

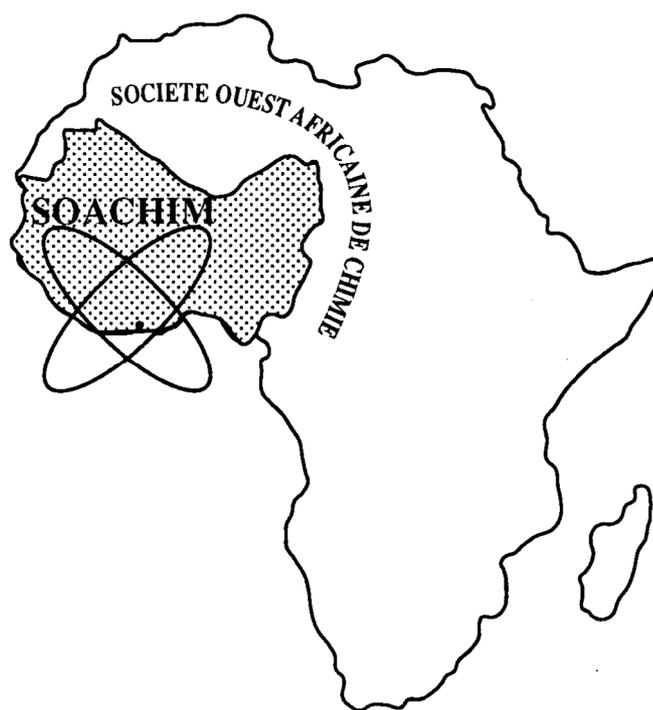
*Détermination des paramètres influençant le rendement
d'extraction hydro-alcoolique des métabolites
secondaires de *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae) et
Tridax procumbens linn (Asteraceae)*

Kouwelton Patrick Franck Olivier Koné, Yaya Soro et Sorho Siaka

Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie

J. Soc. Ouest-Afr. Chim.(2017), 044 : 15 - 22

22^{ème} Année, Décembre 2017



ISSN 0796-6687

Code Chemical Abstracts : JSOCF2

Cote INIST (CNRS France) : <27680>

Site Web: <http://www.soachim.org>

Détermination des paramètres influençant le rendement d'extraction hydro-alcoolique des métabolites secondaires de *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae) et *Tridax procumbens* linn (Asteraceae)

Kouwelton Patrick Franck Olivier Koné, Yaya Soro* et Sorho Siaka

Laboratoire des Procédés Industriels de Synthèse, de l'Environnement et des Energies Nouvelles (LAPISEN), Institut National Polytechnique Félix HOUPHOUËT-BOIGNY, BP 1093 Yamoussoukro, Côte d'Ivoire

(Reçu le 21/11/2017 – Accepté après corrections le 22/12/ 2017)

Résumé : Une étude des facteurs influençant le rendement d'extraction a été menée sur les feuilles de *Alchornea cordifolia* et sur la plante entière de *Tridax procumbens*. Le plan de criblage a été réalisé suivant la méthode de Plackett et Burmann pour analyser six facteurs qui sont : la durée de séchage, la granulométrie du broyat, le pourcentage en éthanol du solvant hydro-éthanolique, le ratio volume de solvant par masse de broyat, le temps de macération et la vitesse d'agitation. La méthodologie utilisée a consisté en une série d'extraction des métabolites secondaires en variant simultanément les facteurs retenus et en réalisant une analyse statistique des rendements obtenus. Une optimisation a été faite en utilisant la méthode des simplex. Les résultats ont montré que le ratio volume de solvant par masse de broyat et le pourcentage en éthanol du solvant hydro-éthanolique sont les deux facteurs significatifs pour *Alchornea cordifolia* alors que le ratio volume de solvant par masse de broyat, le pourcentage en éthanol du solvant hydro-éthanolique, la granulométrie du broyat et la durée de macération sont les quatre facteurs significatifs pour *Tridax procumbens*.

Mots clés : *Alchornea cordifolia*, *Tridax procumbens*, plan de criblage, métabolites secondaires, rendement, optimisation.

Determination of the parameters influencing the hydroalcoholic extraction yield of the secondary metabolites of *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae) and *Tridax procumbens* linn (Asteraceae)

Abstract: A study of the extraction yield influencing factors was conducted on the leaves of *Alchornea cordifolia* and on the whole plant of *Tridax procumbens*. The screening plan carried out according to the Plackett and Burmann method aimed at analyzing the six following factors: the drying time, grinded matter particle size, ethanol percentage in hydroethanolic solvent, solvent volume per grinded matter mass ratio, maceration time and stirring speed. The methodology used consisted of a series of secondary metabolites extraction by varying the selected factors and simultaneously performing a statistical yields analysis. An optimization was done using the simplex method. The results showed that the solvent volume per grinded matter mass ratio and the ethanol percentage in the hydroethanolic solvent are the two significant factors for *Alchornea cordifolia* extraction yield, whereas the solvent volume per grinded matter mass ratio, the percentage of ethanol in the hydro-ethanolic solvent, the grain size of the crushed stone and the maceration time are the four significant factors for *Tridax procumbens* extraction yield.

