



ESTG

ESTUDO PARA A APLICAÇÃO DE EXTRATOS DE CÓRTEX DO PINHEIRO-BRAVO EM PRODUTOS
CÁRNEOS FUMADOS

2022



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

ESTUDO PARA A APLICAÇÃO DE EXTRATOS DE CÓRTEX DO PINHEIRO-BRAVO EM PRODUTOS CÁRNEOS FUMADOS

Rui Marcelo Dias Rodrigues



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Rui Marcelo Dias Rodrigues

ESTUDO PARA A APLICAÇÃO DE EXTRATOS DE CÓRTEX DO PINHEIRO-BRAVO EM PRODUTOS CÁRNEOS FUMADOS

Mestrado em Engenharia Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Manuela Vaz Velho

janeiro de 2022

AGRADECIMENTOS

Gostava de agradecer,

À Minho Fumeiro, pela oportunidade que me foi dada para realizar o estágio na empresa.

À minha orientadora, Professora Doutora Manuela Vaz Velho, pela sua disponibilidade, apoio e paciência demonstrados desde o início do meu trabalho.

Aos meus pais pela oportunidade que me deram e pelo apoio dado durante o meu percurso escolar.

Aos meus colegas do mestrado, pela amizade e companheirismo demonstrado ao longo destes dois anos.

À Catarina Vieito e à Diana Barros pela ajuda prestada, desde a preparação da casca pinheiro, até à realização das análises necessárias.

RESUMO

Atualmente, e cada vez mais, os consumidores exigem produtos com maior tempo de prateleira, convenientes, dando preferência a produtos naturais, em detrimento dos elaborados com aditivos químicos. Como alternativa ao uso de aditivos alimentares artificiais, diversos compostos bioativos presentes em diferentes espécies vegetais passaram a ser considerados pela indústria alimentar, principalmente devido às atividades antimicrobiana e antioxidante, requisitos essenciais para uma conservação mais natural.

A empresa acolhedora do presente estágio é uma empresa exportadora de produtos cárneos tradicionais curados, do tipo pronto-a-comer, que procura inovar e, simultaneamente, aumentar o tempo de vida útil dos seus produtos. No âmbito deste estágio, surgiu uma ideia de projeto, com o apoio da Escola Superior de Tecnologia e Gestão - Instituto Politécnico de Viana do Castelo, que consistia em extrair compostos de interesse da casca de pinheiro-bravo, que pudessem atuar principalmente como agentes antioxidantes, aumentando o tempo de vida de prateleira dos produtos da empresa. O pinheiro-bravo, *Pinus pinaster* Aiton subsp. *atlantica*, é uma árvore muito abundante no nosso país, podendo ser encontrada ao longo de todo o território, sendo o principal objetivo da sua plantação a exploração da madeira para diversos fins industriais, designadamente no fabrico de papel, como material de construção ou para mobiliário. A casca do pinheiro-bravo também se tornou um produto com bastante interesse como combustível no fabrico de *pellets*. Recentemente, devido à sua riqueza em polifenóis e polissacarídeos, que correspondem a cerca de 50 a 60% da massa da casca, tem vindo a suscitar o interesse por parte da indústria farmacêutica para aplicação em produtos cosméticos, fins medicinais como suplemento alimentar e, ainda, como aditivo alimentar.

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de extratos da casca de pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*) para futura aplicação em produtos cárneos fumados na empresa onde decorreu o estágio. Assim, foram analisados os produtos curados a testar tendo sido selecionados a “Chouriça de carne” e a “Barriga”. Foram identificadas

as etapas da produção que melhor se adequavam à adição do extrato e determinadas as quantidades de produto necessárias bem como a quantidade de extrato a adicionar em função das propriedades antioxidantes e das amostragens a considerar para as subseqüentes análises necessárias ao estudo dos tempos de vida dos produtos funcionalizados.

A extração dos compostos da casca de pinheiro, pela técnica de microondas, foi efetuada em dois ensaios distintos, e foram testados três tipos de solventes, designadamente água, água+etanol (50:50, vol/vol) e etanol. Foram avaliados os parâmetros, rendimento da extração, teor de compostos fenólicos totais dos extratos e determinada a atividade antioxidante por dois métodos distintos, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) e ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). Em qualquer dos ensaios o rendimento de extração foi superior no etanol, seguido da mistura hidroetanólica e por último da água. No caso do teor de fenólicos totais, não foram detetadas diferenças significativas no 1º ensaio de extração, mas no 2º ensaio as diferenças entre os solventes etanol e a mistura hidroetanólica foram significativas. Em ambos os ensaios a água foi o pior solvente no respeitante ao teor de fenólicos totais dos extratos. Na determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH, não existem diferenças significativas entre os solventes etanol e a mistura hidroetanólica em ambos os ensaios de extração, pelo método de ABTS existem diferenças significativas entre os solventes etanol e a mistura hidroetanólica, apenas no 1º ensaio de extração. Em ambos os métodos, foram detetadas diferenças significativas entre os extratos aquosos relativamente aos outros dois.

Palavras-chave: tempo de vida útil, produtos cárneos fumados, compostos fenólicos, atividade antioxidante, córtex de pinheiro-bravo, Pinus pinaster, extração microondas.

ABSTRACT

Nowadays, and increasingly, consumers demand products, convenient and with longer shelf life giving preference to natural products, in preference to those using chemical additives. As an alternative to the use of artificial food additives, many bioactive compounds from different plant species are now considered by the food industry, mainly due to their antimicrobial and antioxidant activities, essential requirements for a more natural conservation.

The company where this internship took place is an exporter of traditional cured meat products, ready-to-eat, which seeks to innovate and, at the same time, increase the shelf life of its products. Within this internship, a project idea emerged, together with the Escola Superior de Tecnologia e Gestão - Instituto Politécnico de Viana do Castelo, which consisted of extracting compounds of interest from maritime pine bark, which could act mainly as antioxidant agents, increasing the shelf life of the company's products. The maritime pine, *Pinus pinaster* Aiton subsp. *atlantica*, is a very abundant tree in our country and can be found throughout the entire territory, with the main objective of its plantation being the exploitation of wood for various industrial purposes, namely in the manufacture of paper, as construction material or for furniture. *Pinus pinaster* bark has also become a product of great interest as a fuel in the manufacture of pellets. Recently, due to its richness in polyphenols and polysaccharides, which correspond to about 50 to 60% of the mass of the bark, it has been arousing the interest of the pharmaceutical industry for application in cosmetic products, medicinal purposes as a food supplement and, even, as a food additive.

The purpose of this work was to obtain extracts of *Pinus pinaster* bark for future application in cured-smoked products. Thus, the products to be tested were analyzed and a pork sausage-like product “Chouriça de carne” and smoked pork belly were selected for further application of bark extracts. Also, the production steps of those products better adjusted to extract addition were selected and the amount of extract to be added were also determined according to the desired antioxidant

properties and sampling to be considered for subsequent analysis necessary to the study of products shelf life

The extraction of pine bark compounds was carried out using the microwave technique with three different solvents, water, water+ethanol (50:50, v/v) and ethanol. The extraction yield, the total phenolics content and the antioxidant activity of each extract were also determined. Different parameters were evaluated, extraction yield, content of total phenolic compounds in the extracts and the antioxidant activity by two different methods, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilhidrazilo) and ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). In any of the tests, the extraction yield was higher in ethanol, followed by the hydroethanolic mixture and finally by water. In the case of the total phenolic content, no significant differences were detected in the first extraction test, but in the second test the differences between the ethanol solvents and the hydroethanolic mixture were significant. In both tests, water was the worst solvent in terms of the total phenolic content of the extracts. In the determination of antioxidant activity by the DPPH method, there are no significant differences between the ethanol solvents and the hydroethanolic mixture in both extraction tests, on the ABTS method there are significant differences between the ethanol solvents and the hydroethanolic mixture, only in the first extraction test. In both methods, significant differences were detected between the aqueous extracts in relation to the other two.

Keywords: shelf life, smoked meat products, phenolic compounds, antioxidant activity, Atlantic pine cortex, Pinus pinaster, microwave extraction.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE DE TABELAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
1) INTRODUÇÃO	1
1.1. A empresa de acolhimento	1
1.2. Enquadramento	2
2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Produtos cárneos curados	4
2.2. O pinheiro-bravo	5
2.2.1. Características	5
2.2.2. Aplicações industriais	6
2.3. Casca (córtex) do pinheiro	7
2.3.1.1. Lenhina	7
2.3.1.2. Holocelulose	7
2.3.1.3. Extratáveis	9
2.3.2. Métodos de extração de taninos condensados	12
2.3.3. Aplicações da casca de pinheiro	15
2.4. Antioxidantes	15
2.4.1. Antioxidantes naturais endógenos	17
2.4.2. Antioxidantes naturais exógenos	17
2.4.3. Antioxidantes sintéticos	19
2.5. Suplementos alimentares com extratos de casca de pinheiro-bravo com atividade antioxidante	21
2.5.1. Pycnogenol®	21
2.5.2. Oligopin®	25
2.5.3. Flavangenol®	25
3) DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26

3.1. Escolha dos produtos a serem testados.....	26
3.2. Definição das análises a ser realizadas	29
3.3. Definição da quantidade de substrato a ser usada	31
4) MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. Recolha e preparação da casca de pinheiro	33
4.2. Extração através de microondas	33
4.3. Rendimento de extração.....	33
4.4. Teor de Fenólicos Totais	33
4.5. Atividade antioxidante através do método DPPH.....	34
4.6. Atividade antioxidante através do método ABTS	34
4.7. Análise Estatística	35
5) RESULTADOS.....	36
5.1. Rendimento de extração.....	36
5.2. Teor de Fenólicos Totais	37
5.3. Atividade antioxidante através do método DPPH.....	38
5.4. Atividade antioxidante através do método ABTS.....	40
6) CONCLUSÃO	42
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Cálculo da quantidade necessária de Barriga fumada	29
Tabela 2 - Cálculo da quantidade necessária de Chouriça Carne	30
Tabela 3 - Cronograma desde o início da produção da Barriga	30
Tabela 4 - Cronograma desde o início da produção da Chouriça Carne	31
Tabela 5 – Resultado do rendimento de extração dos diferentes solventes nos dois ensaios de extração	36
Tabela 6 - Resultados do teor de Fenólicos Totais dos diferentes solventes	37
Tabela 7 - Resultados da atividade antioxidante dos diferentes solventes através do método DPPH	39
Tabela 8 - Resultados da atividade antioxidante dos diferentes solventes através do método ABTS.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Territórios de ocupação de Pinus Pinaster (Centro Pinus, 1999).	6
Figura 2 - Fórmula estereoquímica da Celulose: polímero de unidades β -D-glucopiranosose ligadas por ligações glicosídicas β 1 \rightarrow 4 (Mirra, 2011).....	8
Figura 3 - Representação dos anéis A e B, nas flavonas, um subgrupo dos flavonóides (Adaptado de Tanase et al., 2019)	10
Figura 4 - Compostos fenólicos típicos encontrados na casca de plantas vasculares lenhosas (Tanase et al., 2019).	11
Figura 5 - Procianidina com ligações tipo 4-8 (Rohdewald, 2005).	12
Figura 6 - Fluxograma Chouriça de carne	27
Figura 7 - Fluxograma Barriga fumada.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – Microlitro

μm – Micrómetro

μmol – Micromole

Abs – absorvância

ABTS – 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid

AP-1 – Proteína ativadora 1

BHA – Hidroxianisole butilado

BHT – Hidroxitolueno butilado

CAT – Catalase

DP – Desvio padrão

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

EAE – Extração assistida por enzima

EC₅₀ – Metade da concentração efetiva máxima

EGCG – Epigallocatequina-3-galato

e-NOS – Óxido nítrico sintetase endotelial

g – Grama

GAE – Equivalentes do ácido gálico

GPx – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione

GSSG – Glutathione oxidada

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

kg – Kilograma

L – Litro

LD₅₀ – Dose letal mediana

LDL – lipoproteína de baixa densidade

m – Massa

M – Molar
MAE – Extração assistida por microondas
mg – Miligrama
mL – Mililitro
mM – Milimolar
Na₂CO₃ – Carbonato de sódio
NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido
NF-κB – Fator nuclear kappa B
nm – Nanómetro
O₂⁻ – Radical superóxido
PEF – Extração assistida por campos elétricos pulsados
PLE – Extração com líquidos pressurizados
PPO – Polifenol oxidase
RNS – Espécies reativas de nitrogênio
ROS – Espécies reativas de oxigênio
rpm – Rotações por minuto
RSA – Radical Scavenging Activity
SOD – Superóxido dismutase
t – Tempo
TBHQ - *Terc*-butil-hidroquinona
TDAH – Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade
TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa
UAE – Extração assistida por ultrassons
v – Volume

1) INTRODUÇÃO

1.1. A empresa de acolhimento

A empresa Minho Fumeiro foi fundada no ano de 1913, sob o nome de Casa Borges, tratando-se de uma mercearia e casa de fumeiros e carnes verdes. Anos mais tarde, em 1933, surgiu a marca Minho Fumeiro, tendo sido remodelada e ampliada as instalações da empresa.

A Minho Fumeiro é uma empresa tradicional familiar, mas que tenta sempre estar a par das tendências de mercado, nomeadamente as relacionadas com a preocupação com a saúde e a atenção à procura de produtos com menos conservantes químicos e simultaneamente mais seguros. A empresa já foi promotora de projetos de investigação, como por exemplo o projeto em co-promoção BIOFUMADOS e o DEM@BIOFUMADOS que se seguiu, em que os objetivos eram o aumento do tempo de prateleira dos produtos, através da bioconservação usando culturas de bactérias do ácido láctico, preservando as características sensoriais e nutricionais dos produtos, mas aumentando a segurança alimentar sem o recurso a conservantes químicos.

A empresa é uma marca bem conhecida, tanto a nível nacional como internacional, com produtos de elevada qualidade e um grande rigor no controlo de qualidade de produção.

