



Extracção e Encapsulamento de Compostos Bioactivos do Bagaço de Azeitona

Cláudia Sofia Caeiro Duarte

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Professora Doutora Maria Luísa Beirão da Costa

Co-Orientador: Doutora Catarina Martins Duarte

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Luísa Duarte Martins Beirão da Costa, Professora Catedrática Aposentada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;
Doutora Maria Gabriela Bernardo Gil, Professora Associada Aposentada do Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa;
Doutora Catarina Maria Martins Duarte, Investigadora Auxiliar do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica.

Lisboa, 2011

AGRADECIMENTOS

É com grande apreço que expresso os meus sinceros agradecimentos a todos a que, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização deste trabalho, em particular:

- À Professora Doutora Eng.^a Maria Luísa Beirão da Costa, minha orientadora, pelo constante apoio e esclarecimentos prestados durante a execução deste trabalho. A sua orientação e rigor científico foram essenciais para a concretização deste trabalho;
- À Doutora Catarina Duarte, minha co-orientadora, pelo incentivo, apoio, disponibilidade e entusiasmo que sempre demonstrou desde o início deste projecto. Os seus esclarecimentos foram imprescindíveis para a execução deste trabalho.
- À Professora Doutora Eng.^a Gabriela Bernardo Gil, por ter disponibilizado a instalação supercrítica para a realização dos ensaios de extracção. Esteve sempre disponível para qualquer dúvida que surgiu aquando das visitas ao Instituto Superior Técnico. Os vários ensaios de extracção por CO₂ supercrítico foram realizados sob sua supervisão e orientação;
- À toda a equipe do ITQB/IBET pela ajuda e apoio dados na execução de análises realizadas nesse centro, em especial à Doutora Eng.^a Ana Matias pela paciência, boa disposição e interesse pessoal pelo tema; bem como às suas colaboradoras, Ana Nunes e Rita Ramos pela realização de análises importantes como método de ORAC e HORAC
- À Eng.^a Paula Vasconcelos, bem como a todos os elementos da sua equipe, do Laboratório de Estudos Técnicos do I.S.A, pela disponibilidade e apoio prestado durante a realização das análises por cromatografia gasosa. Um agradecimento especial à Eng.^a Helena, Ofélia e Andreia;
- A todo o pessoal técnico da Secção de Ciências e Tecnologia dos Alimentos, nomeadamente à Marília, D^a Graziela e D^a Júlia pela importante ajuda, apoio, amizade e esclarecimentos transmitidos durante a realização da parte prática deste trabalho;
- À Doutora Eng.^a Sara Beirão da Costa, que gentilmente me proporcionou tempo necessário para finalizar este trabalho durante o decorrer do meu estágio profissional sob sua supervisão.
- Um agradecimento especial a todos que me acompanharam durante o tempo passado em laboratório, pelo que brotou uma enorme amizade, companheirismo e não só... que não se perca com o passar do tempo. De tantos para enunciar não poderia deixar de mencionar a Doutora Carla Tecelão, Doutor Vítor Alves, Eng.^a Mara Pereira e Eng.^a Joaquina Pinheiro.
- À Rosário Pinto, secretária do D.A.I.A.T., pelo permanente apoio, boa disposição, amizade, incentivo e paciência que me transmitiu e demonstrou durante a execução do trabalho prático;
- Finalmente, aos meus pais pelo constante apoio e paciência nos momentos mais críticos.

Os subprodutos da indústria alimentar podem ser uma importante fonte natural de compostos bioactivos e o bagaço de azeitona é um exemplo disso. Pretendeu-se, com o presente trabalho, estudar a viabilidade da extracção por CO₂ supercrítico, na obtenção de compostos bioactivos do bagaço de azeitona. Procurou-se também preservar o potencial antioxidante pelo encapsulamento dos extractos em matriz de uso alimentar.

Foram conduzidos ensaios de extracção por CO₂ supercrítico mantendo constantes as condições de pressão (250 bar) e temperatura (40 °C), tendo-se conduzido ou não um pré-tratamento e diferentes níveis de hidratação. Nestes ensaios obtiveram-se rendimentos de extracção entre 8 e 12% (m/m). Todos os extractos supercríticos foram quantificados em termos de composição em ácidos gordos, esteróis e polifenóis totais. Sendo conhecido que o potencial antioxidante do bagaço de azeitona está fortemente relacionado com os teores de tirosol e hidroxitirosol, procedeu-se também à sua quantificação. A actividade antioxidante foi determinada recorrendo aos testes ORAC e HORAC.

Paralelamente, procedeu-se à extracção dos compostos bioactivos do bagaço por solventes orgânicos tendo-se obtido rendimentos de extracção de 13% (m/m).

Os extractos obtidos que revelaram melhores características, nomeadamente de bioactividade, foram encapsulados em matriz de inulina por atomização, e avaliados em termos de actividade antioxidante.

Palavras-chave: Bagaço de azeitona, CO₂ supercrítico, Compostos bioactivos, Actividade antioxidante, Encapsulamento, Atomização.

Extraction and Microencapsulation of Bioactive Compounds from Olive Oil Processing solid Wastes

ABSTRACT

The food industry by-products such as olive oil processing solid waste are an important source of natural bioactive compounds. The aim of the present work was to extract bioactive compounds from olive pomace using supercritical carbon dioxide extraction and to investigate the viability of their encapsulation in a food-stuff carrier as a way of protection from antioxidant properties losses.