Key words: *Alchornea cordifolia*, *Tridax procumbens*, screening plan, secondary metabolites, yield, optimization.

* Auteur correspondant : Soro Yaya ; soro_y@yahoo.fr

1. Introduction

Alchornea cordifolia et *Tridax procumbens* sont deux plantes médicinales largement utilisées dans la pharmacopée ivoirienne pour la prise en charge du diabète et de l'hypertension artérielle [1]. *Tridax procumbens* est connue pour ses activités antivirales, antibiotiques, cicatrisantes, insecticides, antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses [2,3]. Le screening phytochimique de *Tridax procumbens* linn a indiqué la présence d'alcaloïdes, de caroténoïdes, de flavonoïdes (catéchine et flavones), de tannins, de l'acide fumarique, du sitostérol fluoré, de saponines et de glycosides [4,5]. Ses feuilles contiennent 26% de protéines, 17% de fibres, 39% de carbohydrates solubles et 5% d'oxyde de calcium [6] et la plante entière est riche en ions comme le sodium, le potassium et le calcium [7].

Alchornea cordifolia est largement utilisée comme antidiysentérique, anti-inflammatoire, antalgique, antimicrobien, antiparasitaire, veinotonique, antioxydant et astringent [8], dans le traitement du paludisme [9] ou encore dans la phytothérapie de la maladie hémorroïdaire [10-13]. Le screening phytochimique de *Alchornea cordifolia* révèle la présence de la quercétine et du gallate d'éthyle dans les feuilles [14], du l'indole, de stérols et des glycosides terpéniques dans les racines, des acides alchornoïques, l'alchorneïne et l'alchonidine dans les graines [15].

Les deux plantes renferment de nombreux métabolites secondaires responsables de leurs propriétés médicinales [16,17]. Il est donc important de maximiser l'extraction de ceux-ci en vue d'une meilleure exploitation de ces ressources comme des sources potentielles de nouveaux médicaments naturels, d'antibiotiques, d'insecticides et d'herbicides.

La présente étude vise à déterminer les facteurs qui influencent les rendements et les conditions optimales de l'extraction des métabolites secondaires de *Alchornea cordifolia* et *Tridax procumbens*.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Les feuilles de *Alchornea cordifolia* et la plante entière de *Tridax procumbens* ont été récoltées tôt le matin avant le lever du soleil en juin 2016 à Yamoussoukro (6°53'04.7'' Nord et 5°13'54.9'' Ouest) au centre de la Côte d'Ivoire, en saison pluvieuse. Les plantes ont été identifiées par M. Amani N'Guessan, botaniste à l'Institut National Polytechnique Félix HOUPHOUËT-BOIGNY de Yamoussoukro.

2.2. Choix des facteurs influençant le rendement d'extraction

Nous avons choisi six facteurs influençant le rendement d'extraction des métabolites secondaires qui sont la durée de séchage du matériel végétal, la granulométrie du broyat, le pourcentage d'alcool dans le solvant, le ratio volume de solvant sur masse de broyat, la durée de macération et la vitesse d'agitation [18-20]. Notons que le solvant hydro-éthanolique est largement utilisé pour l'extraction des métabolites secondaires des plantes [18-20] et il est proche de l'eau généralement utilisée en médecine traditionnelle.

2.3. Domaines de valeurs

Les domaines de valeurs des facteurs ont été fixés en fonction du matériel disponible au laboratoire. Au niveau de la granulométrie et de la vitesse d'agitation, le choix a été fait par rapport aux tamis et aux agitateurs magnétiques disponibles dans notre laboratoire. Quant aux autres facteurs, le choix a été fait en tenant compte des conditions de macération trouvées dans la littérature [21,22]. Le **tableau I** résume le choix des valeurs des facteurs énumérés.

Tableau I: Valeurs des facteurs recensés

Codage	Facteurs	Valeur (-1)	Valeur (+1)
X1	Durée de séchage	2 semaines	4 semaines
X2	Granulométrie	≤ 0,4 mm	≤ 2 mm
X3	Pourcentage d'alcool	50%	90%
X4	Ratio volume sur masse de broyat	5 mL/g	10 mL/g
X5	Durée de macération	12h	24h
X6	Vitesse d'agitation	500 rpm	1600 rpm

2.4. Matrice de Plackett-Burman

Pour l'établissement de la matrice de Plackett-Burman [23,24], un facteur fictif (x7) a été ajouté pour que le nombre de facteurs k (fictifs et réels) soit du type (k + 1), multiple de 4 et corresponde au nombre d'expériences. Le **tableau II** présente la matrice des expériences.

