). Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*. **112**: 885-888.
- Schofield, P., Mbugua, D. e Pell, A. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*. **91**: 21-40.
- Silva, E., Souza, J., Rogez, H., Rees, J. e Larondelle, Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*. **101**: 1012-1018.
- Singh, P. e Saldaña, M. (2011). Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Research International*. **44**: 2452–2458.

- Singhania, R., Soccol, R. e Pandey, A. Application of tropical agro-industrial residues as substrate for solid-state fermentation processes. In: Pandey A., Soccol, C. R. e Larroche, C. (editors). *Current developments in solid-state fermentation*. Delhi: Springer; 2008, p. 412-442.
- Singleton, L. e Rossi, J. Jr. (1965). Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. **16**: 144-158.
- Smith, RM. (2002). Extractions with superheated water. *Journal of Chromatography A*. **975**: 31-46.
- Soares, S., Mateus, N., de Freitas, V. (2012). Carbohydrates inhibit salivary proteins precipitation by condensed tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **60**: 3966–3972.
- Suzuki, K., Koike, H., Matsui, H., Ono, Y., Hasumi, M., Nakazato, H., Okugi, H., Sekine, Y., Oki, K., Ito, K., Yamamoto, T., Fukabori, Y., Kurokawa, K., e Yamanaka, H. (2002). Genistein, a soy isoflavone induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3. *International Journal of Cancer*. **99**: 846-852.
- Temple, N. (2000). Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition Research*. **20**: 449-459.
- Vennat, B., Gross, D., Pourrat, A. e Pourrat, H. (1992). Hamamelis virginiana: identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extrats. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. **67**: 11-14.
- Vokurkova, M., Xu, S. e Touyz, R. M. (2007). Reactive oxygen species, cell growth, cell cycle progression and vascular remodeling in hypertension. *Future Cardiology*. **3**: 53-63
- Wang, P., Jiang, X., Jiang, Y., Hu, X., Mou, H., Li, M. e Guan, H. (2007) In vitro antioxidative activities of three marine oligosaccharides. *Natural Product Research*. **21**: 646-654.
- Wang, Z., Hsu, C. e Yin, M. (2009). Antioxidative characteristics of aqueous and ethanol extracts of glossy privet fruit. *Food Chemistry*. **112**: 914–918.

- Weaver, C. M. e Cheong, J. M. K. (2005). Soy isoflavones and bone health: the relationship is still unclear. *Journal of Nutrition*. **135**: 1243-1247.
- Wognum, P.M. (Nel), Bremmers, H., Trienekens, J., Vorst, J. e Bloemhof, J. (2011). Systems for sustainability and transparency of food supply chains - Current status and challenges. *Advanced Engineering Informatics*. **25**: 65-76.
- Wright, J., Johnson, E. e DiLabio, G. (2001). A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. **123**: 1173-1183.

Anexos

Tabela I - Resultados dos compostos fenólicos totais, em função do solvente, tempo e temperatura

				ml				
				100% Água mg EAG/L	75% Água mg EAG/L	50% Água mg EAG/L	25% Água mg EAG/L	100% Etanol mg EAG/L
T °C	25	min	30	143,2 ±19,2	178,2 ±6,7	192,5 ±4,7	204,9 ±10,1	79,4 ±0,3
			60	173,0 ±4,0	216,5 ±11,8	222,5 ±3,4	246,5 ±18,9	85,1 ±3,0
			90	164,9 ±2,4	202,7 ±5,7	213,8 ±0,5	228,9 ±0,3	91,0 ±3,4
			180	163,7 ±2,4	201,5 ±9,4	223,4 ±10,1	244,5 ±4,9	87,7 ±1,3
	30	min	30	195,6 ±2,4	228,0 ±3,0	237,6 ±1,5	221,2 ±3,2	95,1 ±7,1
			60	187,2 ±0,3	239,5 ±2,2	262,1 ±5,9	230,8 ±2,0	115,1 ±0,0
			90	209,6 ±1,3	259,7 ±9,3	268,3 ±2,9	268,3 ±2,9	117,4 ±4,9
			180	210,9 ±1,5	254,5 ±2,2	268,7 ±3,0	249,3 ±0,8	118,0 ±3,0
	40	min	30	207,5 ±7,7	244,0 ±12,0	253,7 ±1,7	237,6 ±9,3	102,2 ±1,7
			60	236,5 ±11,1	276,0 ±16,2	302,5 ±7,1	272,8 ±3,2	100,8 ±1,0
			90	193,8 ±15,7	239,0 ±7,6	263,1 ±0,2	262,5 ±5,7	120,3 ±9,1
			180	206,3 ±9,8	268,3 ±2,2	298,5 ±2,5	280,1 ±1,0	126,3 ±6,7
	50	min	30	246,5 ±1,7	229,4 ±15,8	258,5 ±0,5	250,6 ±1,3	107,5 ±2,7
			60	223,7 ±12,5	255,3 ±0,7	279,5 ±6,2	285,2 ±4,5	133,4 ±6,7
			90	235,5 ±19,7	283,5 ±3,5	320,7 ±1,9	293,9 ±8,1	127,4 ±0,8
			180	251,3 ±2,4	278,4 ±8,4	305,6 ±2,4	264,9 ±13,1	118,7 ±13,8
	60	min	30	228,1 ±25,8	250,6 ±12,8	282,0 ±8,1	282,8 ±4,2	113,4 ±1,3
			60	203,3 ±8,2	255,0 ±3,9	269,7 ±3,2	287,8 ±3,9	129,5 ±0,5
			90	235,6 ±5,7	276,3 ±2,4	313,2 ±9,1	293,1 ±10,6	109,3 ±9,6
			180	231,3 ±8,8	281,3 ±8,1	304,7 ±1,5	276,9 ±4,9	119,3 ±2,2