Several supercritical extractions were performed at a 250 bar and a 40 °C with and without pre-treatments and levels of moisture content were also tested. Yields between 8 and 12% (w/w) were achieved and fatty acid content, sterols and total polyphenolic compounds were evaluated in all supercritical extracts. Since there are a strong correlation between antioxidant activity and polyphenolic compounds, the two most representative phenols, hydroxytyrosol and tyrosol, were identified and quantified. Antioxidant activity was also investigated using ORAC and HORAC methods.

Extraction of bioactive compounds from olive pomace in soxhlet apparatus were also carried out for control and yields of 13% (w/w) were achieved.

Encapsulation of the most bioactive extract achieved was performed by spray-drying using inulin as the wall material and antioxidant activity was evaluated.

Key-Words: Olive oil solid waste, Supercritical CO₂, Bioactive compounds, antioxidant activity, Encapsulation, Spray-drying.

Extraction and Microencapsulation of Bioactive Compounds from Olive Oil Processing solid Wastes

EXTENDED ABSTRACT

The interest in functional foods increased dramatically in the past years as a result of the growing awareness of the health benefits and consumer demand for high quality food products enriched in natural bioactive compounds, such as carotenoids, tocopherols and phenolic compounds. These compounds had drawn attentions in several areas of research due to their results in epidemiologic studies, suggesting a protective effect against a few types of cancer and cardiovascular diseases. Natural products are preferred over synthetic ones but strict regulations relating nutritional and toxicity levels are still needed. Food processing by-products, including olive oil extraction pomace may be a good source of bioactive compounds, namely tyrosol and hydroxytyrosol.

In this scope, the aim of the present work is to obtain added-value compounds from olive oil solid by-product using supercritical carbon dioxide extraction and to investigate the viability of their encapsulation as a way of protection from antioxidant properties.

Supercritical carbon dioxide extractions (CO₂ SFE) were carried out at a pressure, temperature and flow rate of 250 bar, 40 °C and 1,7x10⁻⁴ m/s, respectively. The effect of a pre-treatment (pressurized fluid in the loaded extractor for one hour) was tested and compared with the control extraction. In both cases, yields of 12% (m/m) were achieved after 210 minutes of extraction. The same yield obtained after 8 hours with chemical extraction. Different levels of moisture content (10, 15, 20 and 40%) were also evaluated using the pre-treatment extraction condition. In these cases yields between 8 and 12% (m/m) were obtained. In all supercritical extracts fatty acid content, sterols and total polyphenolic compounds were evaluated. The sterol fraction was determined by gas-chromatography (GC) and didn't show any change in composition or quantities along the several extractions performed, but the recovery of the fatty acids, also determined by GC, was compromised when the olive oil solid waste was rehydrated to a 40% of moisture content. Total phenol content was evaluated colourimetrically at 765 nm using Folin-Ciocalteu reagent. Total phenolic content was also determined on the olive oil solid waste after being submitted to a CO₂ SFE because of their hydrophilic nature. Results revealed that the total phenol content decreased with the increasing moisture content of the solid by-product suggesting that part of these compounds had passed to the supercritical extract. Thus, contents of total phenols were respectively 950; 702; 423 and 380 mg EAG/ 100g olive oil solid waste for olive oil solid waste moisture content of 10, 15, 20 and 40%. The supercritical extraction pre-treatment exerted a positive effect on the recovery of the phenolic compounds when compared to the control extraction or even to the original vegetable matrix reaching 1 040 mg EAG/100 g olive oil solid waste.

The two most representative phenols, hydroxytyrosol and tyrosol, were identified and quantified by HPLC-DAD-ED. Both were observed in all supercritical extracts. Antioxidant activity was investigated using ORAC and HORAC methods and revealed high antioxidant activity for almost of the extracts.

Encapsulation of the supercritical extract with the highest bioactivity was performed by spray-drying using inulin as the wall material. The same procedure was carried out for a chemically extracted control in order to evaluate the antioxidant activity of both kind of encapsulated products. Losses of bioactivity and polyphenolic compounds were observed in encapsulated products but supercritical extracts shown to be more stable to a possible thermal degradation during encapsulation process than extracts recovered by conventional extraction. Yet, encapsulation of bioactive compounds were successfully produced, ensuring the protection of polyphenolic compounds and preserving some of the bioactivity.

CO₂ SFE was confirmed to be an efficient solvent for recovering added-value compounds with relatively high antioxidant activity from olive oil solid waste. Such by-product revealed to be a complex and rich source of different bioactive compounds, particularly in hydroxytyrosol, and can be used as an alternative to synthetic antioxidants in order to increase food stability against lipid peroxidation, and protect living systems from oxidative damage by scavenging oxygen radicals.

The incorporation of such encapsulated extracts in food industry may contribute to a better industrial handling without compromising losses on their bioactivity therefore promoting health benefit and also to prolong shelf life of the food products.