Tableau II: Matrice des expériences

Tests	x1 (semaines)	x2 (mm)	x3 (%)	x4 (g/mL)	x5 (h)	x6 (rpm)
1	4	0,4	50	10	12	1600
2	4	2	50	5	24	500
3	4	2	90	5	12	1600
4	2	2	90	10	12	500
5	4	0,4	90	10	24	500
6	2	2	50	10	24	1600
7	2	0,4	90	5	24	1600
8	2	0,4	50	5	12	500

2.5. Procédure générale de réalisation des tests

Les feuilles de *Alchornea cordifolia* et la plante entière de *Tridax procumbens* ont été séchées pendant une durée x1 au laboratoire à l'abri de la lumière à une température de 28 ± 2 °C. Elles ont ensuite été broyées à l'aide d'un broyeur électrique de marque IKA M20 (France) et tamisés pour donner une poudre de granulométrie x2. Les poudres obtenues ont été conservées au réfrigérateur dans des bocaux colorés à 4 °C pour les futurs tests. Une masse de 10 g du broyat a été introduite dans un volume x3 d'un solvant hydro-éthanolique de composition x4 et macérée pendant une durée x5 avec une vitesse de rotation x6. Après filtration sur du coton puis sur du papier wattman, l'extrait obtenu est concentré à l'évaporateur rotatif à 40 °C. Le résidu obtenu est pesé afin de calculer le

rendement d'extraction. Les tests 1 à 8 ont été réalisés trois fois dans les conditions du **tableau 2**.

2.6. Optimisation du modèle

L'optimisation du modèle obtenu après le traitement des résultats est réalisée par la suite Excel du logiciel Microsoft Office avec le complément solveur qui permet de faire une optimisation par la méthode des Simplex [25,26]. Cette méthode est utilisée pour les modèles linéaires et permet de trouver une solution optimum.

3. Résultats et discussion

3.1. Rendements des extractions

Les rendements obtenus, après la réalisation des expériences pour les deux plantes, sont donnés dans les **figures 1 et 2**.

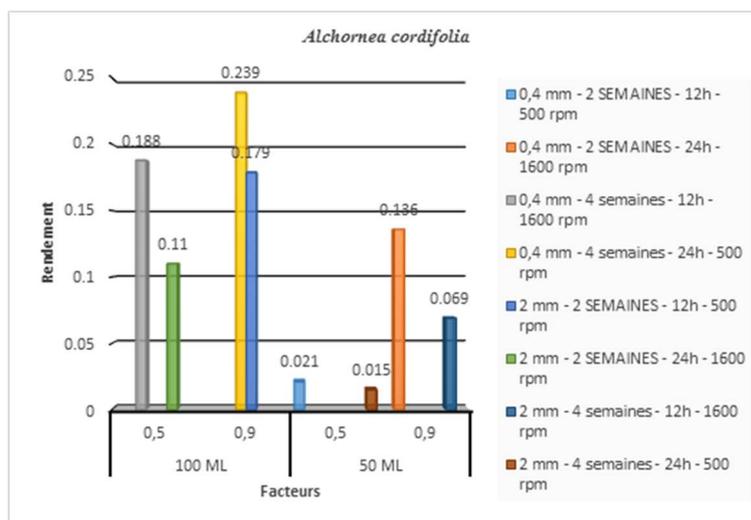


Figure 1: Rendements des extractions des métabolites secondaires de *Alchornea cordifolia*

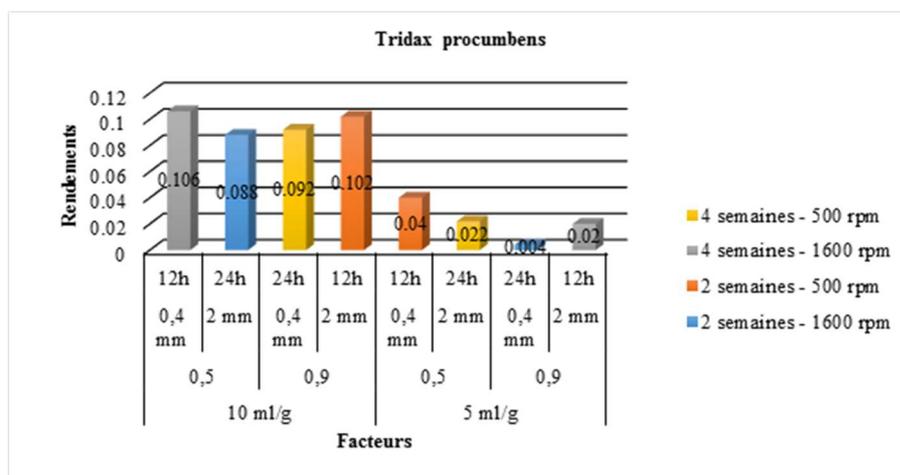


Figure 2: Rendements des extractions des métabolites secondaires de *Tridax procumbens*