Em 2005, a Minhofumeiro foi a primeira empresa em Portugal a obter a exigente Norma de Certificação de Qualidade ISSO 22000 pela APCER (Associação Portuguesa de Certificação).

Em 2017, migrou para a Norma FSSC 22000, da responsabilidade da Foundation of Food Safety Certification, um referencial de certificação para a fileira de abastecimento do ramo alimentar.

A empresa possui uma grande diversidade de produtos cárneos curados, entre fumados, enchidos, cozidos, inteiros ou fatiados.

A Minho Fumeiro sendo uma empresa exportadora de produtos tradicionais curados, do tipo pronto-a-comer, procura sempre a inovação e, simultaneamente,

o aumento do tempo de vida útil dos seus produtos. No âmbito deste estágio, surgiu uma ideia de projeto, com o apoio da Escola Superior de Tecnologia e Gestão - Instituto Politécnico de Viana do Castelo, que visaria a extração de compostos da casca de pinheiro-bravo, que possam atuar principalmente como agentes antioxidantes, aumentando o tempo de vida de prateleira de produtos da empresa.

1.2. Enquadramento

O pinheiro-bravo (*Pinus pinaster* Aiton, subespécie *atlantica*) é uma das espécies arbóreas mais comuns da floresta portuguesa, apresentando uma elevada importância a nível económico, sendo a sua madeira bastante usada na indústria de celulose e papel e como material de construção, acabando por gerar uma grande quantidade de resíduos, designado de biomassa florestal.

A biomassa florestal é principalmente usada para produção de energia, na forma de eletricidade ou aquecimento. No entanto, nos últimos anos, vários estudos indicam que alguma da biomassa florestal, pode oferecer outras opções a nível económico, como por exemplo a sua valorização como fonte de compostos polifenólicos (Coelho, 2013).

Nos últimos anos, o interesse por compostos naturais presentes em diversas plantas tem vindo a aumentar devido à presença de constituintes antioxidantes e antimicrobianos nos tecidos das plantas, que podem assim ser usados em alimentos ou como produtos medicinais, substituindo assim os antioxidantes sintéticos. Os polifenóis, por exemplo são um exemplo de compostos com elevada atividade antioxidante presentes em várias plantas, que podem desempenhar um papel importante na adsorção e neutralização de radicais livres e na inibição da peroxidação lipídica (Djeridane et al., 2006).

A casca do pinheiro-bravo, demonstrou ser uma fonte abundante de compostos fenólicos, podendo assim ser usada na substituição de antioxidantes de síntese, contribuindo não só para valorização de subprodutos florestais, mas também para a obtenção de produtos mais naturais e mais saudáveis (Coelho, 2013).

Os compostos fenólicos são uma categoria diversa e bioativa de metabolitos secundários de plantas que são uma parte essencial da dieta humana e de considerável interesse devido às suas propriedades biológicas.

Estudos indicam que o consumo de alimentos ricos em polifenóis pode ajudar a diminuir a incidência de inúmeras doenças, tais como: doenças cardiovasculares, cancro, doenças hepáticas, obesidade, diabetes, etc. Os compostos fenólicos também têm grande importância nas plantas, funcionando como agentes de defesa contra estimulantes fisiológicos e ambientais (Rasouli et al., 2017). Nos dois parágrafos seguintes encontram-se dois estudos que demonstram a capacidade que os polifenóis podem ter no tratamento de doenças.

Tomé-Carneiro et al. (2012), comprovaram que uma intervenção dietética usando um suplemento de uva rico em resveratrol, que é um conhecido polifenol, melhorou significativamente o estado inflamatório e fibrinolítico de pacientes que estavam usando Estatinas para prevenção primária de doença cardiovascular, num estudo que durou cerca de 1 ano. Assim, o uso da intervenção dietética à base de resveratrol é um bom complemento para a terapia tradicional usada na prevenção primária da doença cardiovascular.

O Epigallocatequina-3-galato (EGCG) é o polifenol mais presente no extrato de chá verde e demonstra ter atividades anticancerígenas em vários tipos de cancro. Shi et al. (2015), através de um estudo usando o EGCG, chegaram à conclusão de que o mesmo pode ser desenvolvido como um agente potencial para a prevenção e tratamento de cancro associado ao tabagismo, uma vez que diferentes concentrações de EGCG inibiram significativamente a migração e invasão induzidas pela nicotina.

São várias as vantagens dos polifenóis, que incluem a sua acessibilidade, especificidade de resposta e a sua baixa toxicidade, no entanto, existem também alguns problemas, nomeadamente o seu metabolismo rápido e a sua baixa disponibilidade (Rasouli et al., 2017).

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produtos cárneos curados

Os produtos cárneos curados, devido à diversidade de matérias-primas, ingredientes e processos de fabrico, apresentam uma grande variedade de sabores, texturas e formas. Nesta designação englobam-se os enchidos, mas também outras carnes curadas como os presuntos, pás e outros, sendo a carne de porco normalmente a mais utilizada (Carvalho, 2010; Noronha, s/d).

Segundo o Regulamento (CE) n.º 853/2004, os enchidos, são definidos como produtos transformados resultantes da transformação da carne ou da ulterior transformação desses produtos transformados, de tal modo que a superfície de corte à vista permita constatar o desaparecimento das características da carne fresca.

A principal característica dos enchidos, é o facto de estarem contidos em tripas comestíveis, naturais ou artificiais, podendo ser fumados ou não fumados. Nos enchidos fumados o processo predominante é a fumagem, que é responsável pela cor e o flavour característicos e os enchidos não fumados são enchidos curados em que a fumagem está ausente ou não é o processo predominante (Dias, 2018).

As zonas do Norte de Portugal são um habitat natural do porco doméstico sendo comum a sua transformação em produtos fumados e enchidos, enquanto no sul de Portugal destacam-se a zona de Barrancos e Serra de Monchique, zonas onde surgem boas condições para a sua criação (Carvalho, 2010).

São vários os países europeus que consomem produtos curados de salsicharia, principalmente os habitualmente designados de mediterrânicos, como Portugal, Espanha, França, Itália e Grécia onde o fabrico destes produtos tem uma maior importância (Dias, 2018).

Nos últimos anos, pelas suas características de conveniência, tem existido um aumento do interesse económico dos enchidos, que é comprovado pelo aumento do número de estabelecimentos fabris instalados e pela elevada variedade de produtos existentes no mercado (Dias, 2018).

Assim sendo, e cada vez mais as empresas são obrigadas não só a apresentar produtos de elevada qualidade, como também, devem arranjar formas de diferenciação das outras empresas com propostas inovadoras.

2.2. O pinheiro-bravo

2.2.1. Características

O pinheiro-bravo pertence ao grupo das Gimnospérmicas, que possui seis famílias, algumas delas com elevado interesse económico, como é o caso da família Pinaceae, à qual pertence a classe das coníferas, que inclui o género *Pinus*. Este género possui cerca de 80 espécies, onde se inclui a espécie *Pinus pinaster* Aiton subespécie *atlantica* mais conhecida como pinheiro-bravo (Baptista, 2006).

O pinheiro-bravo é uma espécie presente em Portugal há pelo menos 33 mil anos. Estende-se por todo o nosso país, no entanto é nas regiões de influência marítima que se encontram as melhores condições para o seu desenvolvimento (Centro Pinus, 1999).

É uma árvore heliófila, intolerante ao ensombramento por não possuir folhas de sombra eficientes, dá-se bem no clima atlântico temperado, sendo capaz de suportar os frios intensos e prolongados e a neve. A árvore adulta pode atingir os 30 metros de altura nas melhores condições, podendo ainda atingir os 200 anos de vida, sendo que normalmente não ultrapassa os 80 a 100 anos (Baptista, 2006; Centro Pinus, 1999).

As folhas do pinheiro-bravo são verdes, aciculares, persistentes em pares e cujas dimensões são 10–25 cm x 0,2 cm. A árvore fortifica aos 15 anos de idade, sendo o seu fruto uma pinha cónica e pontiaguda. A casca do pinheiro-bravo é espessa e fissurada, sendo castanha na zona externa e avermelhada na zona interna (Baptista, 2006).

Na figura 1, encontra-se representada a ocupação do pinheiro-bravo no território nacional.

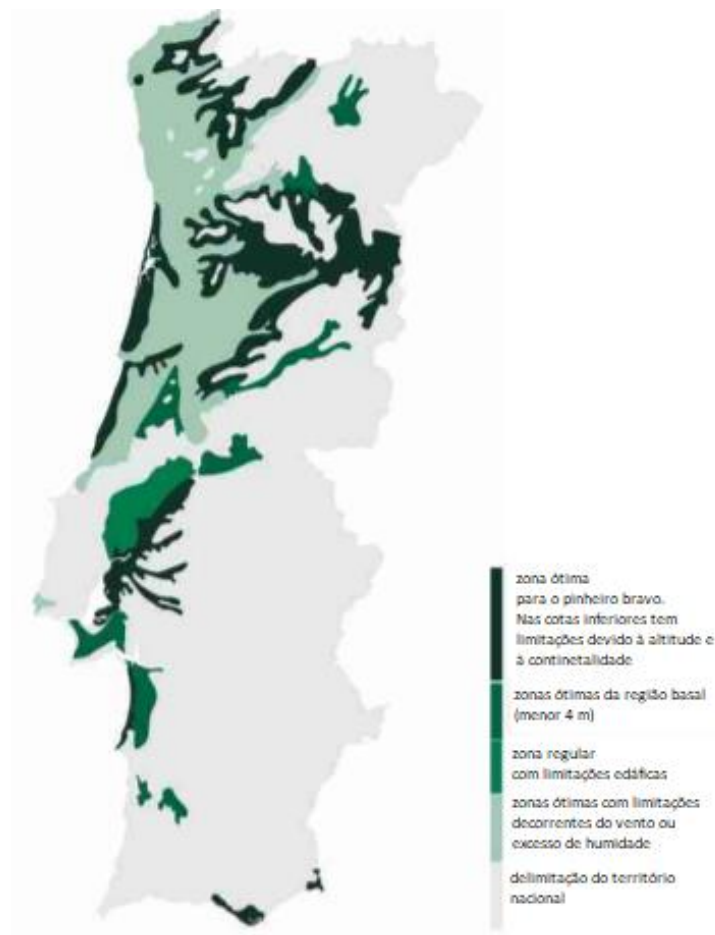


Figura 1 - Territórios de ocupação de *Pinus pinaster* (Centro Pinus, 1999).

2.2.2. Aplicações industriais

O pinheiro-bravo, é uma das espécies mais importantes para a indústria de transformação de madeira em Portugal. São várias as aplicações, destacando-se, no entanto, a sua importância no fabrico de pasta e papel, que constitui assim a única fonte de fibra longa para o fabrico da pasta *kraft* não branqueada no nosso país (Figueiredo et al., 2014).

No entanto, também é amplamente utilizada na indústria madeireira (produção de madeira para construção civil, marcenaria, mobiliário, painéis de madeira, embalagens, entre outros), na produção de resina (terebintina, breu, pez-louro, aguarrás, parafina, entre outros), na arborização de dunas e de baldios, e pelas suas propriedades medicinais (Figueiredo et al., 2014).

2.3. Casca (córte) do pinheiro

A casca de pinheiro é um produto excedentário da exploração da madeira que está a ser progressivamente mais usado, assistindo-se a uma valorização cada vez maior do mesmo. A casca de pinheiro difere da sua madeira, concretamente no teor de água, lenhina, celulose, hemicelulose, compostos extratáveis por solventes, compostos polifenólicos e cinzas (Brás, 2005). A seguir encontra-se descrita de forma sumária a composição e potenciais aplicações da casca de pinheiro-bravo.

2.3.1.1. Lenhina

A lenhina é dos compostos mais importantes e abundantes do reino vegetal, encontrando-se nas paredes vegetais das células. Consiste num heteropolímero aromático amorfo, não solúvel em água e de difícil degradação. O seu teor é muito variável em árvores de diferentes espécies, com valores mais elevados nas gimnospermas (madeiras macias) relativamente às angiospermas (madeiras duras), variando também nas diferentes partes da mesma planta (Brás, 2005; Remédios, 2010).

A lenhina desempenha duas funções principais na madeira, ligando as células entre si e tornando rígidas as paredes celulares, sendo também a segunda maior fonte de matéria orgânica do reino vegetal, a seguir à celulose, podendo por isso ser usada para aproveitamento industrial (Baptista, 2006).

A variação da lenhina casca do *Pinus pinaster* vai de 29,6 a 43,7% da casca seca (Vieito, Pires e Vaz-Velho, 2019).

2.3.1.2. Holocelulose

A holocelulose é um grupo bastante representativo na casca de pinheiro, que engloba duas classes de polissacarídeos, a celulose e a hemicelulose (Brás, 2005).

A celulose (figura 2) é um homopolímero (constituído por um único tipo de monómero), linear, composta por 2000 a 15000 monómeros de β -D-glucopirranose,

de grau de polimerização e massa molecular muito elevada. Os monómeros são ligados entre si por ligações glicosídicas entre o hidroxilo do carbono 1 de um dos monómeros e o hidroxilo do carbono 4 do monómero adjacente (Brás, 2005; Mirra, 2011).

A molécula possui uma estrutura cristalina, que é conseguida através da disposição das diferentes moléculas lado a lado e em camadas sucessivas. A estrutura cristalina é muito resistente tanto mecanicamente, como quimicamente, devido à presença de grupos funcionais que interagem, os grupos hidroxilo, formando ligações de hidrogénio do grupo com outro átomo de oxigénio de outro grupo funcional, as ligações de hidrogénio podem ser intramoleculares, formadas entre duas unidades de glucose adjacentes, ou intermoleculares, que correspondem a ligações entre grupos hidroxilo de duas cadeias adjacentes de celulose (Brás, 2005; Mirra, 2011).