Key-Words: Olive oil solid waste, Supercritical CO₂, Bioactive compounds, antioxidant activity, Encapsulation, Spray-drying.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
EXTENDED ABSTRACT	iv
ÍNDICE GERAL.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE QUADROS.....	xvii
I - INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS	1
II – ENQUADRAMENTO TEÓRICO	3
1. OLIVICULTURA E INDÚSTRIA DE EXTRACÇÃO DE AZEITE.....	4
1.1. Considerações Históricas.....	4
1.2. Caracterização da Arvore e Fruto	4
1.3. Caracterização do Sector Oleícola.....	5
1.3.1. A Nível Mundial.....	5
1.3.2. A Nível Nacional.....	6
1.4. Sistemas de Extracção de Azeite.....	6
1.4.1. Caracterização dos Sistemas de Extracção.....	7
1.4.2. Vantagens e Desvantagens dos Sistemas de Extracção.....	9
2. IMPACTO AMBIENTAL DOS RESÍDUOS E/OU SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE EXTRACÇÃO DE AZEITE.....	11
3. VALORIZAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE EXTRACÇÃO DE AZEITE.....	12
3.1. O Caso Particular do Bagaço de Azeitona	13
4. COMPOSTOS BIOACTIVOS.....	14

4.1.	Conceitos e Funções.....	14
4.2.	Actividade Antioxidante	14
4.3.	Compostos Bioactivos no Bagaço de Azeitona de maior Relevância	15
4.3.1.	Compostos Fenólicos.....	15
4.3.1.1.	Oleuropeína.....	16
4.3.1.2.	Hidroxitirosol.....	16
4.3.1.3.	Tirosol.....	18
4.3.2.	Fitosteróis	18
4.3.3.	Álcoois Terpénicos.....	20
5.	EXTRACÇÃO DE COMPOSTOS BIOACTIVOS.....	20
5.1.	Processos Emergentes	21
5.1.1.	Extracção Por Fluidos Supercríticos	21
5.1.1.1.	Conceitos e Fundamentos.....	21
5.1.1.2.	Factores que afectam a extracção por fluidos supercríticos.....	22
5.1.1.3.	Dióxido de carbono como fluido supercrítico.....	23
5.1.1.3.1.	Vantagens do CO ₂ Como Fluido Supercrítico	23
5.1.1.3.2.	Adição de co-solvente.....	24
5.2.	Extracção Supercrítica do Óleo De Bagaço De Azeitona.....	24
6.	MICROENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS BIOACTIVOS.....	25
6.1.	Definição e Conceitos	25
6.2.	Matrizes Encapsulantes	26
6.2.1.	Requisitos Gerais de uma Matriz Encapsulante.....	27
6.2.1.2.	A Inulina como Matriz Encapsulante	28
6.2.1.2.1.	Caracterização estrutural e fisico-química	28
6.2.1.2.2.	Propriedades nutricionais	29
6.2.1.2.3.	Capacidade de formação de cápsulas	30
6.3.	Processos de Encapsulamento.....	30

6.3.1.	Processo de Atomização	32
6.4.	Mecanismos de Libertação Controlada	33
III -	DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	35
1 -	Caracterização e Selecção do Bagaço de Azeitona	36
1.1.	Material e Métodos.....	36
1.1.1.	Material Vegetal	36
1.1.2.	Reagentes.....	36
1.2.	Métodos	36
1.2.1.	Determinação do Teor de Humidade	36
1.2.2.	Caracterização dos Extractos Lipídicos do Bagaço de Azeitona obtidos com Éter de Petróleo	36
1.2.2.1.	Quantificação dos Ácidos Gordos Totais.....	36
1.2.2.2.	Quantificação dos Fitosteróis	37
2 -	Extracção de Compostos Bioactivos do Bagaço de Azeitona por CO ₂ Supercrítico	38
2.1.	Materiais e Métodos	38
2.1.1.	Material Vegetal	38
2.1.2.	Reagentes.....	38
2.2.	Métodos.....	38
2.2.1.	Preparação do Material.....	38
2.2.1.1.	Liofilização do Material	38
2.2.1.2.	Redução da Dimensão do Material por Moenda	38
2.2.2.	Determinação da Granulometria	38
2.2.3.	Determinação do Teor de Humidade	39
2.2.4.	Extracção por CO ₂ Supercrítico	39
2.2.4.1.	1ª Fase (influência de um pré-tratamento)	39
2.2.4.2.	2ª Fase (influência o teor de humidade na composição dos extractos).....	39
2.2.4.3.	Descrição da Instalação e Obtenção dos Extractos	40

2.2.5.	Caracterização dos Extractos Supercríticos, Bagaço e Bagaços Residuais	40
2.2.5.1.	Determinação dos Polifenóis Totais	41
2.2.6.	Identificação e Quantificação do Perfil em Polifenóis: Hidroxitirosol e Tirosol	41
2.2.7.	Avaliação da Capacidade Antioxidante	41
2.2.7.1.	Método de ORAC	41
2.2.7.2.	Método de HORAC	41
3 –	Encapsulamento dos Compostos Bioactivos do Bagaço de Azeitona	43
3.1.	Materiais e Métodos	43
3.1.1.	Materiais	43
3.1.2.	Métodos	43
3.1.2.1.	Produção de emulsões com extractos do bagaço de azeitona em solução de inulina	43
3.1.2.2.	Atomização das emulsões.....	44
3.1.2.3.	Caracterização dos extractos encapsulados por atomização em matriz de inulina	44
IV –	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	45
1 -	Caracterização dos diferentes bagaços de azeitona	46
1.1.	Teor de Humidade.....	46
1.2.	Rendimento de Extração por Éter de Petróleo	46
1.3.	Caracterização da Fracção Lipídica obtida por Extração Convencional.....	47
1.3.1.	Quantificação dos Ácidos Gordos	47
1.3.2.	Quantificação dos Fitosteróis	48
2 -	Extração de Compostos Bioactivos do Bagaço de Azeitona por CO ₂ Supercrítico	50
2.1.	Preparação do Bagaço de Azeitona para a Extração por CO ₂ supercrítico.....	50
2.1.1.	Determinação da Granulometria	50
2.1.2.	Teor de Humidade	51
2.2.	Extração por CO ₂ Supercrítico (1ª Fase – Influência de um pré-tratamento)	51
2.2.1.	Eficiência de Extração	51