Les rendements sont compris entre 0,004 et 0,24 %, les plus élevés (compris entre 0,02 et 0,24) ayant été obtenus avec les feuilles de *Alchornea cordifolia*. Quant à la plante entière de *Tridax procumbens*, les rendements sont compris entre 0,004 et 0,11. Les rendements sont plus élevés lorsque le ratio volume/masse du broyat est à sa borne (+1) quel que soit la plante. Les résultats obtenus confirment que les rendements d'extraction dépendent de plusieurs facteurs. Les résultats obtenus ont été traité en régression linéaire multiple à l'aide de la suite Excel de Microsoft Office avec le niveau de confiance fixé à 90%, $\alpha = 0,1$. Ainsi, le calcul de l'erreur expérimentale avec les valeurs non assignées et la détermination des facteurs significatifs sont consignés respectivement dans les **tableaux III et IV**. Il ressort des résultats du **tableau IV** qu'il y a deux (2) facteurs significatifs pour *Alchornea cordifolia*, à savoir le pourcentage d'éthanol dans le solvant (x3) et le ratio volume sur la masse de broyat (x4). Le modèle obtenu est donc de la forme :

$$Rdt = 0,036125 \times P + 0,059375 \times R + 0,119625 \quad (1)$$

avec Rdt le rendement en métabolites secondaires, P le pourcentage en éthanol dans le solvant eau-éthanol (entre 50 et 90%) et R le ratio volume de solvant sur la masse de broyat (entre 5 et 10 mL/g).

La **figure 3** illustre la dépendance du rendement à ces deux facteurs. En effet, le rendement est maximum pour un ratio de 10 mL/g et un pourcentage de 90%

en éthanol dans le solvant.

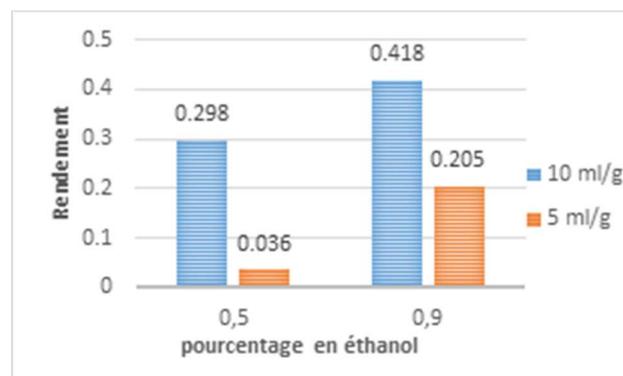


Figure 3: Influence des facteurs significatifs sur le rendement d'extraction

Les résultats du **tableau IV** montrent également qu'il y a quatre (4) facteurs significatifs pour *Tridax procumbens* à savoir la granulométrie du broyat (x2), le ratio volume sur la masse de broyat (x3), le pourcentage en éthanol dans le solvant (x4) et la durée de macération (x5). Le modèle obtenu est donc de la forme :

$$Rdt = -0,00475 \times G - 0,00775 \times P + 0,03775 \times R - 0,00475 \times Dm + 0,05925 \quad (2)$$

avec Rdt le rendement en métabolites secondaires, G la granulométrie du broyat (entre 0 et 4 mm), P le pourcentage en éthanol dans le solvant eau-éthanol (entre 50 et 90%), R le ratio volume de solvant sur la masse de broyat (entre 5 et 10 mL/g) et Dm la durée de macération (entre 12 et 24h).

Tableau III : Calcul des erreurs expérimentales

Plantes	Variables	Coefficients	Coeff*2	Facteur de Student	Erreur expérimentale
<i>Alchornea cordifolia</i>	Constante	0,119625	0,23925	3,07768	0,06078
	x7	0,009875	0,01975		
<i>Tridax procumbens</i>	Constante	0,05925	0,1185	3,07768	0,00462
	x7	0,00075	0,0015		

Tableau IV: Détermination des facteurs significatifs

Plantes	Variable	Coefficients	Effets	Effet*2	Pertinence
<i>Alchornea cordifolia</i>	Constante	0,119625	0,119625	0,23925	OUI
	x1	0,008125	0,008125	0,01625	NON
	x2	-0,026375	0,026375	0,05275	NON
	x3	0,036125	0,036125	0,07225	OUI
	x4	0,059375	0,059375	0,11875	OUI
	x5	0,005375	0,005375	0,01075	NON
	x6	0,006125	0,006125	0,01225	NON
<i>Tridax procumbens</i>	Constante	0,05925	0,05925	0,1185	OUI
	x1	-0,00125	0,00125	0,0025	NON
	x2	-0,00475	0,00475	0,0095	OUI
	x3	0,03775	0,03775	0,0755	OUI
	x4	-0,00775	0,00775	0,0155	OUI
	x5	-0,00475	0,00475	0,0095	OUI
	x6	-0,00075	0,00075	0,0015	NON

La **figure 4** montre que le ratio est plus influant que les autres facteurs significatifs car tous les rendements les plus élevés sont obtenus lorsqu'il est à son niveau (+1). Il y a une séparation visible en deux groupes du fait des deux bornes de ce facteur.