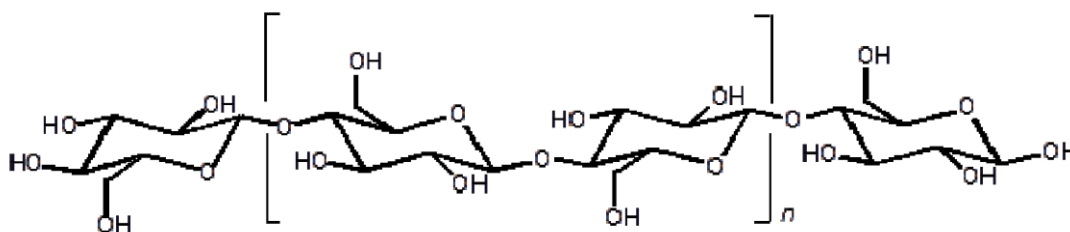


Figura 2 - Fórmula estereoquímica da Celulose: polímero de unidades β -D-glucopiranosose ligadas por ligações glicosídicas β 1 \rightarrow 4 (Mirra, 2011).

Hemiceluloses são heteropolímeros, ou seja, são polissacáridos constituídos a partir de vários açúcares e determinados após deslenhificação. As hemiceluloses várias combinações de pentoses de hidratos de carbono, predominantemente xilose e arabinose, e hexoses, que formam ligações poliglicosídeas entre si, isto é, formam cadeias cruzadas. O grau de polimerização das hemiceluloses é baixo comparativamente à celulose, com valores de 50 a 200 (Brás, 2005; Mirra, 2011).

As combinações podem ser de um só monossacarídeo (homopolímero) como é exemplo o xilano (β -D-xilose), ou por dois ou mais monossacarídeos

(heteropolímero) que é o caso do glucomanano (β -D-glucose e β -D-manose) (Brás, 2005).

A hemicelulose, juntamente com a lenhina garantem resistência mecânica à casca, devido à sua estrutura ramificada (Brás, 2005).

2.3.1.3. Extratáveis

Os compostos extratáveis englobam os polares e não polares, nomeadamente os terpenos, lignanos, estilbenos, polifenóis, gorduras, ceras, compostos aromáticos e sais de ácidos orgânicos, que representam um complexo grupo de substâncias químicas, estes compostos muitas vezes também se encontram na árvore, mas normalmente em quantidades mais reduzidas (Brás, 2005).

Os compostos fenólicos ou polifenóis são um dos grupos de substâncias mais frequentes e mais difundidos no mundo das plantas, com mais de 8000 estruturas fenólicas identificadas. Estes compostos, podem ser encontrados em praticamente todos os órgãos das plantas, possuindo de acordo com a sua estrutura diferentes funções. São metabolitos secundários essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas e sua reprodução, ajudando também no controlo do crescimento, diâmetro, pigmentação e defesa contra vários agentes patogénicos (Tanase et al., 2019).

Os polifenóis, podem ser divididos em diferentes subgrupos: ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico), flavonóides (flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanonóis, isoflavonas, antocianidinas, taninos), estilbenos (resveratrol) e lignanas encontradas em plantas e alimentos de origem vegetal (Tanase et al., 2019).

Os ácidos fenólicos são moléculas simples, onde se incluem o ácido hidroxibenzóico e o hidroxicinâmico. Os compostos do ácido hidroxicinâmico (ácido p-cumárico, ácido cafeico e ácido ferúlico) ocorrem mais frequentemente na forma de ésteres simples com ácidos hidroxicarboxílicos ou de glicose, enquanto os

compostos do ácido hidroxibenzóico (ácido p-hidroxibenzóico, ácido gálico e ácido elágico) estão presentes principalmente na forma de glicosídeos (Correia, 2012).

Os flavonóides, são também uma das principais famílias dos polifenóis, podendo ser encontrados em várias partes das plantas como raízes, folhas, caules, cascas, flores e frutos, no entanto, encontram-se em níveis mais elevados nas camadas externas das plantas, sendo bastante consumidos como parte da dieta humana, eles são reconhecidos principalmente pelas suas capacidades antioxidantes existindo também interesse a nível nutricional, na manutenção da saúde humana, como a nível tecnológico, por exemplo estudos indicam que uma dieta rica em quercetina e outros flavonóides diminui o risco de muitas doenças crônicas, como cancro, diabetes e doenças cardíacas. (Rasouli et al., 2017; Santos, 2011).

Os flavonóides possuem dois anéis aromáticos diferentes, que se formam através de duas vias diferentes, pela via do Acetato-Malonato e pela via do Ácido Xiquímico, sendo por isso considerados compostos de biossíntese mista. Deste modo, o anel A é formado a partir de três moléculas de acetato pela via do Acetato-Malonato e o anel B e os átomos de carbono 2, 3 e 4 do heterociclo central, são formados a partir da fenilalanina sintetizada pela via do Ácido Xiquímico. A representação dos anéis A e B encontra-se na figura 3. (Santos, 2011).

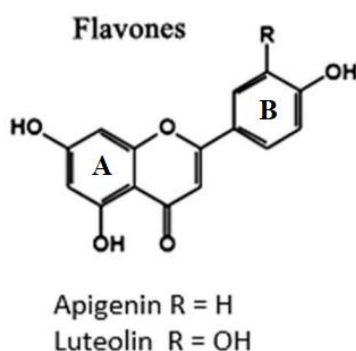


Figura 3 - Representação dos anéis A e B, nas flavonas, um subgrupo dos flavonóides (Adaptado de Tanase et al., 2019)

Os subgrupos mais comuns de flavonóides encontrados na casca de plantas lenhosas são flavonóis (quercetina, kaempferol, miricetina, etc), flavanonóis (taxifolina), flavonas (apigenina, luteolina), flavanóis (catequina, epicatequina) e taninos condensados (figuras 4 e 5) (Tanase et al., 2019).

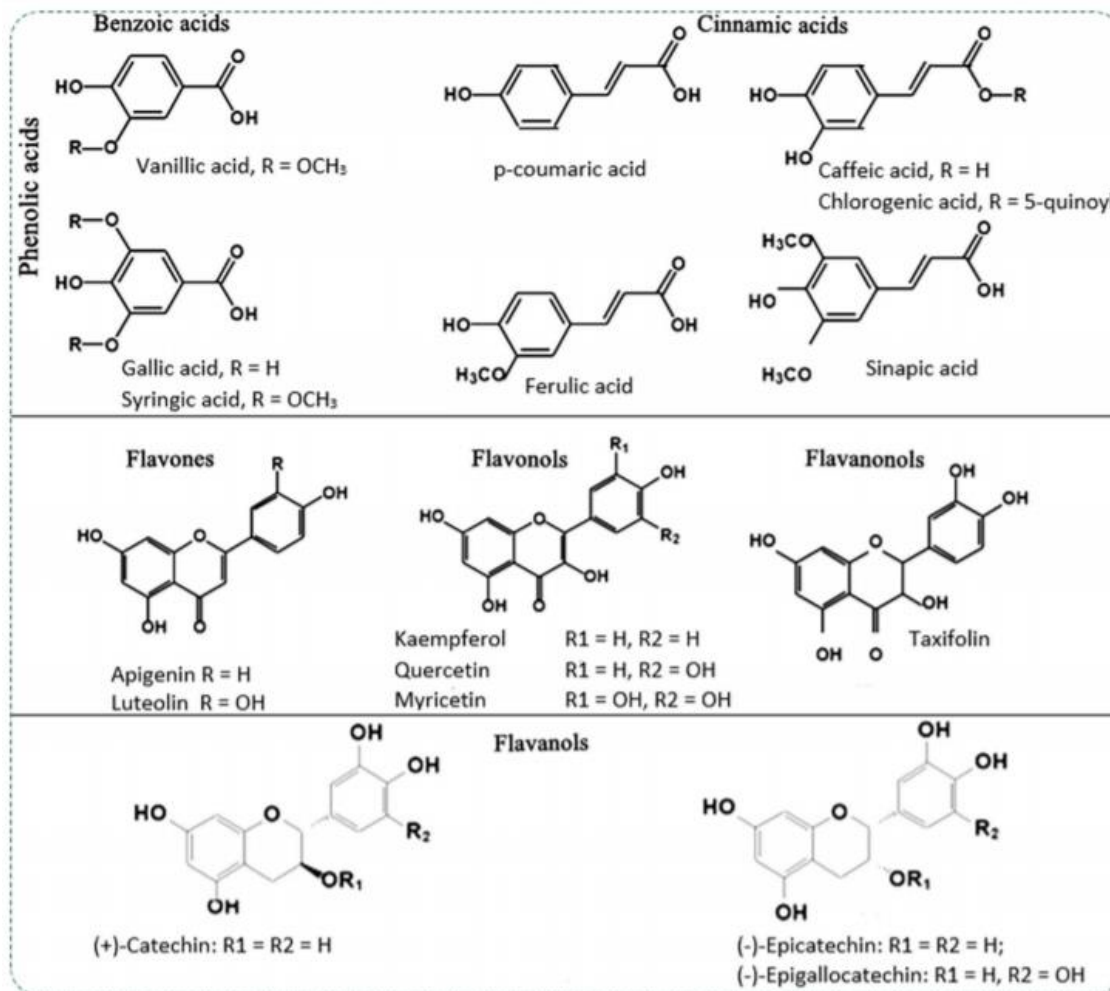


Figura 4 - Compostos fenólicos típicos encontrados na casca de plantas vasculares lenhosas (Tanase et al., 2019).

Na casca de pinheiro, a principal a fração dos polifenóis é composta por taninos, que se dividem em duas classes distintas, taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são moléculas cuja zona central consiste num poliál, geralmente D-glucose. Os grupos hidroxilo deste hidrato de carbono estão totalmente ou parcialmente esterificados com grupos fenólicos, como ácido gálico ou o ácido elágico (elagitaninos). Pelo contrário, os taninos condensados ou proantocianidinas, já são moléculas mais complexas, oligómeros ou polímeros de unidades flavanóis, podendo mesmo ser superior a 50 unidades ligadas através de ligações carbono-carbono que não são destruídas por hidrólise. Os taninos condensados constituem a maior parte dos polifenóis da casca de pinheiro-bravo e

exibem forte atividade antioxidante *in vitro* and *in vivo* (Brás, 2005; Segal, Penmana e Pirioub, 2018; Vieito, Pires e Vaz-Velho, 2019).

As procianidinas (figura 5), que pertencem ao grupo das proantocianidinas, são biopolímeros constituídos por subunidades de catequina e epicatequina, onde estão presentes comprimentos de corrente de dímeros até 12 unidades monoméricas. As unidades de catequina-epicatequina podem ser ligadas por ligações C4-C8 ou por ligações C4-C6, predominando os isômeros ligados a C4-C8. As procianidinas são o principal constituinte de um suplemento alimentar comercial, Pycnogenol.

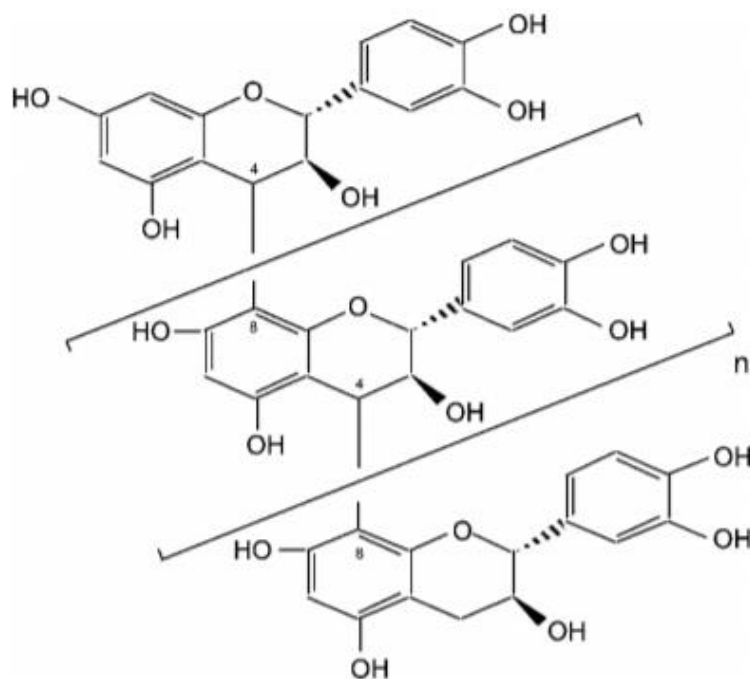


Figura 5 - Procianidina com ligações tipo 4-8 (Rohdewald, 2005).

2.3.2. Métodos de extração de taninos condensados

Existem várias técnicas de extração que diferem no seu mecanismo, material vegetal, relação sólido/solvente, tempo, temperatura, pressão, tipo de solvente e pH. As técnicas tradicionais utilizadas para a extração de plantas são maceração, percolação, digestão e extração de Soxhlet. Estes, apesar de bastante simples, tem

limitações como o baixo rendimento final, longos tempos de extração, necessidade de grandes quantidades de material vegetal e solventes (Khan et al., 2019).

A extração por Soxhlet é ainda hoje uma das técnicas tradicionais de referência para extração. O seu funcionamento é relativamente simples, a amostra que é moída é acondicionada em um saco poroso feito de papel filtro ou celulose, que é colocado na câmara de dedal do aparelho Soxhlet, no fundo, fica um balão com o solvente de extração, que é aquecido, depois vaporiza num dedal e condensa no condensador e goteja de volta. Quando o conteúdo líquido chega ao braço do sifão, ele é esvaziado no balão, e o processo repete-se como um processo contínuo. No entanto, esta técnica não é considerada ambientalmente acessível devido aos longos tempos de extração em comparação com métodos de extração avançados, tendo algumas limitações, tais como, proporção solvente-amostra, temperatura e velocidade de agitação (Khan et al., 2019).