2.2.2. Caracterização da Fracção Lipídica.....	52
2.2.2.1. Quantificação dos Ácidos Gordos Totais.....	52
2.2.2.2. Quantificação dos Fitosteróis	54
2.3.Extracção por CO ₂ Supercrítico (2ª Fase – Influência do Teor de Humidade na composição dos extractos).....	56
2.3.1.Eficiência da Extracção	56
2.3.2. Caracterização da Fracção Lipídica.....	57
2.3.2.1. Quantificação dos Ácidos Gordos Totais.....	57
2.3.2.2. Quantificação dos Fitosteróis	58
2.4. Quantificação dos Polifenóis Totais	59
2.4.1. Extractos Aquosos	59
2.4.2. Extractos Supercríticos	60
2.5. Identificação e Quantificação dos Polifenóis: Hidroxitirosol e Tirosol.....	61
2.5.1. Identificação dos perfis hidroxitirosol e tirosol por HPLC-DAD.....	61
2.5.2. Identificação por HPLC-ED	63
2.5.3. Quantificação dos polifenóis Hidroxitirosol e Tirosol por HPLC-DAD-ED.....	65
2.6. Avaliação da Capacidade Antioxidante	67
2.6.1. Método de ORAC.....	67
2.6.2. Método de HORAC	69
3 – Encapsulamento dos Compostos Bioactivos do Bagaço de Azeitona	71
3.1. Quantificação dos Polifenóis Totais	71
3.2. Avaliação da capacidade Antioxidante	72
V - CONCLUSÕES.....	73
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
<hr/>	
ANEXOS	
<hr/>	
ANEXO 1 - EXTRACÇÃO CONVENCIONAL	II
ANEXO 2 - DETERMINAÇÃO DOS POLIFENÓIS TOTAIS.....	III

ANEXO 3 - ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE – MÉTODO DE ORAC.....	V
ANEXO 4 - ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE – MÉTODO DE HORAC	VI
ANEXO 5 – QUANTIFICAÇÃO DA FRACÇÃO LIPÍDICA POR EXTRACÇÃO CONVENCIONAL (ÉTER- DE-PETRÓLEO) DOS DIFERENTES BAGAÇOS	VII
ANEXO 6 - DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DAS AMOSTRAS DE BAGAÇO DE AZEITONA LIOFILIZADO APÓS MOENDA.....	VIII
ANEXO 7 – CONDIÇÕES DE EXTRACÇÃO POR CO ₂ SUPERCRÍTICO (A e B) ESTERÓIS	IX
ANEXO 8 – INFLUÊNCIA DO TEOR DE HUMIDADE NA EXTRACÇÃO SUPERCRÍTICA POR CO ₂ - ESTERÓIS.....	X
ANEXO 9 – CONDIÇÕES DE EXTRACÇÃO POR CO ₂ SUPERCRÍTICO – ÁCIDOS GORDOS.....	XI
ANEXO 10 – INFLUÊNCIA DO TEOR DE HUMIDADE NA EXTRACÇÃO POR CO ₂ SUPERCRÍTICO – ÁCIDOS GORDOS	XIII

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução dos sistemas de extracção de azeite (adaptado de Vlyssides <i>et al.</i> , 2004).	9
Figura 2 - Diagrama esquemático que exemplifica os principais subprodutos e respectivos destinos industriais da indústria do azeite (Federici <i>et al.</i> , 2009).	13
Figura 3 - Produção de hidroxitirosol através da hidrólise da oleuropeína por vias enzimática e ácida (de Leonardis <i>et al.</i> , 2008)	17
Figura 4 - Estruturas químicas dos fitosteróis mais representativos (adaptado de Plumb <i>et al.</i> , 2011). ..	19
Figura 5 - Estrutura química dos dois álcoois triterpénicos mais representativos do óleo de bagaço de azeitona (Ramirez <i>et al.</i> , 2006)	20
Figura 6 - Diagrama de fases de uma substância pura.....	21
Figura 7 - Representação esquemática do encapsulamento de substâncias (Fonte: Soottitantawat, 2005).....	26
Figura 8 - Estrutura química da inulina	28
Figura 9 - Etapas do micro encapsulamento de aromas por atomização. (Fonte: Soottintawat, 2005). ..	32
Figura 10 - Atomizador pneumático, modelo SD-05	44
Figura 11 - Rendimentos de extracção obtidos após 16 horas de extracção em soxhlet dos diferentes bagaços (g extracto/ 100 g bagaço azeitona reportada à base seca). Os valores representados são os valores médios com o desvio padrão associado.....	46
Figura 12 - Composição em ácidos gordos nos diversos extractos lipídicos resultantes dos respectivos bagaços após 16 horas de extracção com éter de petróleo. Legenda: C14:0 – mirístico; C16:0 – palmítico; C16:1 – palmitoleico; C17:0 – margárico; C17:1 – margaroleico; C18:0 – esteárico; C18:1 – oleico; C18:2 – linoleico; C18:3 – linolénico; C20:0 – araquídico; C20:1 – gadoleico; C22:0 – beénico;	