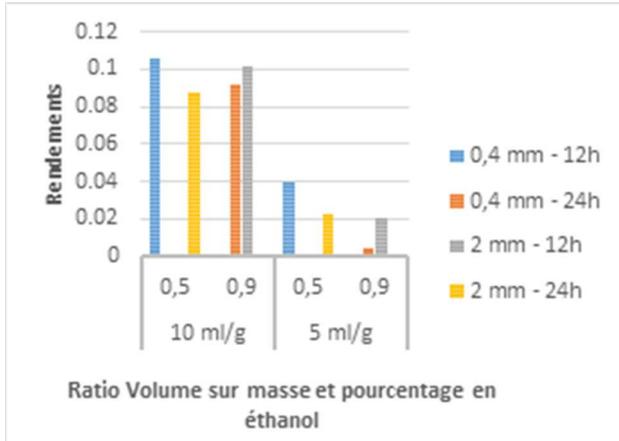


Figure 4: Influence des facteurs significatifs sur le rendement d'extraction

3.2. Optimisation des modèles

Les conditions optimales pour le modèle réalisé avec *Alchornea cordifolia* sont les suivantes : une durée de séchage de 28 jours, une granulométrie du broyat inférieure à 0,4 mm, un pourcentage d'éthanol dans le solvant de 90%, un ratio volume sur masse de 10 mL/g, une durée de macération de 24 heures et une vitesse d'agitation de 1600 rpm.

Pour le modèle réalisé avec *Tridax procumbens*, les conditions optimales sont les suivantes : une durée de séchage de 14 jours, une granulométrie du broyat inférieure à 0,4 mm, un pourcentage d'éthanol dans le solvant de 50%, un ratio volume sur masse de 10

mL/g, une durée de macération de 12 heures et une vitesse d'agitation de 500 rpm.

La granulométrie du broyat inférieure à 0,4 mm et le ratio volume sur masse de 10 mL/g sont les deux conditions identiques pour les modèles et pourraient être maintenues pour l'extraction des métabolites secondaires des plantes.

3.3. Vérification et comparaison

Des comparaisons entre les données obtenues avec les modèles et les données expérimentales ont été effectuées en calculant les coefficients de détermination linéaire [27,28,29]. Les différents résultats obtenus sont présentés dans les **figures 5 et 6** pour *Alchornea cordifolia* avec un coefficient de corrélation de 0,9915 entre les données expérimentales et calculées et dans les **figures 7 et 8** pour *Tridax procumbens* avec un coefficient de corrélation de 0,9933.

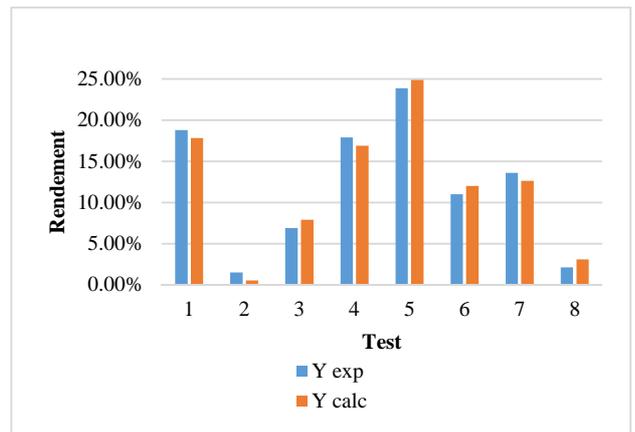


Figure 5: Résultats de l'approximation des rendements expérimentaux par le modèle de *Alchornea cordifolia*

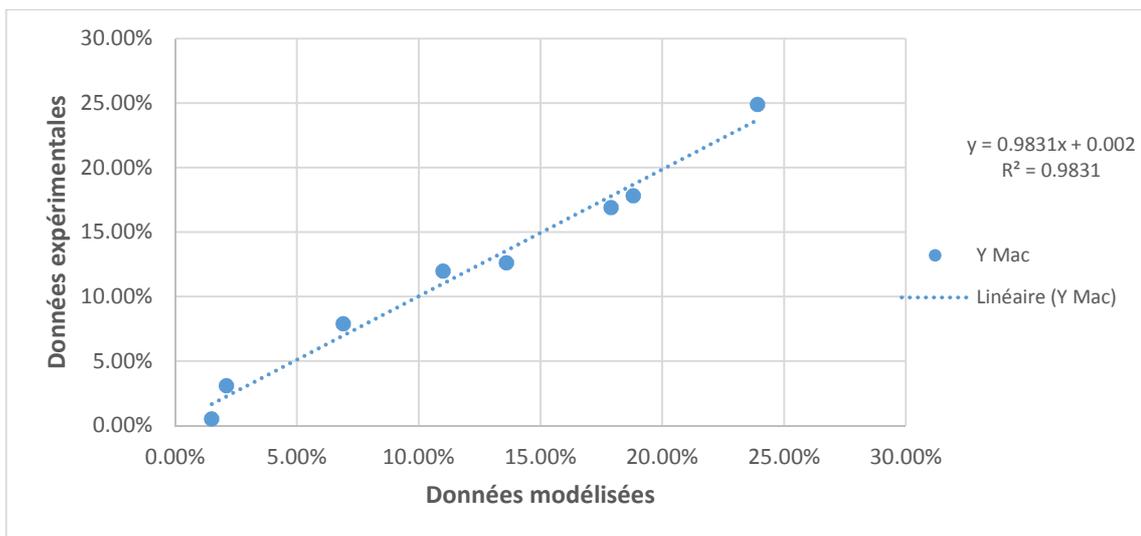


Figure 6: corrélation entre le modèle et l'expérimentation sur *Alchornea cordifolia*

Les **figures 6 et 8** montrent une bonne corrélation entre les modèles obtenus et les données expérimentales, ce qui permet de valider nos modèles.