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidas “técnicas de extração verde”, que procuram levar à substituição de solventes menos perigosos, quando comparando com os solventes tradicionais usados, etanol, hexano e dióxido de carbono. Um dos solventes que tem sido usado é a água, com o objetivo de reduzir o impacto ambiental, no entanto, para tal é necessário utilizar altas temperaturas de extração para facilitar a recuperação dos compostos menos polares, assim, algumas técnicas têm sido desenvolvidas como a extração assistida por micro-ondas (MAE) ou a extração com líquidos pressurizados (PLE), pois permitem trabalhar em temperaturas acima do ponto de ebulição. Outras técnicas verdes usadas são a extração assistida por ultrassons (UAE), extração assistida por campos elétricos pulsados (PEF) e extração assistida por enzima (EAE) (Vieito, Pires e Vaz Velho, 2019).

O MAE faz parte dos novos métodos de extração, torna-se bastante eficiente na extração de compostos de plantas, uma vez que a energia de microondas pode aumentar rapidamente a temperatura dentro das células vegetais por meio da condução iónica e rotação dipolar, resultando na rutura das paredes celulares e acelerando a libertação dos compostos no solvente. Quando comparado com outros métodos convencionais de extração, como por exemplo o Soxhlet, este

requere menor energia, menor tempo e menos consumo de solvente orgânico para produzir maior rendimento, pode extrair compostos polares e não polares, para além de ser de fácil operação e económico (Chupin et al., 2015; Zhao et al., 2018).

A UAE é um processo realizado com o uso de um banho de ultrassom ou sonda de ultrassom envolvendo o uso de frequências de ultrassom que variam entre 20 e 2.000 kHz. As ondas de ultrassom destroem os tecidos vegetais, degradando as paredes das células, liberando o conteúdo da célula também causa a difusão do solvente na matriz da planta, resultando em maior transferência de massa e maior rendimento de polifenol. Aqui, o solvente mais indicado, parece ser uma mistura hidroetanólica, que aparenta ser o mais adequado para a recuperação máxima de polifenóis de diferentes fontes (Khan et al., 2019).

A PLE, é uma técnica nova de extração que usa solventes orgânicos acima de seu ponto de ebulição normal em altas pressões e temperaturas. Aqui, a amostra sólida é embalada em uma célula de extração e a extração adicional é conduzida usando um solvente adequado em alta temperatura (40–200 °C) e pressão (500–3000 psi) por um curto período (5–15 min). O gás comprimido adicional, é usado para recolher o extrato da amostra para um frasco de recolha (Khan et al., 2019).

A PEF, consiste na aplicação de pulsos curtos de campos elétricos intensos durante um curto período (cerca de micro a milissegundos). O processo baseia-se na potencial formação de poros no interior das membranas celulares, devido à sua exposição a campos elétricos de força baixa a moderada durante um tempo muito curto, a este fenômeno dá-se o nome de “eletroporação” ou “eletropermeabilização”. Uma das principais vantagens da extração de PEF é um curto tempo de tratamento, que tem um impacto positivo no consumo de energia (Sicaire et al., 2019).

A EAE, consiste no uso de enzimas para extrair compostos fenólicos como pectinase, celulase, hemicelulase e glucanase, isto porque as enzimas aumentam a extração por meio da desintegração da parede celular da planta, resultando assim na liberação de polifenóis complexos da parede celular. Em comparação com as técnicas de extração convencionais, esta técnica possui algumas vantagens, uma

vez que é fácil e rápida para aumentar a desintegração da parede celular levando a uma maior separação e concentração de compostos polifenólicos (Khan et al., 2019).

2.3.3. Aplicações da casca de pinheiro

São vários os produtos que podem ser obtidos a partir de casca de pinheiro. As frações da casca de pinheiro com maior interesse são, os polifenóis e os polissacarídeos, que correspondem a cerca de 50 a 60% da massa da casca. A casca de pinheiro, tem sido amplamente utilizada para produção de taninos, corantes, colas, e de alguns suplementos alimentares com funções anti-inflamatórias, vasodilatadoras ou como mitigadores de melanomas (Brás, 2005).

No caso presente realça-se a função antioxidante dos seus extratos e o potencial uso como antioxidantes naturais.

2.4. Antioxidantes

Um antioxidante pode ser definido como: qualquer substância capaz de retardar ou inibir a oxidação de um dado substrato, mesmo se presente em baixas concentrações. Tem a capacidade de prevenir os efeitos de radicais livres muito prejudiciais e reativos, por meio de reações oxidativas que ocorrem nos alimentos (Khan et al., 2019).

A oxidação consiste numa reação química que produz radicais livres pela transferência de elétrons de uma para outra molécula oxidante, e a formação destes radicais livres provoca várias reações em cadeia. A função dos antioxidantes é encerrar essas reações em cadeia removendo intermediários dos radicais livres e inibindo outras reações de oxidação ao serem eles próprios oxidados. Como resultado, os antioxidantes são frequentemente agentes redutores, como tióis, ácido ascórbico ou polifenóis (Hamid et al., 2010; Khan et al., 2019).

As células aeróbias produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) como um subproduto do processo metabólico, conseqüentemente, as ROS causam danos oxidativos às macromoléculas quando as defesas antioxidantes do corpo estão sobrecarregadas. Quando existe uma sobrecarga das defesas antioxidantes, isso significa que deixou de haver um equilíbrio entre a formação e a remoção de espécies reativas, ocorrendo assim o chamado stress oxidativo (Morais, 2011; Salehi et al., 2018).

Os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos do corpo humano, regulam o equilíbrio entre ROS e antioxidantes, no entanto, os antioxidantes que são obtidos principalmente através do consumo de frutas e vegetais, também têm sido associados a um grande equilíbrio entre os radicais livres e o estado antioxidante, o que ajuda a minimizar o stress oxidativo e reduzir o risco de cancro, doenças cardiovasculares e envelhecimento (Salehi et al., 2018).

Um dos principais motivos para a deterioração da qualidade dos alimentos é a oxidação lipídica, que pode também gerar odores e sabores desagradáveis, diminuir o tempo de prateleira, alterando a textura e a cor e diminuindo o valor nutricional dos alimentos (Shahidi e Ambigaipalan, 2015).

A oxidação pode ser minimizada pela remoção de compostos como metais e ácidos gordos livres, juntamente com a proteção do ar e da luz. Dos maiores problemas oxidativos nos alimentos, destacam-se o escurecimento enzimático e o ranço lipídico, que são causados pela oxidação enzimática de compostos fenólicos pelo polifenol oxidase (PPO) em frutas e vegetais e pela decomposição de ácidos gordos insaturados em alimentos que contêm lipídios, respetivamente (García e Searle, 2016).

Os alimentos contêm uma série de diferentes sistemas de defesa antioxidante para prevenir o efeito prejudicial das espécies reativas de oxigênio, no entanto, como já foi mencionado, a formação de espécies oxidantes pode aumentar e os sistemas antioxidantes podem ser sobrecarregados, levando a reações oxidativas descontroladas, resultando em perda de qualidade, diminuição do prazo de

validade e formação de produtos de oxidação potencialmente tóxicos (Chen e Xu, 2019).

Assim, para controlar a oxidação lipídica nos alimentos, a adição de antioxidantes é a melhor opção (Shahidi e Ambigaipalan, 2015).

2.4.1. Antioxidantes naturais endógenos

Os antioxidantes endógenos são aqueles que se encontram nos organismos vivos para lutar contra os danos provocados pelos radicais livres e outras espécies reativas, possuindo vários mecanismos de defesa que atuam de diferentes formas.

Os antioxidantes naturais endógenos são antioxidantes enzimáticos que podem ser encontrados tanto no meio intracelular, como no meio extracelular, sendo a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos dos elevados níveis de ROS e RNS (Morais, 2011).

O sistema enzimático é formado por diversas enzimas, onde se destacam a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (Mamta et al., 2014).

2.4.2. Antioxidantes naturais exógenos

Os antioxidantes exógenos, são aqueles que são ingeridos através da nossa dieta, inclui essencialmente alimentos de origem vegetal, podem ser extremamente benéficos tendo um papel crucial na minimização dos danos causados pelo excesso de radicais livres. Estes antioxidantes encontram-se distribuídos em vários órgãos vegetais como, sementes, cereais, legumes, frutos, folhas, raízes, estando também presentes nos animais e em microrganismos, protegendo-os do stresse oxidativo e contribuindo para a prevenção e manutenção da saúde humana (Ferreira et al., 2010; Moraes, 2011).

Os vegetais têm antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos, que podem atuar individualmente, sendo mais eficazes quando atuam em conjunto, permitindo assim eliminar radicais livres, quer na fase aquosa quer na lipídica (Morais, 2011).

Podem-se distinguir diferentes grupos de antioxidantes naturais que são:

Minerais – estes funcionam como cofator de enzimas antioxidantes, sendo que a sua ausência, afeta o metabolismo de muitas macromoléculas, como os carboidratos. Alguns exemplos são o selênio e o zinco. O zinco é componente estrutural e catalítico da enzima superóxido dismutase presente no citoplasma de todas as células, que é essencial para a integridade e funcionalidade das membranas celulares (Ferreira et al., 2010; Hamid et al., 2010).

Vitaminas – estas são necessárias para a maioria das funções metabólicas do corpo. Algumas importantes são a vitamina C e vitamina E (Hamid et al., 2010).

Fitoquímicos – estes estão presentes em vários produtos como: fruta, vegetais, leguminosas, especiarias, ervas aromáticas e medicinais, tendo um papel importante como agentes protetores contra danos oxidativos. Os fitoquímicos também são conhecidos por possuírem propriedades anticancerígenas, podendo funcionar na prevenção e tratamento de vários cancros. Os compostos fitoquímicos dividem-se em diferentes classes, que são, os alcaloides, carotenóides, compostos azotados, organofosforados e os compostos fenólicos, que são a classe mais generalizada na natureza (Morais, 2011).

A vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico, é um antioxidante que permite a transferência de eletrões, terminando as reações de oxidação em cadeia, podendo também atuar ao captar oxigénio (Rodrigues, 2017).

A vitamina E, também conhecida como alfa-tocoferol é encontrada em amêndoas, em muitos óleos, podendo também ser encontrada na manga, nozes, brócolos, entre outros. Esta vitamina impede ou minimiza os danos provocados pelos radicais livres associados com doenças específicas, incluindo o cancro, artrite e o envelhecimento (Ferreira et al., 2010; Hamid et al., 2010).

Os compostos fenólicos, presentes em várias espécies de plantas, podem ser encontrados em várias partes das plantas, como raízes, folhas, caules, cascas,

flores e frutos. Muitas vezes as camadas mais externas das plantas, são aquelas que contêm os maiores níveis de compostos fenólicos, que normalmente oferecem uma maior resistência mecânica às paredes celulares (Santos, 2011).

Os compostos fenólicos, são solúveis em água e ocorrem nas plantas na forma livre ou ligados a açúcares (glicósidos) ou proteínas. São componentes substanciais da fração não energética da dieta humana e também podem ser utilizados sob a forma de suplementos alimentares, juntamente com certas vitaminas e minerais (Santos, 2011).

Os polifenóis encontram-se tanto nas partes comestíveis, como nas não comestíveis das plantas, e para além das suas propriedades antioxidantes, também contribuem para as características sensoriais dos alimentos, como a cor, o aroma e o sabor (Morais, 2011).

2.4.3. Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos são aqueles que são sintetizados artificialmente através de diferentes técnicas. Todos eles, são compostos polifenólicos e funcionam capturando radicais livres para interromper as reações em cadeia, os derivados polifenólicos geralmente compreendem mais de um grupo hidroxilo ou metoxi (Khan et al., 2019).

Devido à sua atividade e grande acessibilidade, os antioxidantes sintéticos são amplamente aplicados como aditivos para evitar a rancificação dos alimentos, podendo também ser usados na indústria farmacêutica, como conservantes nos cosméticos (Khan et al., 2019).

São largamente utilizados para estabilizar alimentos ricos em gordura pela sua eficiência a reduzir a oxidação lipídica, no entanto, estes sempre levantaram questões relativas à sua potencial toxicidade e carcinogenicidade a longo prazo, sendo por isso mesmo, muito restritos e altamente regulados, sendo apenas permitidos teores muito reduzidos na sua utilização alimentar (Rodrigues, 2017).

A maioria dos antioxidantes sintéticos é composta por terminadores de radicais que interrompem as cadeias de radicais livres, evitando assim a oxidação de lípidos,

sendo os mais usados, o hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA) e a butil-hidroquinona terciária (TBHQ) (Khan et al., 2019).

O BHT é um sólido cristalino branco, que é insolúvel em água, mas é facilmente solúvel em gorduras e óleos, quando comparado com outros antioxidantes, como o BHA e o TBHQ. O seu ponto de fusão é de 70 °C e o ponto de ebulição é de 265 °C (Schyvens, 2014). É dos antioxidantes mais usados na indústria alimentar, especialmente em alimentos com baixo teor de gordura, produtos de peixe, materiais de embalagem, parafina e óleos minerais. Ele é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal quando ingerido, sendo depois distribuído pelo fígado e gordura corporal. A excreção é feita normalmente pela urina, podendo também ser feita através das fezes (Barreira e Ferreira, 2019; Schyvens, 2014).

O BHA é uma mistura de dois isómeros químicos, 2(3)-*terc*-butil-4-hidroxianisol (3-BHA) e 2-*terc*-butil-4-hidroxianisol (2-BHA). É um sólido ceroso branco ou amarelado que possui um odor aromático e um sabor ardente levemente amargo, que se degrada com a exposição prolongada à luz. O BHA é insolúvel em água, mas assim como o BHT é solúvel em óleos e gorduras. O seu ponto de fusão é entre 48-55 °C e o ponto de ebulição é entre 264-270 °C. Algumas das principais aplicações incluem a preservação da soja e óleo de palma em cereais e produtos de confeitaria (no entanto, o TBHQ é mais eficaz em óleos vegetais do que o BHA). Pode também ser usado em produtos de panificação, devido à elevada estabilidade térmica e às suas condições alcalinas suaves e pode também atuar como um co-antioxidante, regenerando outros antioxidantes como o BHT. No entanto, não é adequado para ser aplicado na fritura devido à sua volatilidade. Em relação ao seu metabolismo, o BHA é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, metabolizado e excretado principalmente na urina e/ou fezes. Os principais metabolitos do BHA são glucuronídeos, sulfatos e fenóis livres em proporções que variam de espécie para espécie (Barreira e Ferreira, 2019; Schyvens, 2014).