C24:0 – lignocérico ((A) g de ácidos gordos/ g extracto; (B) g ácidos gordos/ 100 g bagaço de azeitona (bs)).....	47
Figura 13 - Estudo comparativo da composição esterólica e dos álcoois terpénicos <i>eritrodiol</i> e <i>uvaol</i> nos diversos extractos lipídicos resultantes dos respectivos bagaços de azeitona após terem sido submetidos a 16 horas de extracção com éter de petróleo (mg esteróis/ 100 g bagaço de azeitona)...	48
Figura 14 - Distribuição de frequências do tamanho de partícula do bagaço de azeitona liofilizado	50
Figura 15 - Curvas cumulativas de extracção da fracção lipídica do bagaço de azeitona por CO ₂ supercrítico em função do tempo ao fim de 3,5 h. Condição (A) – sem pré-tratamento; Condição (B) – com pré-tratamento.....	51
Figura 16 - Composição em ácidos gordos do óleo de bagaço de azeitona da variedade arbosana extraído por CO ₂ supercrítico. Legenda: C14:0 – mirístico; C16:0 – palmítico; C16:1 – palmitoleico; C17:0 – margárico; C17:1 – margaroleico; C18:0 – esteárico; C18:1 – oleico; C18:2 – linoleico; C18:3 – linolénico; C20:0 – araquídico; C20:1 – gadoleico; C22:0 – beénico; C24:0 – lignocérico; EQ – extracção química.....	53
Figura 17 - Comparação entre os rendimentos de extracção obtidos via convencional e por CO ₂ supercrítico para a fracção esterólica e álcoois terpénicos (Eritrodiol e Uvaol) que constituem os extractos lipídicos do bagaço de azeitona após ter sido submetido a uma extracção por CO ₂ supercrítico.	55
Figura 18 - Rendimentos de extracção após 3,5 h de extracção por CO ₂ supercrítico para diferentes níveis de re-hidratação do bagaço de azeitona	56
Figura 19 - Composição em ácidos gordos do óleo de bagaço de azeitona da variedade arbosana extraído por CO ₂ supercrítico ao fim de 3,5 h. Legenda: C14:0 – mirístico; C16:0 – palmítico; C16:1 – palmitoleico; C17:0 – margárico; C17:1 – margaroleico; C18:0 – esteárico; C18:1 – oleico; C18:2 – linoleico; C18:3 – linolénico; C20:0 – araquídico; C20:1 – gadoleico; C22:0 – beénico; C24:0 – lignocérico; EQ – extracção química.....	57
Figura 20 - Comparação entre os rendimentos de extracção obtidos via convencional e por CO ₂ supercrítico para a fracção esterólica e álcoois terpénicos (Eritrodiol e Uvaol) que constituem os extractos lipídicos do bagaço de azeitona após ter sido submetido a uma extracção por CO ₂ supercrítico durante 3,5 h.	58

Figura 21 - Estudo comparativo dos polifenóis totais presentes nos extractos aquosos do bagaço de azeitona e nos extractos aquosos dos bagaços residuais após 3,5 h de extracção por CO ₂ supercrítico	59
Figura 22 - Estudo comparativo dos polifenóis totais presentes nos extractos supercríticos provenientes de 3,5 h de extracção por CO ₂ supercrítico aos bagaços de azeitona com teores de humidade de 10, 15, 20 e 40%.	60
Figura 23 - Comparação de perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD a 280 nm dos extractos aquosos: O1 e O2d – extractos aquosos de bagaço de azeitona liofilizado, A e Ad – extractos aquosos do bagaço residual após ter sido submetido a 3,5 h de extracção por CO ₂ supercrítico (condição A), B e Bd - extractos aquosos do bagaço residual após ter sido submetido a 3,5 h de extracção por CO ₂ supercrítico (condição B). Perfil cromatográfico da mistura tirosol e hidroxitirosol (40 ppm) a preto determinado por HPLC-DAD a 280 nm.	61
Figura 24 - Comparação de perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD a 280 nm dos extractos aquosos dos bagaços residuais após terem sido sujeitos a 3,5 h de extracção por CO ₂ supercrítico: 10% e 10%d – extractos aquosos de bagaço de azeitona residual, com 10% de teor de humidade inicial, 15% e 15%d - extractos aquosos de bagaço de azeitona residual, com 15% de teor de humidade inicial, 20% e 20%d - extractos aquosos de bagaço de azeitona residual, com 20% de teor de humidade inicial e 40% e 40%d - extractos aquosos de bagaço de azeitona residual, com 40% de teor de humidade inicial. Perfil cromatográfico da mistura tirosol e hidroxitirosol (40 ppm) a preto determinado por HPLC-DAD a 280 nm.	62
Figura 25 - Comparação de perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD a 280 nm dos extractos supercríticos obtidos ao fim de 3,5 h de extracção por CO ₂ supercrítico: 10%EM – extracto supercrítico de bagaço de azeitona com 10% de teor de humidade, 15%EM - extracto supercrítico de bagaço de azeitona com 15% de teor de humidade, 20%EM - extracto supercrítico de bagaço de azeitona com 20% de teor de humidade e 40%EM - extracto supercrítico de bagaço de azeitona com 40% de teor de humidade. Perfil cromatográfico da mistura tirosol e hidroxitirosol (40 ppm) a preto determinado por HPLC-DAD a 280 nm.	62
Figura 26 - Comparação de perfis cromatográficos determinados por HPLC-ED a 280 nm dos extractos aquosos: O1 e O2d – extractos aquosos de bagaço de azeitona liofilizado, A e Ad – extractos aquosos do bagaço de azeitona residual após ter sido submetido a 3,5 h de extracção por CO ₂ supercrítico (condição A), B e Bd - extractos aquosos do bagaço de azeitona residual após ter sido submetido a 3,5	

h de extracção por CO₂ supercrítico (condição B). Perfil cromatográfico da mistura tirosol e hidroxitirosol (40 ppm) a preto determinado por HPLC-ED a 280 nm..... 63