La comparaison entre les modèles développés sur *Alchornea cordifolia* et sur *Tridax procumbens* a été menée en testant le modèle d'une plante sur les données de l'autre. Les résultats obtenus sont présentés dans les **figures 9 et 10**.

3.4. Modélisation des données d'une plante avec le modèle de l'autre

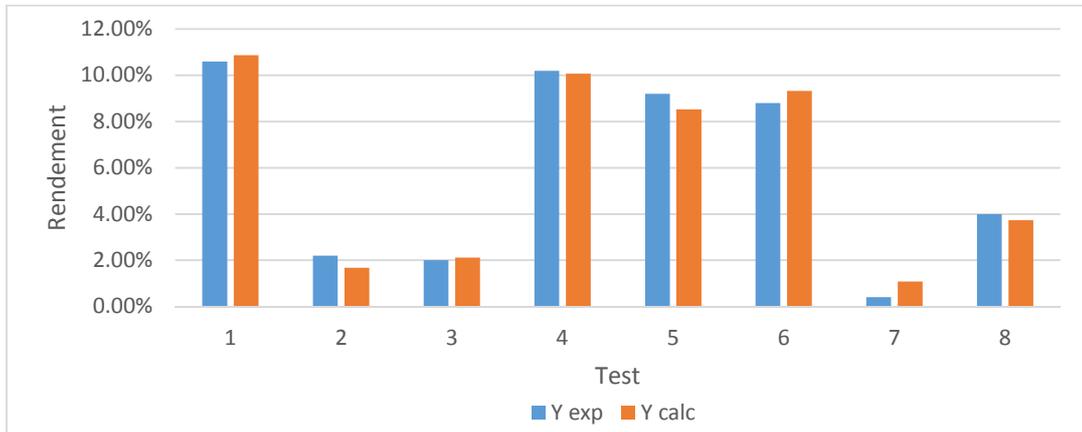


Figure 6: Résultats de l'approximation des rendements expérimentaux par le modèle de *Tridax procumbens*

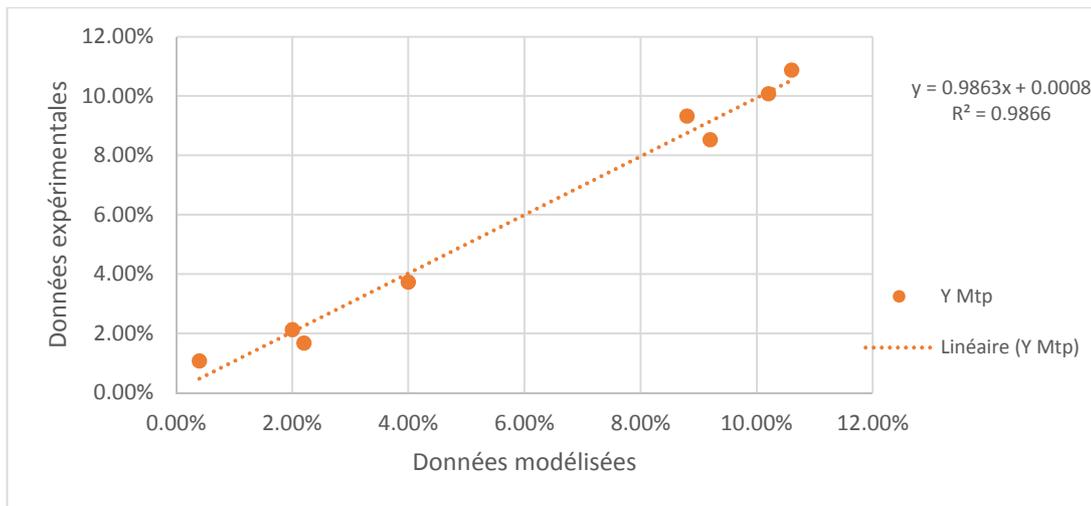


Figure 8: Corrélation entre le modèle et l'expérimentation sur *Tridax procumbens*

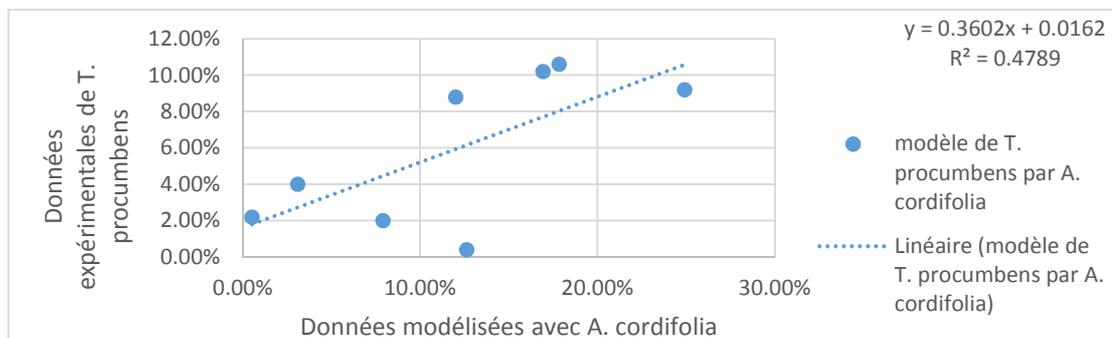


Figure 9: Modélisation des données de *Tridax procumbens* avec le modèle de *A. cordifolia*