TBHQ (2-*terc*-butil-hidroquinona) é um composto sintético, polar, pertencente ao grupo de compostos fenólicos. É muito conhecido pelas suas capacidades antioxidantes, atuando como antioxidante primário de quebra de cadeia. É um antioxidante difenólico altamente eficaz, sendo usado como conservante para óleos

vegetais insaturados e muitas gorduras animais comestíveis. Pode ser usado também a nível industrial e na perfumaria (Mamta et al., 2014; Rodrigues, 2017).

Devido a estes antioxidantes serem bastante usados como aditivo alimentar, a toxicidade dos mesmos é bastante estudada. Estudos de toxicidade a longo prazo do BHT, demonstraram que altas doses de BHT podem exercer efeitos promotores de tumor no fígado e no pulmão em alguns animais. Em relação ao BHA, vários estudos foram feitos para averiguar a toxicidade e carcinogenicidade a longo prazo com o uso do BHA, demonstrando, que em animais com *forestomach* (*forestomach* é um dos constituintes do estômago de alguns animais, como ratos e hámsters), foram observadas hiperplasias epiteliais gástricas, papilomas e carcinomas ligados à exposição ao BHA. Estudos relacionados com o TBHQ, também sugerem que a exposição a níveis elevados de TBHQ pode ser carcinogénica em ratos, que pode ser devido à formação metabólica de formas oxidadas de TBHQ (TBBQ) e à geração de ROS. Alguns estudos in vitro indicaram que o TBHQ causava danos ao DNA, causando mutações cromossómicas (Gharavi et al., 2007; Schyvens, 2014).

2.5. Suplementos alimentares com extratos de casca de pinheiro-bravo com atividade antioxidante

No mercado existem já suplementos alimentares com extratos de casca de pinheiro-bravo (*Pinus pinaster* Aiton subsp. *atlantica*), todos reivindicando a sua origem na floresta “Les Landes de Gascogne”, no sudoeste da França: Pycnogenol® (Horphag Research, Suíça), Olygopin® (DRT, França) e Flavangenol® (Toyo Shinyaku Inc., Japão). O Pycnogenol® é de longe o mais estudado (Mármol et al., 2021).

2.5.1. Pycnogenol®

O extrato é comercializado em todo o mundo como aditivo alimentar, para usos medicinais e ainda para utilização em cosméticos. Uma monografia recente compilou cerca de 400 estudos sobre o Pycnogenol relatou que vários estudos

farmacológicos empregando modelos in vitro, animal e/ou humano reportaram que o Pycnogenol possui atividades antioxidantes e anti-inflamatórias potentes (Oliff e Blumenthal, 2019; Rohdewald, 2005).

O Pycnogenol contém vários compostos ativos, sendo na maioria flavonóides, com os monómeros epicatequina e catequina que compõem a maioria e fenóis que também se encontram entre os constituintes (Cordova et al., 2013).

No Pycnogenol podem ser encontrados ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico: ácido p-hidroxibenzóico, ácido protocatecuico, ácido vanílico e ácido gálico, ou de ácido cinâmico, ácido p-cumarico, ácido cafeico e ácido ferúlico, podendo também ser encontrados, glicosídeos e esteres de glicose (Rohdewald, 2005).

O Pycnogenol® está padronizado para conter $70 \pm 5\%$ de procianidinas, que consistem em catequina condensada e epicatequina (Oliff e Blumenthal, 2019; Rohdewald, 2005).

Alguns iões orgânicos, como o cálcio, potássio e ferro estão presentes, podendo também encontrar-se manganês, zinco e cobre (Rohdewald, 2005).

O extrato de Pycnogenol é obtido através da casca do pinheiro, usando uma solução de 30% água e 70% etanol como meio de extração. A extração é feita com o uso de equipamentos patenteados, o que permite um processo contínuo e automatizado. O resultado é um pó fino, de cor castanha, que é solúvel em água, que é estável durante 3 anos, sendo armazenado num ambiente escuro e seco (Oliff e Blumenthal, 2019).

Uma das ações do extrato de Pycnogenol é a ajuda na prevenção de doenças cardiovasculares, através da melhoria da saúde endotelial. As células endoteliais revestem a parede interna dos vasos sanguíneos e a sua função é prejudicada tanto por estímulos inflamatórios e stress oxidativo como com o envelhecimento e diabetes (Oliff e Blumenthal, 2019).

Através de pesquisas *in vitro*, foi possível observar que o Pycnogenol foi capaz de proteger células endoteliais cultivadas da lesão oxidativa, inicialmente induzida através do uso de hidroperóxido t-butilo (Oliff e Blumenthal, 2019).

Estudos feitos em voluntários humanos, demonstraram que o Pycnogenol melhorou a dilatação da artéria aorta, esse relaxamento também foi inibido na presença de um inibidor de óxido nítrico sintetase endotelial (e-NOS) (Rohdewald, 2019).

Vários estudos realizados *in vitro* relataram o poder antioxidante do Pycnogenol, demonstrando que este podia eliminar os radicais hidroxilo e os aniões superóxido, podendo também prolongar a vida útil e aumentar a função antioxidante do radical ascorbato (vitamina C), podendo ainda aumentar a atividade de outros sistemas antioxidantes, nomeadamente superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase (Oliff e Blumenthal, 2019).

Como agente antioxidante o Pycnogenol é capaz de inativar espécies reativas de oxigénio e outros radicais livres, aumentando a capacidade antioxidante plasmática em estudos com idosos, estudantes, atletas, fumadores e mulheres (Rohdewald, 2019).

A capacidade das procianidinas presentes no Pycnogenol, na eliminação de radicais baseia-se em sua capacidade de reter a atividade de eliminação por rearranjos intramoleculares. Através do uso de Pycnogenol, foi possível aumentar a vida útil do radical ascorbil em comparação com outros bioflavonoides, e a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) foi inibida *in vitro*. A toxicidade de drogas antitumorais produtoras de radicais livres foi reduzida pelo pré-tratamento com Pycnogenol sem reduzir a atividade anticancerígena da doxorubicina e ciclofosfamida (Rohdewald, 2005).

O Pycnogenol também foi capaz de bloquear a ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB) e da proteína ativadora 1 (AP-1), que são os principais fatores de transcrição envolvidos centralmente nos processos inflamatórios. Nas células endoteliais humanas, o pré-tratamento com Pycnogenol suprimiu a ativação de NF-kB pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), indicando assim que as respostas

pró-inflamatórias podem ser inibidas pelo Pycnogenol no início da cadeia de reação bioquímica no nível transcricional (Rohdewald, 2005).

Através de estudos feitos, ficou comprovado que o uso de Pycnogenol para o tratamento de diabetes, pode ser uma alternativa viável. Foram realizadas experiências *in vitro* com alfa-glucosidade, que é uma enzima que hidrolisa resíduos de glicose dos polissacarídeos, quando esta enzima é inibida, a absorção de glicose é reduzida. Usou-se assim o Pycnogenol, em comparação com a acarbose, que é um inibidor da alfa-glucosidade e verificou-se que o Pycnogenol, é um potente inibidor da alfa-glucosidade, sendo mais potente ainda do que a acarbose. A atividade inibidora da acarbose pode ser até 190 vezes menor do que o extrato da casca de pinheiro (Bedekar et al., 2010; Oliff e Blumenthal, 2019).

Acredita-se que a capacidade antidiabética do Pycnogenol seja devido à atividade inibidora da enzima digestiva, sendo que a sua atividade inibidora pode ser comparada à dos extratos de catequina do chá verde e à acarbose. Dos compostos polifenólicos presentes no Pycnogenol, apenas a catequina e as procianidinas apresentam ação inibitória da alfa-glucosidade (Bedekar et al., 2010).

O Pycnogenol, foi durante muito tempo usado para tratar sintomas de hiperatividade, já no ano de 1999 foi relatado um estudo de caso, em que a suplementação com Pycnogenol, durante 4 semanas, resultou em uma diminuição significativa na hiperatividade e impulsividade em um paciente com TDAH (transtorno de déficit de atenção/hiperatividade). Já mais tarde em 2006, um estudo feito a 61 crianças e adolescentes com TDAH, demonstrou efeitos benéficos após a toma de 1mg/kg de Pycnogenol durante um mês (Kapalka, 2010).

O TDAH, pode envolver uma desregulação das catecolaminas (por exemplo, dopamina, adrenalina e noradrenalina). Um estudo, decidiu por isso medir os níveis das catecolaminas em crianças com TDAH e sem TDAH, constatando que, crianças com TDAH, apresentaram níveis significativamente mais altos de adrenalina e noradrenalina na urina em comparação com crianças saudáveis. As crianças com TDAH, fizeram um tratamento com Pycnogenol, onde foi possível verificar que o uso de Pycnogenol, tendeu a normalizar os níveis das catecolaminas nas crianças

com TDAH, e estudos posteriores, concluíram também que o Pycnogenol é capaz de diminuir a hiperatividade e o stress oxidativo (Oliff e Blumenthal, 2019).

2.5.2. Oligopin®

A matéria-prima do Oligopin é obtida do pinheiro *Pinus pinaster*, colhido na maior floresta cultivada da Europa (Landes da Gasconha França), o processo de extração dos compostos começa com uma extração sólido-líquido (água) para obter o teor total de polifenóis, seguindo-se uma extração líquido-líquido para remover os taninos, e termina com uma etapa de recristalização para remover monômeros e ácidos fenólicos (Segala, Penmana e Piriou, 2018).

Cada vez mais estudos evidenciam que o Oligopin pode ter efeitos antiapoptóticos, antiinflamatórios e antioxidantes. Este contém numerosos polifenóis, como proantocianidinas (por exemplo, epicatequina e catequina) (70-50%), ácidos fenólicos e monómeros polifenólicos. Vários ensaios clínicos, que incluíram pacientes com vários históricos de doenças e indivíduos saudáveis indicou que o Oligopin é seguro e não tóxico, dependendo da dosagem usada (Majidi et al., 2021).

2.5.3. Flavangenol®

O Flavangenol é um extrato de casca de *Pinus pinaster*, colhido na floresta Landes da Gasconha, França, obtido pelo método de extração com água quente. Os principais constituintes do Flavangenol são as proantocianidinas oligoméricas (OPCs) que representam cerca de 60% de todos os componentes. Este em comparação com o Pycnogenol, que é obtido pelo método de extração com água e etanol, possui uma menor quantidade de polifenóis, como o monómero catequina e taxifolina e outras proantocianidinas. O Flavangenol é amplamente utilizado como suplemento nutricional para proteção contra doenças crônicas relacionadas à idade, como aterosclerose, hipertensão e diabetes (Ohkita, Kiso e Matsumura, 2011; Kimura e Sumiyoshi, 2010).

3) DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Escolha dos produtos a serem testados

O primeiro passo do delineamento experimental, foi precisamente a escolha dos produtos para a futura aplicação dos extratos de pinheiro-bravo.

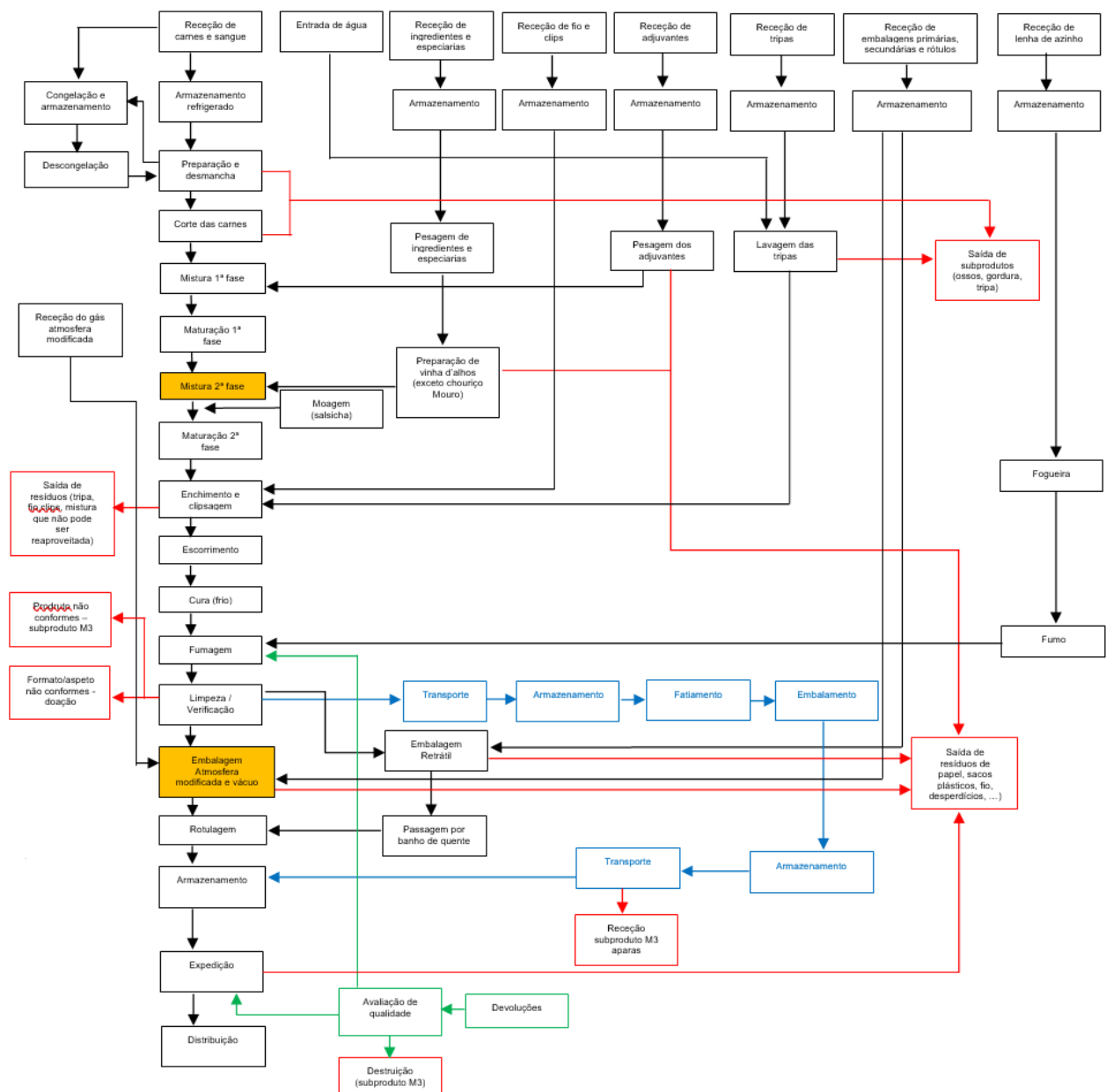
Após o levantamento dos produtos da empresa, tendo em conta as suas características, designadamente a tipologia diferente e o elevado teor em gordura, e também a elevada procura por parte dos consumidores, a escolha recaiu sobre dois produtos - a “Chouriça de Carne” (enchido) e a “Barriga de Porco”.