Figura 27 - Comparação de perfis cromatográficos determinados por HPLC-ED dos extractos aquosos dos bagaços residuais após terem sido sujeitos a 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico: 10% e 10%d – extractos aquosos de bagaço de azeitona residual, com 10% de teor de humidade inicial, 15% e 15%d - extractos aquosos de bagaço de azeitona residual, com 15% de teor de humidade inicial, 20% e 20%d - extractos aquosos de bagaço de azeitona residual, com 20% de teor de humidade inicial e 40% e 40%d - extractos aquosos de bagaço de azeitona residual, com 40% de teor de humidade inicial. Perfil cromatográfico da mistura tirosol e hidroxitirosol (40 ppm) a preto determinado por HPLC-ED. ... 64

Figura 28 - Comparação de perfis cromatográficos determinados por HPLC-ED dos extractos supercríticos obtidos ao fim de 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico: 10%EM – extracto supercrítico de bagaço de azeitona com 10% de teor de humidade, 15%EM - extracto supercrítico de bagaço de azeitona com 15% de teor de humidade, 20%EM - extracto supercrítico de bagaço de azeitona com 20% de teor de humidade e 40%EM - extracto supercrítico de bagaço de azeitona com 40% de teor de humidade. Perfil cromatográfico da mistura tirosol e hidroxitirosol (40 ppm) a preto determinado por HPLC-ED. 65

Figura 29 - Quantificação do hidroxitirosol e tirosol (ppm) existentes nos diferentes extractos aquosos: bagaço e bagaços residuais (resultantes das condições A e B e re-hidratados para 10, 15, 20 e 40%) depois de 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico e os extractos supercríticos provenientes dos bagaços re-hidratados. 65

Figura 30 - Quantificação do hidroxitirosol (ppm) existente nos diferentes extractos aquosos: bagaço, bagaços residuais sujeitos às condições A e B de extracção supercrítica e bagaços residuais inicialmente re-hidratados para 10, 15, 20 e 40% depois de 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico e os extractos supercríticos provenientes dos bagaços re-hidratados..... 67

Figura 31 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante dos extractos aquosos obtidos a partir do bagaço de azeitona e bagaços residuais depois de 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico expresso em µmol CAET 67

Figura 32 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante dos extractos supercríticos e metanólicos obtidos a partir do bagaço de azeitona com 10, 15, 20 e 40% de humidade depois de 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico expresso em µM CAET 68

Figura 33 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante dos extractos aquosos obtidos a partir do bagaço de azeitona e bagaços residuais depois de 3,5 h de extracção por CO ₂ supercrítico expresso em μ M CAE	69
Figura 34 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante dos extractos supercríticos e metanólicos obtidos a partir do bagaço de azeitona com 10, 15, 20 e 40% de humidade depois de 3,5 h de extracção por CO ₂ supercrítico expresso em μ MCAE	70
Figura 35 - Teor em polifenóis totais (mg EAG/ g partícula) presentes nos encapsulados produzidos para diferentes temperaturas de secagem: 120, 155 e 190 °C.....	71
Figura 36 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante dos extractos bioactivos encapsulados em matriz de inulina atomizados a 120, 155 e 190°C, previamente obtidos a partir de 3,5 h de extracção supercrítica do bagaço de azeitona com 20% de humidade e extracção convencional durante 8 horas utilizando n-hexano como solvente expresso em μ M CAET.....	72

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Composição química do fruto, em valores médios (adaptado de Boskou, 2006)	5
Quadro 2 – Vantagens e Inconvenientes dos três sistemas de extracção de azeite (Aires, 2007)	10
Quadro 3 -Classes de materiais utilizados como matrizes encapsulantes no encapsulamento de ingredientes alimentares (Fonte: Desai & Park, 2005).....	27
Quadro 4 -Métodos de encapsulamento de compostos bioactivos e esquemas representativos (adaptado de Fang & Bhandari, 2010).....	31
Quadro 5 –Alguns métodos de encapsulamento aplicados na indústria alimentar (Fonte: Madene <i>et al.</i> , 2006).....	31
Quadro 6 – Condições de análise dos ácidos gordos totais por GC.....	37
Quadro 7 -Delineamento experimental referente à extracção supercrítica do bagaço de azeitona da variedade <i>arbosana</i>	39
Quadro 8 -Condições de recolha dos extractos	40
Quadro 9 – Emulsões produzidas e temperaturas de secagem.....	44
Quadro 10 – Valores de humidade (%) para os quatro bagaços em estudo e desvio padrão associado.	46

ANEXOS

Quadro I - Matrizes sujeitas à determinação dos Polifenóis Totais	III
Quadro II - Massas dos compostos necessários para preparar 1 litro de PBS (75mM, pH 7.4)	V
Quadro III - Quantificação dos ácidos gordos	VII
Quadro IV - Quantificação dos esteróis	VII
Quadro V - Distribuição da fracção mássica por tamanho médio de partícula	VIII
Quadro VI - Quantificação dos Esteróis - Condição A de Extracção Supercrítica	IX
Quadro VII - Quantificação dos Esteróis - Condição B de Extracção Supercrítica	IX
Quadro VIII - Quantificação dos Esteróis	X
Quadro IX - Quantificação dos Esteróis	X
Quadro X - Quantificação dos Ácidos Gordos – Condição A	XI
Quadro XI - Quantificação dos Ácidos Gordos – Condição B	XII
Quadro XII - Quantificação dos Ácidos Gordos	XIII

I - INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

A indústria do azeite constitui uma das actividades agro-industriais mais antigas e com mais tradições culturais nos países da orla mediterrânica, representando um sector fundamental na estrutura da produção agrícola e económica desses países. Actualmente, cerca de 95% da superfície oleícola mundial está concentrada na Bacia Mediterrânica, sendo que os países produtores da União Europeia (Espanha, Itália, França, Grécia e Portugal) são responsáveis por cerca de 71% da produção a nível mundial. Os outros principais países produtores são a Tunísia (4,1%), a Turquia (5,4%), a Síria (6,6%), Marrocos (5,1%) e a Argélia (1,6%). De acordo com a FAO (<http://www.faostat.fao.org>), em 2009 Portugal encontrava-se na nona posição do *ranking* mundial com uma produção de 53 300 toneladas de azeite. Segundo o INE (<http://www.ine.pt>), Portugal em 2010 produziu cerca de 686 832 hl de azeite.

Com o crescimento anual de produção de azeite, verificado em todos os países produtores de azeite, levantam-se problemas relacionados com o dimensionamento/ capacidade dos lagares para laborarem continuamente e fazerem escoar os produtos produzidos, azeite e subprodutos. Esta situação estará sempre presente porque as práticas culturais aliadas à possibilidade de se aumentar o olival irá proporcionar maior produção de azeite gerando cada vez mais resíduos e subprodutos. As quantidades de resíduos e subprodutos que se geram, embora não sejam considerados perigosos e serem biodegradáveis, podem constituir um grave problema ambiental. Normalmente, os subprodutos da indústria do azeite, quer sejam as águas ruças, bagaço de azeitona ou folhas de oliveira, são direccionados para a agricultura como fertilizantes, usados como fonte de energia nos lagares e alimentação animal.

Por exigência de um consumidor cada vez mais esclarecido e alertado para os perigos de contaminação dos alimentos e das leis que restringem a utilização de solventes orgânicos na indústria alimentar, nos últimos anos, as indústrias alimentar e bebidas, farmacêutica, cosmética e naturopata desenvolveram um interesse acrescido, por antioxidantes naturais, em detrimento dos sintéticos, por serem susceptíveis de causarem e/ou promoverem efeitos negativos na saúde humana.

Neste contexto a valorização dos subprodutos da indústria alimentar como uma proeminente fonte natural de antioxidantes apresenta-se como especialmente interessante para as indústrias farmacêutica e alimentar, acrescentando componente funcional com vista ao desenvolvimento de novos produtos e/ou de ingredientes alimentares.

Existe já clara evidência científica de que os compostos bioactivos destas matrizes apresentam propriedades antivirais, antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias, propriedades anti-carcinogénicas, de inibição de aterosclerose e de estimulação da tiróide, e de que se incorporados nos alimentos promovem não só a melhoria da qualidade desses mesmos alimentos como podem trazer benefícios para a saúde humana (de Leonardis *et al.*, 2008).

A extracção de compostos naturais a partir de material vegetal é muitas vezes efectuada através de solventes orgânicos, muitos deles tóxicos ou não autorizados para a indústria alimentar. A extracção por fluidos no estado supercrítico surge como uma alternativa à extracção por solventes orgânicos, que de entre inúmeras vantagens, serão mais relevantes a sua elevada selectividade, obtenção de extractos inócuos, baixa temperatura de extracção podendo assim preservar os compostos mais termodegradáveis. No caso da extracção de compostos bioactivos a utilização de CO₂ supercrítico é o mais referenciado. Para além das vantagens mencionadas, é inerte sem causar prejuízos para o meio ambiente e disponível com elevado grau de pureza a baixo custo.

A quantidade de bagaço de azeitona produzida anualmente e elevado teor em compostos bioactivos como polifenóis, esteróis vegetais e ácidos gordos monoinsaturados que este contém, justificam a sua extracção a partir deste subproduto. Tendo em mente o interesse destes compostos, pelos benefícios acima referidos e atendendo a que os extractos supercríticos são inócuos, equacionou-se este processo para a obtenção de compostos bioactivos a partir de bagaço de azeitona.

O presente estudo com o tema *Extracção e encapsulamento de compostos bioactivos de bagaço de azeitona* inseriu-se no projecto financiado pela FCT - Projecto PTDC/AGR-ALI/67194/2006 e seguiu uma linha de investigação sobre a valorização de subprodutos da indústria alimentar, e neste caso em particular, o bagaço de azeitona, como fonte de compostos bioactivos susceptíveis de fomentar não só a qualidade dos alimentos como também trazer benefícios para a saúde humana. Constitui assim, o objectivo deste trabalho a valorização do bagaço de azeitona como fonte natural de compostos bioactivos, nomeadamente os compostos fenólicos e em particular o hidroxitirosol, utilizando metodologias limpas para o efeito. Procurou-se também preservar o potencial antioxidante pelo encapsulamento dos extractos em matriz de uso alimentar.

O desenvolvimento experimental incluiu três etapas consecutivas e complementares:

1. Caracterização e selecção dos bagaços de azeitona;
2. Estabelecimento das condições de extracção por CO₂ supercrítico e extracção dos compostos bioactivos da matriz em estudo e caracterização dos respectivos extractos;
3. Encapsulamento dos compostos bioactivos do bagaço de azeitona;
4. Estudos da bioactividade (capacidade antioxidante) dos extractos encapsulados e não encapsulados.