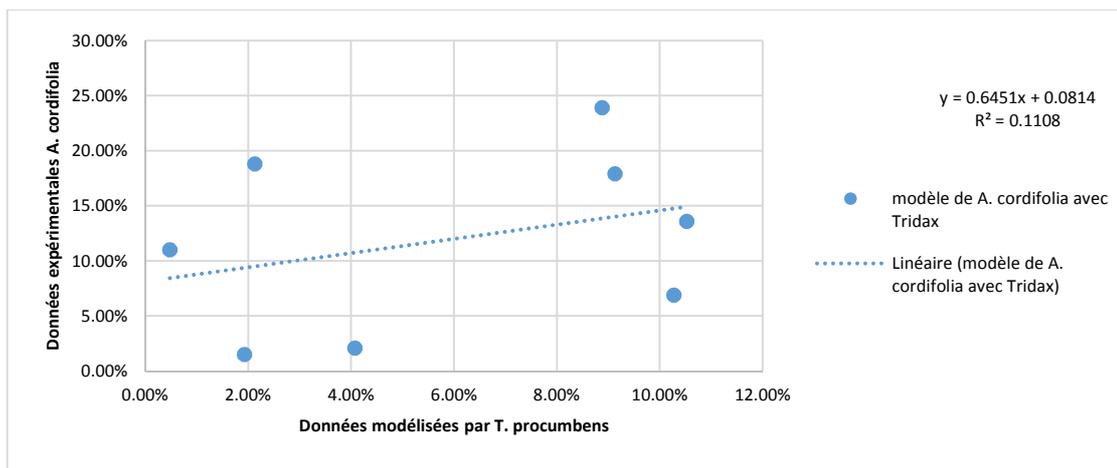


Figure 10: Modélisation des données de *Alchornea cordifolia* avec le modèle de *Tridax procumbens*

Il ressort de cette étude que le modèle de *Alchornea cordifolia* modélise mieux les données de *Tridax procumbens* que celle de cette dernière pour la première. En effet, comme le montre les figures 9 et 10, le coefficient de corrélation de *Alchornea cordifolia* (0,6920) est plus grand que celui de *Tridax procumbens* (0,3329). Cela montre que le type de plante influe sur le rendement d'extraction. Cependant, le coefficient du modèle de *Alchornea cordifolia* pourrait rassurer sur une potentielle relation permettant de faire passer le modèle d'une plante à une autre.

4. Conclusion

Un plan de criblage suivant la méthode de Plackett et Burmann a été réalisé pour déterminer les facteurs influençant le rendement d'extraction des métabolites secondaires dans les feuilles de *Alchornea cordifolia* et sur la plante entière de *Tridax procumbens*. Des six (6) facteurs sélectionnés, deux (2) se sont avérés significatifs pour *Alchornea cordifolia* et quatre (4) pour *Tridax procumbens*. Les modèles obtenus ont été optimisés et des conditions expérimentales optimales ont été établies. Chaque modèle est proche de l'expérimentation avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,99. Il serait intéressant de confirmer leur précision avec des données expérimentales autres que celles de nos expériences. La présente étude pourrait être une contribution intéressante dans l'amélioration des rendements d'extraction des métabolites secondaires en médecine traditionnelle.

5. Remerciements

Les auteurs remercient Dr Akmel Djédjro clément et Dr Nogbou Arsène tous les deux membres du LAPISEN pour avoir apporté des corrections au texte initial.