A chouriça de carne tem um tempo de vida de prateleira de 4 meses (120 dias). O objetivo da empresa é aumentar o tempo de vida deste produto para 180 dias.

A barriga tem um tempo de vida de prateleira de 3 meses (90 dias), sendo o objetivo também aumentar o tempo de vida do produto por mais 60 dias, até aos 150 dias.

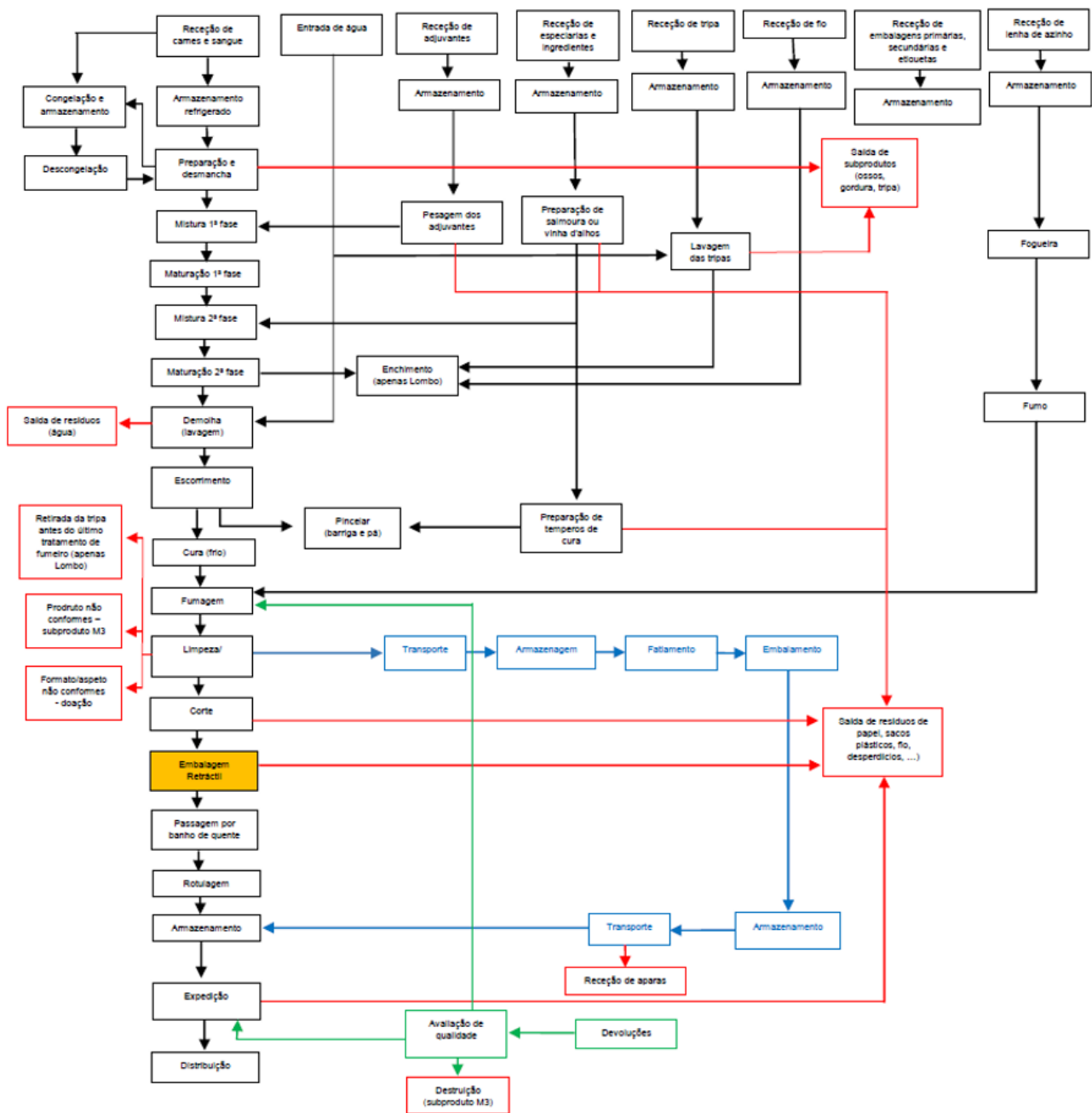
Seguidamente foi averiguado qual a etapa do processo mais adequada à aplicação do extrato, quer do ponto de vista da praticabilidade industrial não acarretando tempo adicional ao processo, quer do ponto de vista da maximização do potencial efeito antioxidante desejado aplicando na etapa mais a jusante possível. Nas figuras 6 e 7 apresentam-se os fluxogramas dos dois produtos selecionados onde se assinala (a amarelo) as etapas onde se prevê que serão aplicados os extratos, designadamente para a chouriça de carne adicionando na 2ª mistura e/ou pincelando externamente na tripa antes da embalagem, e, no caso da barriga fumada após o corte e antes da embalagem.

Testes preliminares permitirão decidir, no caso da chouriça de carne, qual a etapa selecionada para os estudos de prolongamento do tempo de vida do produto, em função da determinação da atividade antioxidante a avaliar no final do atual tempo de prateleira de 120 dias.



Legenda:
 Preto – Processo Minhofumeiro
 Azul – Serviço subcontratado
 Verde – Tratamento de devoluções
 Vermelho – Saída resíduos

Figura 6 - Fluxograma Chouriço de carne



Legenda:
 Preto – Processo Minhofumeiro
 Azul – Serviço subcontratado
 Verde – Tratamento de devoluções
 Vermelho – Saída resíduos

Figura 7 - Fluxograma Barriga fumada

3.2. Definição das análises a ser realizadas

Como o objetivo é o prolongamento do tempo de vida de prateleira dos produtos, foram selecionadas as análises necessárias para validar este tempo. Assim, determinou-se que seriam realizadas análises físico-químicas, nomeadamente à atividade da água e ao pH, análises microbiológicas de acordo com o tipo de produto, análises à oxidação das gorduras, análises da composição nutricional final, e por fim análises sensoriais.

As análises serão efetuadas mensalmente até ao tempo de vida útil atual do produto e depois de 15 em 15 dias até ao final do tempo experimental, com a exceção das análises nutricionais que serão feitas no início e no fim do tempo experimental. Nas tabelas seguintes (Tabelas 1 e 2) são apresentados os momentos de amostragem considerados e a quantidade de produto necessário para a determinação dos diversos parâmetros analíticos a efetuar (3 réplicas para cada parâmetro analítico).

Tabela 1 - Cálculo da quantidade necessária de Barriga fumada

Barriga					
Análises		Nº amostras	Peso Barriga (kg)	Perdas durante a produção	Quantidade necessária
t=0	0 dias	3	± 0.2 kg cada pedaço	± 35 %	$3 \times 0.2 = 4.8 \text{ kg}$ $4.8 \times 0.35 = 1.68 \text{ kg}$ $4.8 + 1.68 = 6.48 \text{ kg}$
t=1	30 dias	3			
t=2	60 dias	3			
t=3	90 dias	3			
t=4	105 dias	3			
t=5	120 dias	3			
t=6	135 dias	3			
t=7	150 dias	3			

Tabela 2 - Cálculo da quantidade necessária de Chouriça Carne

Chouriça Carne					
Análises	Nº amostras	Peso Chouriça (kg)	Perdas durante a produção	Quantidade necessária	
t=0	0 dias	± 0.2 kg cada Chouriça	± 35 %	$3 \times 9 \times 0.2 = 5.4 \text{ kg}$ $5.4 \times 0.35 = 1.89 \text{ kg}$ $5.4 + 1.89 = 7.29 \text{ kg}$	
t=1	30 dias				3
t=2	60 dias				3
t=3	90 dias				3
t=4	120 dias				3
t=5	135 dias				3
t=6	150 dias				3
t=7	165 dias				3
t=8	180 dias				3

A partir destas tabelas chegou-se à conclusão de que a quantidade necessária do produto Barriga durante o estudo é de 12,96 kg e a quantidade necessária de Chouriça de Carne é de 14,58 kg. Nestes montantes já estão incluídas as perdas de produção que normalmente ocorrem durante o processo de produção, bem como os produtos teste e produtos controlo.

A seguir encontram-se duas tabelas (Tabelas 3 e 4) com a duração dos testes, em meses, desde o início da produção, até ao fim do tempo de vida útil que se pretende atingir.

Tabela 3 - Cronograma desde o início da produção da Barriga

Barriga	Meses						
	1	2	3	4	5	6	7
Produção	x						
Cura	x	x					
Tempo de vida útil			x	x	x		
Prolongar vida útil						x	x

Tabela 4 - Cronograma desde o início da produção da Chouriça Carne

Chouriça Carne	Meses						
	1	2	3	4	5	6	7
Produção	x						
Cura	x						
Tempo de vida útil		x	x	x	x		
Prolongar vida útil						x	x

Como se pode observar pelas tabelas apresentadas, no total, a duração deste estudo seria de 7 meses.

3.3. Definição da quantidade de substrato a ser usada

Para o cálculo da quantidade de substrato a ser usada, tivemos por base os estudos de Balzan et al (2017): “Effect of phenols extracted from a by-product of the oil mill on the shelf-life of raw and cooked fresh pork sausages in the absence of chemical additives”, em que foi usada a concentração de **0.75g** de **composto ativo**/kg de produto.

Neste artigo, foram adicionadas 0,75g de composto ativo e o extrato tem uma concentração de compostos ativos de 65%, sendo assim,

$$Quantidade_{a\ adicionar\ aos\ 0.75} = 0.75 \times 0.35 = 0.2625g$$

$$Quantidade_{total\ a\ adicionar} = 0.75 + 0.26 \approx 1g/kg\ de\ produto$$

Como são necessários 7,29kg de produto, então a quantidade de extrato necessária será a seguinte:

$$Quantidade_{total\ de\ extrato\ necessária} = 1g \times 7.29 = 7.29g$$

Esta quantidade é relativa à Chouriça de Carne, em que o extrato seco será adicionado juntamente com os ingredientes na 2ª mistura da etapa da produção.

Para a Barriga, e também para os estudos preliminares da chouriça de carne se o extrato for aplicada na tripa antes da embalagem a vácuo, como o extrato vai ser adicionado a uma solução que posteriormente irá ser pincelada, a sua

concentração é de 1/1, ou seja, no caso da Barriga, para pincelar as 6,48kg é necessária uma solução de cerca de 400mL, assim sendo, são necessárias 400g de substrato seco, para pincelar as 7,29 kg de Chouriça de Carne é necessária uma solução de cerca de 450 ml, sendo assim necessárias 450 g de substrato seco. Assim sendo, são necessárias 850 g de substrato seco para pincelar a Barriga e a Chouriça de Carne.

4) MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Recolha e preparação da casca de pinheiro

A casca do pinheiro (*Pinus pinaster* subsp. *atlantica*) foi recolhida de árvores na região do Minho. A secagem da casca foi efetuada a 40°C durante 72 horas até atingir um equilíbrio de humidade. Posteriormente, foi moída durante 20s (Termomix TM31, Vorwerk, Germany) e peneirada durante 1min para selecionar partículas entre 200 e 850 µm. A casca moída foi mantida em sacos lacrados, à temperatura de 20°C e protegidos da luz, para uso posterior.

4.2. Extração através de microondas

Foi utilizado um equipamento SK-12 com rotor de pressão média (ETHOS X, Milestone, Itália) e um programa de extração com potência de 1600 W, a 110 °C durante 30 min. Um total de 2,5 g de casca moída foi colocada em cada tubo de extração a que foram adicionados 50 mL de cada solvente água, água+etanol (50/50 v/v) e etanol 96%. Depois da extração, os conteúdos de 4 tubos do mesmo solvente (o equipamento possui 12 tubos) foram misturados obtendo-se 200 mL de amostra por solvente.

4.3. Rendimento de extração

O rendimento de extração, definido como a quantidade de extrato recuperado em massa comparada com a quantidade inicial de casca seca, é uma medida da eficiência do solvente para extrair componentes específicos do material original (Aspé e Fernández, 2011).

O rendimento foi calculado para cada um dos solventes testados, com o extrato seco a 103^o±2°C.