Tabela II - Resultados dos flavonoides totais, em função do solvente, tempo e temperatura

				ml				
				100% Água mg EEC/L	75% Água mg EEC/L	50% Água mg EEC/L	25% Água mg EEC/L	100% Etanol mg EEC/L
T °C	25	min	30	64,4 ±2,8	75,2 ±2,8	75,0 ±5,4	63,4 ±0,8	75,4 ±0,8
			60	70,4 ±2,8	87,4 ±5,9	89,0 ±2,0	72,8 ±1,7	87,0 ±5,4
			90	69,6 ±2,3	86,8 ±4,5	94,8 ±4,0	71,0 ±4,8	94,6 ±2,0
			180	58,6 ±12,7	84,0 ±0,6	90,0 ±5,1	66,2 ±0,3	98,4 ±1,1
	30	min	30	69,0 ±7,1	60,5 ±2,1	70,0 ±5,7	75,5 ±0,7	79,0 ±1,4
			60	65,5 ±3,5	65,5 ±3,5	90,5 ±3,5	82,5 ±0,7	58,0 ±1,4
			90	71,5 ±6,4	90,0 ±5,7	93,5 ±3,5	85,5 ±14,8	60,5 ±4,9
			180	74,0 ±7,1	89,5 ±3,5	76,5 ±7,8	85,0 ±9,9	62,0 ±4,2
	40	min	30	79,0 ±1,4	92,5 ±7,8	102,0 ±8,5	84,5 ±33,2	84,5 ±12,0
			60	66,0 ±9,9	72,0 ±2,8	83,0 ±1,4	69,0 ±7,1	48,0 ±8,5
			90	75,0 ±14,1	77,0 ±2,8	87,5 ±2,1	113,0 ±2,8	71,0 ±4,2
			180	75,0 ±4,2	94,0 ±0,0	113,5 ±9,2	111,5 ±4,9	76,5 ±0,7
	50	min	30	74,5 ±0,7	81,5 ±9,2	86,5 ±3,5	105,0 ±1,4	76,0 ±5,7
			60	87,5 ±3,5	86,5 ±0,7	84,0 ±2,8	116,5 ±0,7	84,0 ±5,7
			90	74,0 ±11,3	107,5 ±4,9	126,0 ±0,0	119,0 ±1,4	87,0 ±1,4
			180	96,5 ±6,4	104,0 ±11,3	112,0 ±5,7	109,5 ±2,1	85,5 ±3,5
	60	min	30	75,0 ±2,8	84,0 ±8,5	98,5 ±2,1	140,0 ±21,2	85,5 ±4,9
			60	87,5 ±27,6	88,0 ±7,1	88,5 ±4,9	123,0 ±14,1	95,0 ±2,8
			90	87,5 ±3,5	110,0 ±7,1	118,5 ±9,2	144,0 ±1,4	86,0 ±0,0
			180	86,0 ±4,2	104,0 ±4,2	114,0 ±2,8	118,0 ±8,5	85,5 ±0,7