6. Bibliographie

- [1] Tra Bi F., Irié G., N'Gaman K., Mohou C. Études de quelques plantes thérapeutiques utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle et du diabète : deux maladies émergentes en Côte d'Ivoire. *Sci. Nat.* (2008) 5, 39-48.
- [2] Suseela L., Sarsvathy A., Brindha P. Pharmacognostic studies on *Tridax procumbens* L. (Asteraceae). *Journal of Phytochemical Research* (2002) 15 (2), 141-147.
- [3] Manjamalai A., Kumar M.J., Grace V.M. Essential Oil of *Tridax procumbens* L. Induces Apoptosis and Suppresses Angiogenesis and Lung Metastasis of the B16F-10 Cell. Line in C57BL/6 Mice. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* (2012) 13(11), 5887-5895.
- [4] Ali M., Rawinder E., Ramachandram R. A new flavonoid from the aerial parts of *Tridax procumbens* L. *Fitoterapia* (2001) 72(3), 313-315.
- [5] Yadawa R.N., Saurabh K. A new flavone glycoside: 5,7,4-Trihydroxy- 6,3-dimethoxy Flavone 5-O alpha-L-rhamnopyranoside from the leaves of *Tridax procumbens* Linn. *J. Asian Nat. Prod. Res.* (1998) 1(2), 147-152.
- [6] Verma R.K., Gupta M.M. Lipid constituents of *Tridax procumbens*. *Phytochemistry* (1988) 27(2), 459-463.
- [7] Mohammed A., Earla R., Ramidi R. A new flavonoids from the aerial parts of *Tridax procumbens* Linn. *Fitoterapia* (2001) 72, 313-315.
- [8] Dibong S.D., Mpondo Mpondo E., Ngoye A., Kwin N.F. Plantes médicinales utilisées par les populations bassa de la région de Douala au Cameroun. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* (2011) 5 (3), 1105-1117.
- [9] Mustofa A.V., Françoise B., Yves P., Koné-Bamba D., Mallié M. Antiplasmodial activity of plant extract used in west african traditional medicine. *J. of Etno. Pharm.* (2000) 73, 145-151.
- [10] Ilumbe B.G., Van Damme P., Lukoki L.F., Joiris V., Visser M., Lejoly J. Contribution à l'étude des plantes médicinales dans le traitement des hémorroïdes par les pygmées Twa et leur voisin Oto de Bikoro, en RDC. *Congo Sci.* (2014) 2 (1), 46-54.
- [11] Dibong S.D., Ottou P.B.M., Vandi D., Ndjib R.C., Mpondo Mpondo E. Ethnobotanique des plantes médicinales anti hémorroïdaires des marchés et villages du Centre et du Littoral Cameroun. *J. Appl. Biosci.* (2015) 96, 9072-9093.
- [12] Ngene J.P., Ngoule C.C., Kidik P.C., Ottou P.M., Dibong S.D., Mpondo Mpondo E. Importance dans la pharmacopée traditionnelle des plantes à flavonoïdes vendues dans les marchés de Douala est (Cameroun). *J. Appl. Biosci.* (2015) 88 (1), 8194-8210.
- [13] Nga E. N., Yinyang J., Baran à Bidias E., Etame-Loe G., Dibong S.D. Étude phytochimique et pharmacologique d'*Alchornea cordifolia* (Schum. & Thonn.) Mull. Arg. et de *Mangifera indica* dans le traitement traditionnel de la maladie hémorroïdaire. *J. Appl. Biosci.* (2017) 109, 10649-10661.
- [14] Pruja S. Contribution à l'étude phytochimique de *Alchornea cordifolia*. 1987, INP de Toulouse.
- [15] Ajali U. Antibacterial activity of *Alchornea cordifolia* stem bark. *Fitoterapia* (2000), 436-438.
- [16] Adeshina G.O., Onaolapo J.A., Ehinmidu J.O., Odama L.E., Kunle O.F., Phytochemical and Antibacterial Studies of the Hexane Extract of *Alchornea cordifolia* Leaf, *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global*

Approaches to Their Role in Nutrition and Health, Dr Venkateshwer Rao (Ed.), InTech Open Access Publisher 2012.

[17] Bhagwat D., Killedar S., Adnaik R. Anti-diabetic activity of leaf extract of *Tridax procumbens*. *Int. J. Green Pharm.* (2008) 2, 126-128.

[18] Chemat F., Strube J., Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice. John Wiley & Sons 2015.

[19] Raaman, N., Phytochemical Techniques. New India Publishing 2006.

[20] Walton N.J., Brown D.E., Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products. World Scientific 1999.

[21] Čujić N., Šavikin K., Janković T., Pljevljakušić D., Zdunić G., Ibrić S. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem.* (2016) 194, 135–142.

[22] Huie C.W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal. Bioanal. Chem.* (2002) 373, 23–30.

[23] Plackett R.L., Burman J.P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika* (1946) 33, 305–325.

[24] Wallis J.S., Hadamard Matrices, in: Combinatorics: Room Squares, Sum-Free Sets, Hadamard Matrices, Lecture Notes in Mathematics. Springer Berlin Heidelberg 1972, pp 274–489.

[25] Han W., Dang C.V., Kim J.-W., Kim Y.-J., Jung S.-Y., Global-Simplex Optimization Algorithm Applied to FEM based Optimal Design of Electric Machine. *IEEE Trans. Magn.* (2017) 1–1.

[26] Ribeiro-Santos R., Sanches-Silva A., Motta J.F.G., Andrade M., De Araújo Neves L., Teófilo R.F., De Carvalho M.G., De Melo N.R. Combined use of essential oils applied to protein base active food packaging: Study in vitro and in a food simulant. *Eur. Polym. J.* (2017) 93, 75–86.

[27] Cohen J., Cohen P., West S.G., Aiken L.S., Applied Multiple Regression/Correlation Analysis for the Behavioral Sciences. 2013, 3rd Edition Routledge.

[28] Faul F., Erdfelder E., Buchner A., Lang A.-G. Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behav. Res. Methods* (2009) 41, 1149–1160.

[29] Lin L.I.-K. Validation Using the Concordance Correlation Coefficient. *Biometrics* (1992) 48, 599–604.