4.4. Teor de Fenólicos Totais

O conteúdo fenólico total da casca do pinheiro foi determinado colorimetricamente a 725 nm, usando o método descrito Singleton e Rossi (1965). Primeiramente, o reagente comercial Folin-Ciocalteu's foi diluído em água destilada (1/10). Em seguida foi medido 1 mL de cada extrato/padrão/branco (água destilada) e adicionado 1 mL de Folin-Ciocalteu, misturando-se bem e deixando repousar durante 3 minutos. A seguir foi adicionado 1 mL de solução aquosa Na₂CO₃ 7% e misturou-se. No fim aferiu-se a 10 mL com água destilada. O frasco foi mantido no escuro à temperatura ambiente, durante 90 minutos, tendo sido depois lida a absorvância a 725 nm (VWR® Spectrophotometers, UV-Vis Scanning UV-3100PC), usando como branco a água destilada.

4.5. Atividade antioxidante através do método DPPH

A atividade antioxidante foi determinada pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) usando o trolox como padrão. Inicialmente preparou-se uma solução de DPPH 60 µM e uma solução mãe de Trolox 800 µmol/L. Foram efetuadas 3 diluições diferentes com o extrato obtido. Em cada tubo de ensaio foram colocados 0,1 mL de cada diluição do extrato, juntamente com 3,9 mL de DPPH, tendo depois sido deixados à temperatura ambiente no escuro durante 30 minutos, antes de se medir a absorvância a 515 nm. Como controlo foi usada uma solução DPPH contendo metanol em vez de amostra. A partir da solução mãe de Trolox foi preparada a curva padrão com as seguintes concentrações: 0, 40, 80, 100, 200, 400 e 800 mg/L.

4.6. Atividade antioxidante através do método ABTS

A atividade antioxidante foi determinada pelo método ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) usando o trolox como padrão. Primeiramente foi preparada uma solução de ABTS. Foram feitas 3 diluições diferentes com o extrato que foi extraído. Nos tubos de ensaio eram colocados 30 µL de cada diluição do extrato, juntamente com 3 ml de ABTS, tendo depois sido deixados no escuro durante 6 minutos, antes de se medir a absorvância a 734 nm. Como controlo foi

usada uma solução ABTS contendo metanol em vez de amostra. A partir da solução mãe de Trolox foi preparada a curva padrão com as seguintes concentrações: 0, 40, 80, 100, 200, 400 e 800 mg/L.

4.7. Análise Estatística

Os resultados serão apresentados como média \pm desvio padrão (DP) das repetições. Para a análise estatística dos resultados obtidos foi utilizado o programa Statistica 7. Foi realizada a análise de variância (ANOVA), comparações múltiplas para testar as diferenças significativas entre as médias, e realizado o teste de Tukey para comparação de médias encontradas. Diferenças no nível de confiança 5% foram consideradas significativas.

5) RESULTADOS

5.1. Rendimento de extração

Na tabela seguinte, encontram-se expressos os valores médios e os respetivos desvios padrões do rendimento de extração usando a água, a água+etanol (50:50) e o etanol como solventes.

Tabela 5 – Resultado do rendimento de extração dos diferentes solventes nos dois ensaios de extração

	Solvente	Rendimento de extração (% m/m)
Extração 1	Água	2,02 ± 0,02a
	Água+etanol	4,84 ± 0,04b
	Etanol	8,53 ± 0,16c
Extração 2	Água	2,01 ± 0,04a
	Água+etanol	6,90 ± 0,08b
	Etanol	8,61 ± 0,02c

Através da análise da tabela, podemos perceber que o solvente utilizado afeta o rendimento de extração, sendo a água o solvente com menor rendimento de extração e o etanol o que apresenta o maior rendimento de extração, em qualquer dos ensaios. O menor rendimento foi obtido utilizando a água como solvente na Extração 2 (2,01 ± 0,04 %) e o maior rendimento foi obtido utilizando o etanol como solvente na Extração 2 (8,61 ± 0,02 %). Em ambos os ensaios, as diferenças entre os solventes no rendimento de extração foram significativas ($p < 0,05$).

Aspé e Fernández (2011), compararam os métodos de extração Soxhlet e microondas de casca de pinheiro (*Pinus radiata*) e usando como solvente acetona+água (7:3 v/v) obtiveram uma percentagem de rendimento de extração de 10,4 ± 0,3 % na extração por microondas e de 12 ± 0,4 % na extração por Soxhlet. Estes valores são ligeiramente superiores aos obtidos neste estudo, mesmo considerando o maior rendimento de extração de 8,61 ± 0,02 usando o etanol como solvente. Provavelmente a acetona será um solvente mais eficaz, mas o seu uso nunca foi equacionado neste estudo por questões de sustentabilidade ambiental por comparação com os solventes etanol e água.

Chupin et al. (2015) usando a extração assistida por microondas de casca de *Pinus pinaster*, utilizando como solvente água+etanol (80:20 v/v), e tendo testado diferentes granulometrias da casca de pinheiro obtiveram diferentes valores de rendimento de extração, correspondendo à menor granulometria (0,1 e 0,05mm), o melhor resultado ($13,16 \pm 0,000 \%$), concluindo assim que diferentes granulometrias de casca provocam diferentes resultados no rendimento de extração. No presente estudo a granulometria utilizada foi superior (0,2 e 0,85mm) e o maior rendimento obtido foi obtido pelo etanol.

Vieito et al. (2018) usaram a extração Soxhlet de casca de pinheiro-bravo, testando 3 solventes diferentes, água, água+etanol (50/50 v/v) e etanol e concluíram não haver diferenças significativas entre os solventes água+etanol (50/50 v/v) e etanol obtendo-se os melhores resultados ($17,55 \pm 0,16 \%$ e $17,08 \pm 0,23 \%$ respetivamente). Estes valores são superiores aos obtidos neste estudo, evidenciando que o rendimento de extração é superior na extração clássica por Soxhlet por comparação com o método de microondas.

5.2. Teor de Fenólicos Totais

Na tabela seguinte, encontram-se expressos os valores médios e os respetivos desvios padrões da determinação do teor de fenólicos totais realizados usando a água, a água+etanol e o etanol como solvente.

Tabela 6 - Resultados do teor de Fenólicos Totais dos diferentes solventes

	Solvente	(mg GAE/g amostra)
Extração 1	Água	$2,83 \pm 0,08a$
	Água+etanol	$55,22 \pm 0,08b$
	Etanol	$55,68 \pm 0,96b$
Extração 2	Água	$5,59 \pm 0,17a$
	Água+etanol	$36,95 \pm 1,06b$
	Etanol	$44,38 \pm 1,35c$

Através da análise da tabela anterior, podemos primeiramente verificar que existe uma grande diferença no teor de fenólicos totais se for usada a água como solvente, em relação aos solventes, água+etanol e etanol, sendo o solvente água aquele que

apresenta um menor teor de fenólicos totais. O menor valor de teor de fenólicos totais foi obtido usando a água como solvente na Extração 1, pelo contrário, o maior valor obtido foi usando o etanol como solvente, também na Extração 1. Em ambas as extrações o etanol, foi aquele que obteve maior teor de fenólicos totais.

Na Extração 1, não existem diferenças significativas entre os solventes água+etanol e etanol ($p < 0,05$). Por outro lado, na Extração 2, verificam-se diferenças significativas entre todos os solventes utilizados.

Chupin et al. (2015) obtiveram diferentes teores de fenólicos totais, usando uma solução de água+etanol (80:20 v/v), testando diferentes granulometrias de casca e obtiveram o valor de $39,52 \pm 0,495$ (mg GAE/g amostra) como melhor resultado, sendo este valor inferior ao obtido no presente estudo, uma vez que o melhor valor obtido foi de $55,68 \pm 0,96$ (mg GAE/g amostra) usando o etanol como solvente.

Barros et al. (2020) usaram dois métodos de extração, Soxhlet e a extração assistida por microondas, da casca de *Pinus pinaster*, usando uma solução de água+etanol (50:50 v/v) como solvente e obtiveram valores de 54.9 ± 2.6 (mg GAE/g amostra) para o método de Soxhlet e de 71.1 ± 3.4 (mg GAE/g amostra) para o microondas.

Vieito et al. (2018) também determinaram o teor de fenólicos totais, tendo concluindo que o solvente afetou o teor de fenólicos totais ($p < 0,05$), o solvente água/etanol extraiu o maior teor de substâncias fenólicas ($73,48 \pm 1,84$ mg GAE/g), seguido de etanol ($63,38 \pm 1,26$ mg GAE/g) e por fim a água ($50,09 \pm 4,70$ mg GAE/g), sendo estes valores superiores aos valores obtidos neste estudo.

5.3. Atividade antioxidante através do método DPPH

Na tabela seguinte, encontram-se os valores da atividade antioxidante respectivo desvio padrão, obtidos pelo método DPPH, usando o trolox como padrão. Os resultados foram expressos em EC_{50} .

Tabela 7 - Resultados da atividade antioxidante dos diferentes solventes através do método DPPH

	Solvente	EC₅₀ (mg/ml)
Extração 1	Água	0,61 ± 0,13a
	Água+etanol	0,12 ± 0,02b
	Etanol	0,07 ± 0,00b
Extração 2	Água	0,45 ± 0,10a
	Água+etanol	0,08 ± 0,01b
	Etanol	0,06 ± 0,01b

O teste de DPPH avalia a bioatividade dos substratos, calculando-se para isso o valor de EC₅₀, que significa a quantidade necessária para diminuir ou reduzir a concentração inicial do radical DPPH· em 50 %, assim sendo, quanto menor o valor de EC₅₀, maior é a capacidade antioxidante do substrato e vice-versa.

Através dos valores de EC₅₀ obtidos, verifica-se que a água é pior solvente uma vez que os valores de EC₅₀ são os mais elevados, seguindo-se do solvente água+etanol e por fim o etanol, em ambas as extrações. O maior valor de EC₅₀ foi de 0,61 ± 0,13 mg/ml, obtido usando a água como solvente, e o menor valor de EC₅₀ foi de 0,06 ± 0,01 mg/ml, obtido usando o etanol como solvente.

Através da análise estatística, podemos verificar que existem diferenças significativas entre a água e os outros dois solventes (p<0,05), não existindo, no entanto, diferenças significativas entre os solventes água+etanol e etanol (p>0,05).

Aspé e Fernández (2011), testaram a capacidade antioxidante de extratos da casca de *Pinus radiata* através do método DPPH, usando as extrações por Soxhlet e por microondas, tendo sido usado como solvente, uma solução de acetona+água (7:3 v/v). A atividade antioxidante foi obtida através do cálculo do valor de EC₅₀ e os resultados foram também comparados com o Pycnogenol, o extrato comercial de casca de pinheiro (*Pinus pinaster*). Os resultados obtidos foram 15,4 ± 0,07 µg/mL, para a extração por Soxhlet, 11,6 ± 0,13 µg/mL na extração por Microondas e 24,6 ± 0,42 µg/mL, no Pycnogenol. Estes resultados, são melhores que os obtidos no presente estudo, (o EC₅₀ mais baixo obtido foi de 0,06 ± 0,01 mg/ml). Contudo, estes resultados não são comparáveis pois podem ser devido a diferentes

condições de extração, como o facto de o solvente ser diferente, e a variedade de pinheiro também, como já foi referido anteriormente.

Ferreira-Santos et al. (2020), também testaram a capacidade antioxidante através do método DPPH, tendo obtido um valor de EC₅₀ de 49,74 ± 0,1 µg/mL, usando como solvente a mistura água+etanol (50:50 v/v). Estes valores de EC₅₀ são também ligeiramente inferiores aos obtidos neste estudo, mas os métodos de extração usados também eram diferentes.

5.4. Atividade antioxidante através do método ABTS

Na tabela seguinte, encontram-se os valores da atividade antioxidante obtidos pelo método ABTS, usando o trolox como padrão. Os resultados foram expressos em µmol EC₅₀.

Tabela 8 - Resultados da atividade antioxidante dos diferentes solventes através do método ABTS

	Solvente	EC₅₀ (mg/ml)
Extração 1	Água	0,49 ± 0,00a
	Água+etanol	0,13 ± 0,01b
	Etanol	0,08 ± 0,01c
Extração 2	Água	0,43 ± 0,03a
	Água+etanol	0,07 ± 0,01b
	Etanol	0,06 ± 0,01b

Através da análise da tabela podemos constatar, tal como ocorreu no método DPPH, que o solvente água apresenta uma menor atividade antioxidante, comparando com os outros dois solventes. O melhor solvente foi o Etanol, onde se obtiveram os valores mais baixos de EC₅₀, seguindo-se a água+etanol.

Através da análise estatística, foi possível perceber que existem diferenças significativas na Extração 1 nos três solventes. Na Extração 2, existem diferenças significativas entre a água e os outros dois solventes, a água+etanol e o etanol, mas não entre estes dois últimos.

Ferreira-Santos et al. (2020), testaram a atividade antioxidante de extratos da casca de *Pinus pinaster* usando diferentes proporções de água e etanol. Para o teste

ABTS, foi calculando o valor de EC_{50} , tendo sido o melhor valor obtido, usando uma percentagem de água+etanol (50:50 v/v), com um valor de EC_{50} de $59,41 \pm 2,1$ $\mu\text{g/mL}$. Este valor é semelhante ao obtido neste estudo usando água+etanol como solvente, uma vez que o melhor valor obtido foi de $0,07 \pm 0,01$ mg/mL , na segunda extração.

6) CONCLUSÃO

No decorrer deste trabalho, foi possível verificar que o tipo de solvente usado influenciou o rendimento de extração, o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante dos extratos.

No rendimento de extração, verificou-se que existem diferenças significativas nos três diferentes solventes usados, em ambas as extrações. Aqui, o maior rendimento foi obtido usando o etanol na extração 2 ($8,61 \pm 0,02$ % na casca) e o menor rendimento foi obtido usando a água na extração 2 ($2,01 \pm 0,04$ % na casca).

Nos restantes parâmetros analisados, de uma forma geral, o solvente hidroetanólico e o etanólico não apresentam diferenças significativas, tendo por isso um rendimento semelhante, no entanto, o solvente água é aquele que apresenta diferenças significativas comparando com os outros dois solventes em todos os parâmetros analisados em ambas as extrações, apresentando realmente valores bastante mais inferiores quando comparado com os solventes hidroetanólicos e etanólicos.