Tabela III - Resultados dos taninos totais, em função do solvente, tempo e temperatura

				ml				
				100% Água mg EAT/L	75% Água mg EAT/L	50% Água mg EAT/L	25% Água mg EAT/L	100% Etanol mg EAT/L
T °C	25	min	30	0,14 ±0,00	0,16 ±0,00	0,16 ±0,00	0,06 ±0,00	0,17 ±0,00
			60	0,14 ±0,00	0,16 ±0,01	0,17 ±0,00	0,06 ±0,01	0,16 ±0,00
			90	0,14 ±0,01	0,18 ±0,00	0,18 ±0,00	0,06 ±0,00	0,19 ±0,02
			180	0,17 ±0,02	0,18 ±0,00	0,20 ±0,01	0,10 ±0,01	0,11 ±0,02
	30	min	30	0,14 ±0,01	0,16 ±0,00	0,18 ±0,01	0,18 ±0,00	0,06 ±0,00
			60	0,15 ±0,02	0,16 ±0,00	0,18 ±0,00	0,17 ±0,00	0,07 ±0,00
			90	0,15 ±0,01	0,19 ±0,01	0,21 ±0,02	0,20 ±0,03	0,06 ±0,00
			180	0,24 ±0,03	0,20 ±0,01	0,23 ±0,01	0,28 ±0,00	0,07 ±0,01
	40	min	30	0,18 ±0,00	0,24 ±0,01	0,26 ±0,00	0,23 ±0,03	0,06 ±0,00
			60	0,20 ±0,02	0,24 ±0,03	0,43 ±0,06	0,25 ±0,03	0,07 ±0,00
			90	0,22 ±0,01	0,22 ±0,03	0,27 ±0,03	0,29 ±0,02	0,07 ±0,01
			180	0,19 ±0,01	0,24 ±0,01	0,26 ±0,03	0,26 ±0,01	0,07 ±0,00
	50	min	30	0,16 ±0,01	0,33 ±0,02	0,30 ±0,04	0,33 ±0,00	0,07 ±0,00
			60	0,26 ±0,03	0,41 ±0,01	0,38 ±0,05	0,36 ±0,04	0,08 ±0,00
			90	0,27 ±0,04	0,40 ±0,01	0,40 ±0,04	0,37 ±0,04	0,09 ±0,00
			180	0,36 ±0,04	0,38 ±0,01	0,38 ±0,04	0,35 ±0,02	0,08 ±0,00
	60	min	30	0,25 ±0,03	0,28 ±0,04	0,26 ±0,03	0,31 ±0,03	0,08 ±0,01
			60	0,19 ±0,02	0,26 ±0,03	0,33 ±0,03	0,30 ±0,04	0,08 ±0,00
			90	0,19 ±0,02	0,32 ±0,03	0,28 ±0,01	0,35 ±0,01	0,09 ±0,00
			180	0,20 ±0,03	0,33 ±0,02	0,43 ±0,02	0,37 ±0,05	0,08 ±0,00

Tabela IV - Resultados da atividade anti-radicalar contra o DPPH•, em função do solvente, tempo e temperatura

				ml				
				100% Água	75% Água	50% Água	25% Água	100% Etanol
				mg ET/L	mg ET/L	mg ET/L	mg ET/L	mg ET/L
T °C	25	Min	30	279,0 ±84,9	270,5 ±101,1	239,0 ±0,0	228,5 ±54,4	250,5 ±77,1
			60	229,0 ±18,4	239,0 ±60,8	300,5 ±58,7	257,5 ±34,6	362,0 ±52,3
			90	256,0 ±19,8	263,0 ±42,4	284,5 ±64,3	273,0 ±60,8	273,0 ±60,8
			180	384,5 ±68,6	303,5 ±139,3	210,5 ±101,1	216,0 ±89,1	173,5 ±16,3
	30	Min	30	353,0 ±48,1	202,0 ±60,8	266,0 ±26,9	230,5 ±101,1	279,0 ±76,4
			60	300,5 ±26,2	271,5 ±21,9	343,0 ±9,9	416,0 ±4,2	288,5 ±87,0
			90	250,0 ±60,8	275,0 ±42,4	243,0 ±14,1	324,5 ±36,1	317,5 ±26,2
			180	206,0 ±14,1	193,0 ±93,3	243,0 ±46,7	380,0 ±9,9	327,5 ±16,3
	40	min	30	249,0 ±50,9	381,5 ±105,4	313,0 ±32,5	365,0 ±28,3	289,0 ±18,4
			60	262,0 ±28,3	219,0 ±36,8	326,0 ±5,7	369,0 ±14,1	202,0 ±32,5
			90	314,5 ±123,7	274,5 ±26,2	257,5 ±58,7	357,5 ±91,2	336,0 ±12,7
			180	257,5 ±21,9	234,5 ±26,2	280,5 ±34,6	370,0 ±4,2	250,5 ±101,1
	50	min	30	309,0 ±50,9	266,0 ±1,4	245,0 ±28,3	371,5 ±58,7	273,0 ±36,8
			60	252,0 ±14,1	212,0 ±9,9	219,0 ±0,0	384,5 ±36,1	233,0 ±76,4
			90	193,0 ±60,8	152,0 ±123,0	197,5 ±10,6	238,5 ±16,3	222,0 ±108,9
			180	136,0 ±72,1	127,5 ±105,4	140,0 ±70,7	267,5 ±72,8	209,0 ±123,0
	60	min	30	69,0 ±14,1	121,5 ±36,1	354,5 ±74,2	294,5 ±2,1	250,5 ±72,8
			60	130,0 ±60,8	51,5 ±26,2	253,0 ±76,4	313,0 ±19,8	206,0 ±26,9
			90	120,0 ±99,0	130,5 ±101,1	251,5 ±78,5	331,5 ±34,6	239,0 ±56,6
			180	221,5 ±36,1	167,0 ±141,4	212,0 ±66,5	271,5 ±26,2	246,0 ±168,3