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre as performances dos extratos etanólicos e hidroetanólicos relativamente aos parâmetros analisados, foi decidido utilizar o solvente hidroetanólico, porque o objetivo era aplicar um extrato eficaz, mas o mais natural (“verde”) e menos dispendioso possível.

Futuramente os extratos hidroetanólicos serão aplicados nos produtos curados selecionados, barriga fumada e chouriça de carne, nas etapas dos processos de fabrico consideradas mais adequadas, e avaliado o efeito da sua adição na conservação dos produtos ao longo de respetivamente, 150 e 180 dias de armazenamento.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aspé, E., & Fernández, K. (2011). The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 838–844. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.02.002>

Balzan, S., Taticchi, A., Cardazzo, B., Urbani, S., Servili, M., Di Lecce, G., ... Fasolato, L. (2017). Effect of phenols extracted from a by-product of the oil mill on the shelf-life of raw and cooked fresh pork sausages in the absence of chemical additives. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.001>

Baptista, C. M. C. (2006). *Influência das condições de cozimento sobre a estrutura da lenhina e a branqueabilidade da pasta kraft de Pinus pinaster*. Tese de doutoramento, Universidade da Beira Interior. Retrieved from: <http://hdl.handle.net/10400.6/1146>

Barreira, J. C. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Artificial Antioxidants. In Varelis, P., Melton, L., & Shahidi, F., *Encyclopedia of Food Chemistry*, (pp. 283-290). Amsterdão, Países Baixos: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21600-4>

Barros, D., Vieito, C., Santos, J., Ramos, C., & Velho, M. V. (2020). Inhibitory Effects of *Pinus Pinaster Aiton* Subsp. *Atlantica* Bark Extracts Against Known Food Pathogens. *Chemical Engineering Transactions*, 79, 163-168. <https://doi.org/10.3303/CET2079028>

Bedekar, A., Shah, K., & Koffas, M. (2010). Natural Products for Type II Diabetes Treatment. In Laskin, A. I., Sariaslani, S., & Gadd, G. M., *Advances in Applied Microbiology (Volume 71)*, (pp. 21-73). Londres, Reino Unido: Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)71002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)71002-9)

Brás, I. P. L. (2005). *Utilização de casca de pinheiro como adsorvente para remoção de pentaclorofenol de águas contaminadas*. Dissertação de doutoramento, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Retrieved from: <https://hdl.handle.net/10216/11519>

Carvalho, L. M. C. P. Q. (2010). *Identificação e caracterização de isolados de Staphylococcus: sua utilização como culturas de arranque em enchidos fermentados secos e fumados*. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa. Retrieved from: <http://hdl.handle.net/10400.5/2867>

Centro Pinus (1999). *Manual boas práticas florestais para o Pinheiro bravo*. Porto: Associação para a valorização da floresta de pinho. Retrieved from: <https://centropinus.org/files/2018/04/manual01.pdf>

Chen, B., & Xu, M. (2019). Natural Antioxidants in Food. In Varelis, P., Melton, L. e Shahidi, F. *Encyclopedia of Food Chemistry*, (pp. 180-188). Amsterdão, Países Baixos: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21599-0>

Chupin, L., Maunu, S. L., Reynaud, S., Pizzi, A., Charrier, B., & Bouhtourya, F. C. (2015). Microwave assisted extraction of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark: Impact of particle size and characterization. *Industrial Crops and Products*, 65, 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.052>

Coelho, A. L. R. (2013). *Otimização da extração sólido-líquido de antioxidantes de subprodutos florestais pelo método de superfície de resposta*. Dissertação de mestrado, Instituto Superior de Engenharia do Porto. Retrieved from: <http://hdl.handle.net/10400.22/6020>

Cordova, F. M., Marks, M. B. F., & Watson, R. R. (2013). Anti-Inflammatory Actions of Pycnogenol: Diabetes and Arthritis. In Watson, R. R., & Preedy, V. R. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes*, (pp. 495-501). Londres, Reino Unido: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397153-1.00077-9>

Correia, A. T. P. (2012). *Nutracêuticos para aplicação cosmética*. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa. Retrieved from: <http://hdl.handle.net/10284/3760>

Dias, C. I. B. (2018). *Avaliação microbiológica e físico-química de três tipos de enchidos com e sem a adição de aditivos alimentares*. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa. Retrieved from: <http://hdl.handle.net/10400.5/15361>

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654-660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>

Ferreira, R. M. A., Fernandes, P. L. O., Fontes, L. O., Rodrigues, A. P. M. S., & Silva, L. T. (2010). Antioxidantes e sua importância na alimentação. *Revista Verde*, 5(5), 26-30. Retrieved from: <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/420/412>

Ferreira-Santos, P., Genisheva, Z., Botelho, C., Santos, J., Ramos, C., Teixeira, J. A., & Rocha, M. R. (2020). Unravelling the Biological Potential of Pinus pinaster Bark Extracts. *Antioxidants*, 9(4), 334. <https://doi.org/10.3390/antiox9040334>

Figueiredo, A. C., Pedro, L. G., Barroso, J. G., Trindade, H., Sanches, J., Oliveira, C. e Correia, M. (2014). *Pinus pinaster* Aiton e *Pinus pinea* L. *Agrotec*, 14-18. Retrieved from: http://cbv.fc.ul.pt/Agrotec_12_14_Pinus.pdf

García-García, R., & Searle, S. S. (2016). Preservatives: Food Use. In Caballero, B., Finglas, P., M., & Toldrá, F., *Encyclopedia of Food and Health*, (pp. 505-509). Londres, Reino Unido: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00568-7>

Gharavi, N., Haggarty, S., & El-Kadi, A. O. S. (2007). Chemoprotective and Carcinogenic Effects of tert-Butylhydroquinone and Its Metabolites. *Current Drug Metabolism*, 8(1), 1-7. <https://doi.org/10.2174/138920007779315035>

Hamid, A. A., Aiyelaagbe, O. O., Usman, L. A., Ameen, O. M., & Lawal, A. (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(8), 142-151. Retrieved from: https://academicjournals.org/article/article1379499307_Hamid%20et%20al.pdf

Kapalka, G. M. (2010). ADHD. In Kapalka, G. M. *Nutritional and Herbal Therapies for Children and Adolescents*, (pp. 101-140). Londres, Reino Unido: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374927-7.00005-4>

Khan, M. K., Paniwnyk, L., & Hassan, S. (2019). Polyphenols as Natural Antioxidants: Sources, Extraction and Applications in Food, Cosmetics and Drugs. In Li. Y., & Chemat, F., *Plant Based "Green Chemistry 2.0"*, (pp. 197-236). Singapura: Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3810-6_8

Kimura, Y., & Sumiyoshi, M. (2010). French Maritime Pine Bark (*Pinus maritima* Lam.) Extract (Flavangenol®) Prevents Chronic UVB Radiation-induced Skin Damage and Carcinogenesis in Melanin-possessing Hairless Mice. *Photochemistry and Photobiology*, 86(4), 955–963. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00751.x>

Majidi, Z., Ansari, M., Maghbooli, Z., Ghasemi, A., Ebrahimi, S. S. S., Hosseini-nezhad, A., & Emamgholipour, S. (2021). Oligopin® Supplementation Mitigates Oxidative Stress in Postmenopausal Women with Osteopenia: A Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Trial. *Phytomedicine*, 81, 153417. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153417>

Mamta, Misra, K., Dhillon, G. S., Brar, S. K., & Verma, M. (2014). Antioxidants. In Brar, S. K., Dhillon, G. S., & Soccol, C. R. *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*, (pp. 117-138). Nova Iorque, Estados Unidos América: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8005-1_6

Mármol, I., Vieito, C., Andreu, V., Levert, A., Amiot, A., Bertrand, C., Rodríguez-Yoldi, M. J., Joana Santos, J. & Vaz-Velho, M. (2021). Influence of extraction solvent on the biological properties of maritime pine bark (*Pinus pinaster*). *International Journal of Food Studies*.

Mirra, I. M. P. (2011). *Influência das diferentes granulometrias na composição química das cascas de Eucalyptus globulus Labill., Betula pendula Roth, Picea abies (L.) Karst., Pinus sylvestris L. e Pinus pinea L.* Dissertação de mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. Retrieved from: <http://hdl.handle.net/10400.5/4187>

Morais, A. L. F. (2011). *Propriedades antioxidantes de bebidas e “chás” preparados a partir de diferentes formulações.* Dissertação de mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto. Retrieved from: <https://hdl.handle.net/10216/57237>

Ohkita, M., Kiso, Y., & Matsumura, Y. (2011). Pharmacology in Health Foods: Improvement of Vascular Endothelial Function by French Maritime Pine Bark Extract (Flavangenol). *Journal of Pharmacological Sciences*, 115(4), 461–465. <https://doi.org/10.1254/jphs.10r37fm>

Oliff, H. & Blumenthal, M. (2019). Scientific and clinical monograph for Pycnogenol®, 2019 update. *The American Botanical Council*. 782. Retrieved from: https://www.pycnogenol.com/fileadmin/pdf/ABC_Pycnogenol_Monograph_2019.pdf

Rasouli, H., Farzaei, M. H., & Khodarahmi, R. (2017). Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*, 20, 1700-1741. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1354017>

Regulamento (CE) n.º 853/2004, de 29 de Abril. *Jornal Oficial da União Europeia*.

Remédios, M. C. (2010). *Lenhina e o seu contributo na área alimentar.* Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Retrieved from: <http://hdl.handle.net/10362/4971>

Rodrigues, M. M. L. (2017). *Papel dos antioxidantes na oxidação lipídica de maioneses.* Relatório de Estágio de mestrado, Escola Superior de Tecnologia de Tomar. Retrieved from: <http://hdl.handle.net/10400.26/21362>

Rohdewald, P. (2019). Pleiotropic Effects of French Maritime Pine Bark Extract to Promote Healthy Aging, *Rejuvenation Research*, 22(3), 210-217. <https://doi.org/10.1089/rej.2018.2095>

Rohdewald, P. J. (2005). Pycnogenol®, French Maritime Pine Bark Extract. In Coates, P. M., Blackman, M. R., Cragg, G. M., Levine, M., Moss, J., & White, J. D.

Encyclopedia of Dietary Supplements (1st Edition), (pp. 545-553). Flórida, Estados Unidos América: CRC Press. Retrieved from: <http://www.phytoactiva.it/wp-content/uploads/Ref.-160-Rohdewald-Encyclopedia-Pycnogenol-2.pdf>

Salehi, B., Martorell, M., Arbiser, J., Sureda, A., Martins, N., Maurya, P., ... Sharifirad, J. (2018). Antioxidants: Positive or Negative Actors? *Biomolecules*, 8(4), 124. <https://doi.org/10.3390/biom8040124>

Santos, S. M. (2011). *Extracção, purificação e determinação da actividade antioxidante de compostos fenólicos da espécie prunus avium*. Dissertação de mestrado, Universidade da Beira Interior. Retrieved from: <http://hdl.handle.net/10400.6/2485>

Schyvens, C. (2014). Food Additives: Antioxidants. In Motarjemi, Y. *Encyclopedia of Food Safety (Volume 2)*, (pp. 455-458). Londres, Reino Unido: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00227-4>

Segal, L., Penmana, M. G., & Piriou, Y. (2018) Evaluation of the systemic toxicity and mutagenicity of OLIGOPIN® procyanidolic oligomers (OPC) extracted from French Maritime Pine Bark extract. *Toxicology Reports*, 5 (2018), 531–541. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.03.013>

Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects: A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>

Shi, J., Liu, F., Zhang, W., Liu, X., Lin, B. & Tang, X. (2015). Epigallocatechin-3-gallate inhibits nicotine-induced migration and invasion by the suppression of angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells. *Oncology Reports*, 33, 2972-2980. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3889>

Sicaire, A.-G., Fine, F., Quinsac, A., Boukroufa, M., Rakotomanomana, N., & Chemat, F. (2019). Innovative Techniques and Alternative Solvents for Green Extraction of Proteins from Pulses and Oleaginous Meals as Industrial Sources for Food and Feed. In Li. Y., & Chemat, F., *Plant Based “Green Chemistry 2.0”*, (pp. 237-256). Singapura: Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3810-6_9

Tanase, C., Coşarcă, S., & Muntean, D. (2019). A Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity. *Molecules*, 24, 1182. <https://doi.org/10.3390/molecules24061182>

Tomé-Carneiro, J., González, M., Larrosa, M., Yáñez-Gascón, M. J., García-Almagro, F. J., Ruiz-Ros, J. A., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F. A. & Espín J. C. (2012). One-Year Consumption of a Grape Nutraceutical Containing

Resveratrol Improves the Inflammatory and Fibrinolytic Status of Patients in Primary Prevention of Cardiovascular Disease. *The American Journal of Cardiology*, 110(3), 356-363. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2012.03.030>

Vieito, C., Fernandes, É., Vaz Velho, M., & Pires, P. (2018). The effect of different solvents on extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of extracts from pine bark (*Pinus pinaster* subsp. *atlantica*). *Chemical Engineering Transactions*, 64, 127-132. <https://doi.org/10.3303/CET1864022>

Vieito, C., Pires, P., & Vaz Velho, M. (2019). *Pinus pinaster* bark composition and applications: A review. In P. D. Gaspar & P. D. d. Silva (Eds.), *Novel Technologies and Systems for Food Preservation* (Chapter 8, pp 174-189). Pensilvânia, Estados Unidos América: IGI Global. <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-7894-9.ch008>

Zhao, C.-N., Zhang, J.-J., Li, Y., Meng, X., & Li, H.-B. (2018). Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Melastoma sanguineum* Fruit: Optimization and Identification. *Molecules*, 23(10), 2498. <https://doi.org/10.3390/molecules23102498>