Tabela V - Resultados do poder redutor, FRAP, em função do solvente, tempo e temperatura

				ml				
				100% Água mg ESF/L	75% Água mg ESF/L	50% Água mg ESF/L	25% Água mg ESF/L	100% Etanol mg ESF/L
T °C	25	min	30	809,8 ±7,1	856,2 ±75,0	1 199,0 ±260,7	370,5 ±67,9	824,0 ±35,7
			60	1 074,0 ±164,3	1 199,0 ±60,7	1 463,3 ±189,3	763,3 ±110,7	1 031,2 ±92,9
			90	1 156,2 ±53,6	1 191,9 ±67,9	1 213,3 ±25,0	263,3 ±39,3	909,8 ±42,9
			180	1 224,0 ±157,1	1 256,2 ±146,4	1 477,6 ±125,0	320,5 ±46,4	1 013,3 ±53,6
	30	min	30	1 059,8 ±50,0	1 131,2 ±7,1	1 270,5 ±110,7	945,5 ±221,4	316,9 ±57,1
			60	952,6 ±7,1	1 274,0 ±57,1	1 281,2 ±50,0	966,9 ±71,4	238,3 ±21,4
			90	970,5 ±25,0	1 170,5 ±46,4	1 338,3 ±78,6	609,8 ±1 71,4	338,3 ±71,4
			180	906,2 ±153,6	1 309,8 ±57,1	1 449,0 ±110,7	1 109,8 ±171,4	416,9 ±85,7
	40	min	30	856,2 ±39,3	1 277,6 ±139,3	1 499,0 ±175,0	995,5 ±35,7	370,5 ±53,6
			60	1 263,3 ±89,3	1 224,0 ±50,0	1 791,9 ±89,3	1 231,2 ±57,1	241,9 ±17,9
			90	870,5 ±110,7	1 216,9 ±50,0	1 313,3 ±17,9	1 077,6 ±210,7	281,2 ±21,4
			180	1 024,0 ±207,1	1 270,5 ±32,1	1 470,5 ±46,4	945,5 ±14,3	316,9 ±42,9
	50	min	30	1 316,9 ±57,1	1 059,8 ±28,6	1 227,6 ±132,1	945,5 ±71,4	552,6 ±64,3
			60	1 474,0 ±300,0	1 177,6 ±46,4	1 274,0 ±42,9	1 174,0 ±164,3	738,3 ±42,9
			90	1 213,3 ±132,1	1 641,9 ±203,6	1 734,8 ±25,0	924,0 ±121,4	220,5 ±17,9
			180	1 184,8 ±239,3	1 313,3 ±60,7	1 441,9 ±32,1	1 038,3 ±35,7	220,5 ±10,7
	60	min	30	1 152,6 ±92,9	1 006,2 ±25,0	1 474,0 ±42,9	1 474,0 ±42,9	356,2 ±39,3
			60	913,3 ±25,0	1 384,8 ±25,0	1 424,0 ±78,6	749,0 ±7 5,0	316,9 ±85,7
			90	1 352,6 ±50,0	1 474,0 ±85,7	1 656,2 ±303,6	749,0 ±75,0	706,2 ±89,3
			180	1 363,3 ±246,4	1 556,2 ±60,7	1 431,2 ±14,3	1 209,8 ±64,3	559,8 ±150,0

Tabela VI: ANOVA - valores p

Fonte de Variação	mg ET/L	mg ESF/L	mg EEC/L	mg EAT/L	mg EAG/L
Temperatura	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Tempo	0,927	0,003	0,000	0,000	0,000
Solvente	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Temperatura * Solvente	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
Tempo * Solvente	0,111	0,380	0,034	0,001	0,002
Temperatura * Tempo	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela VII: Efeito das condições de extração na concentração de compostos bioativos em extratos de pele de prata.

		mg ET/L	mg ESF/L	mg EEC/L	mg EAT/L	mg EAG/L
Solvente	100% Água	245,4 ($\pm 73,7$) ^b	1106,9 ($\pm 236,3$) ^c	75,3 ($\pm 11,4$) ^c	0,20 ($\pm 0,06$) ^c	207,4 ($\pm 30,5$) ^d
	75% Água	239,3 ($\pm 75,9$) ^b	1249,6 ($\pm 194,7$) ^b	87,9 ($\pm 12,7$) ^b	0,25 ($\pm 0,08$) ^b	245,4 ($\pm 30,3$) ^c
	50% Água	257,8 ($\pm 61,0$) ^b	1421,5 ($\pm 207,1$)^a	94,6 ($\pm 15,5$)^a	0,27 ($\pm 0,09$)^a	267,0 ($\pm 35,2$)^a
	25% Água	315,5 ($\pm 69,5$)^a	893,9 ($\pm 312,2$) ^d	97,8 ($\pm 25,9$)^a	0,24 ($\pm 0,11$) ^b	257,8 ($\pm 26,2$) ^b
	100% Etanol	274,3 ($\pm 59,5$) ^b	498,5 ($\pm 278,9$) ^e	79,0 ($\pm 13,6$) ^c	0,09 ($\pm 0,04$) ^d	109,8 ($\pm 16,0$) ^e
Temperatura (°C)	25	264,1 ($\pm 69,1$)^{a,b}	980,8 ($\pm 361,0$) ^b	78,7 ($\pm 12,1$) ^{b,c}	0,14 ($\pm 0,04$) ^d	177,7 ($\pm 53,7$) ^d
	30	288,4 ($\pm 65,0$)^a	952,8 ($\pm 382,1$) ^b	76,1 ($\pm 11,9$) ^c	0,16 ($\pm 0,06$) ^d	210,5 ($\pm 55,1$) ^c
	40	295,5 ($\pm 62,3$)^a	1026,9 ($\pm 437,9$)^{a,b}	83,7 ($\pm 18,1$) ^b	0,21 ($\pm 0,09$) ^c	224,6 ($\pm 63,7$) ^b
	50	251,2 ($\pm 65,1$) ^b	1093,7 ($\pm 420,8$)^a	95,2 ($\pm 16,2$)^a	0,29 ($\pm 0,12$)^a	237,5 ($\pm 63,8$)^a
	60	233,1 ($\pm 84,9$) ^b	1116,2 ($\pm 409,7$)^a	100,9 ($\pm 20,7$)^a	0,25 ($\pm 0,10$) ^b	237,2 ($\pm 66,4$)^a
Tempo (min)	30	270,0 ($\pm 83,2$)	955,9 ($\pm 352,8$) ^b	82,2 ($\pm 17,6$) ^b	0,19 ($\pm 0,09$) ^c	202,8 ($\pm 60,8$) ^c
	60	268,4 ($\pm 78,6$)	1064,9 ($\pm 398,1$)^a	82,6 ($\pm 16,8$) ^b	0,21 ($\pm 0,11$) ^b	219,2 ($\pm 62,9$) ^b
	90	263,7 ($\pm 55,3$)	1042,3 ($\pm 445,3$)^{a,b}	92,0 ($\pm 20,8$)^a	0,22 ($\pm 0,10$)^{a,b}	222,6 ($\pm 66,5$)^{a,b}
	180	263,6 ($\pm 73,2$)	1073,2 ($\pm 416,1$)^a	90,8 ($\pm 17,5$)^a	0,23 ($\pm 0,11$)^a	225,4 ($\pm 65,7$)^a

a,b,c,d,e - grupos homogêneos de acordo com o teste de Tuckey, a 95 % de confiança.