II – ENQUADRAMENTO TEÓRICO

1. OLIVICULTURA E INDÚSTRIA DE EXTRACÇÃO DE AZEITE

1.1. *Considerações Históricas*

Crê-se que a plantação das oliveiras começou por volta do quarto milénio antes de Cristo nas regiões agora denominadas por Síria e Palestina. Há testemunhos relacionados com outras origens, nomeadamente Ásia Menor, Etiópia, Egipto e Índia. A disseminação da oliveira pelo Ocidente iniciou-se com os fenícios que utilizavam a árvore e/ou os seus frutos como moeda de troca no comércio marítimo (Boskou, 2006).

Com a dominância do Império Romano sobre a Grécia, Ásia Menor e o Egipto, o comércio no mar mediterrâneo expandiu permitindo a difusão do azeite e seus derivados não só para fins alimentares como também para fins farmacêuticos e energéticos (Chazau-Gilling, 1994 *cit. in* Boskou, 2006).

Em Portugal, os vestígios da presença da oliveira datam da idade do bronze. Aproveitando os conhecimentos de enxertia, técnicas de moagem da azeitona e fabrico de ânforas para transporte e armazenamento do azeite, trazidos pelos fenícios e melhoria do tratamento do olival pelos romanos vários aperfeiçoamentos foram feitos ao longo do tempo (Saramago, 2001 *cit. in* Aires, 2007).

Os portugueses contribuíram para a expansão da cultura da oliveira através das expedições marítimas pelo continente americano e, hoje em dia, encontra-se disseminada um pouco por todo o Mundo, desde a Europa, à Argentina, Chile, México, Estados Unidos da América, até à Austrália, Japão, e República da África do Sul e a vários países do Norte de África, entre outros.

1.2. *Caracterização da Arvore e Fruto*

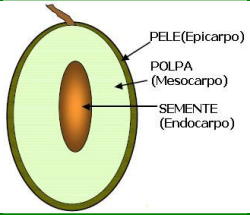
A oliveira é o nome comum que compreende 35 espécies. Trata-se de uma árvore de porte médio, de folhas persistentes, que pertence ao género *Olea* e família *Oleaceae*. Encontra-se dispersa por climas tropicais a climas mais temperados do globo terrestre entre os paralelos 30 e 45 dos hemisférios norte e sul (www.casadoazeite.pt).

A azeitona, fruto da oliveira, consiste numa drupa com forma oval. É constituída pelo pericarpo e endocarpo (caroço). Pode pesar entre 2 a 12 g embora haja variedades que possam atingir um peso de 20 g. O pericarpo é constituído pelo epicarpo (pele) e pelo mesocarpo (polpa) que representa cerca de 65 a 83% do peso total. O endocarpo representa cerca de 13 a 30%. O epicarpo encontra-se protegido exteriormente por ceras e vai alterando a sua cor inicial de verde para preto à medida da evolução da maturação (Boskou, 2006). O quadro 1 reporta a constituição química da azeitona e respectiva polpa em valores percentuais médios.

A azeitona sofre um processo de maturação lento, de alguns meses, e varia de acordo com a latitude, variedade, condições edafo-climáticas e práticas culturais (Boskou, 2006). De acordo com Montedoro *et al.*, (1986) o estado

de maturação da azeitona contribui com 30% na qualidade do azeite extraído seguidos de 20% para a variedade, 5% colheita, 15% transporte e armazenamento pré-extracção e 30% para o sistema de extracção.

Quadro 1 - Composição química do fruto, em valores médios (adaptado de Boskou, 2006)

				Peso (%)
Fruto				
	Pericarpo	Epicarpo	Polpa	65 - 83
	Endocarpo	Mesocarpo	Caroço Semente	13 - 30
Polpa				
	Humidade			50
	Lípidos (azeite)			22
	Glúcidos			19
	Proteína			1,6
	Celulose			5,8
	Cinzas			1,5
	Outros compostos importantes	Pectinas Ácidos orgânicos Pigmentos Glicósidos de fenóis		

1.3. Caracterização do Sector Oleícola

1.3.1. A Nível Mundial

Actualmente, cerca de 95% da superfície oleica mundial está concentrada na bacia mediterrânica, sendo que os países produtores da União Europeia (Espanha, Itália, França, Grécia e Portugal) são responsáveis por 71% da produção de azeite a nível mundial.

De acordo com os dados oficiais da FAOSTAT (www.faostat.org), a produção mundial de azeite, em 2009, situou-se na ordem das 2.91 milhões de toneladas. A Espanha é o maior produtor de azeite, com uma produção de 1 199 200 t, seguido da Itália (587 700 t) e Grécia (332 600 t). Portugal ocupa o 9º lugar no *ranking* mundial e o 4º lugar a nível europeu, com uma produção em azeite de 53 330 t (dados oficiais da FAOSTAT referentes ao ano de 2009). Outros principais países produtores são a Tunísia (4,1%), a Turquia (5,4%), a Síria (6,6%), Marrocos (5,1%) e a Argélia (1,6%) (www.casadoazeite.pt). Os países produtores são os principais consumidores de azeite (mais de 95%) e esta concentração geográfica do consumo tem origem não só em factores económicos (consumo de um produto local), mas também em factores históricos e sociológicos, tal como o costume e a preferência adquirida por tradição (Aires, 2007).

O consumo de azeite na União Europeia representa cerca de 63% do consumo mundial, embora o consumo de azeite em países que tradicionalmente não eram consumidores, como os Estados Unidos da América, tenha sofrido um forte crescimento nos últimos anos. De facto, nos Estados Unidos da América o consumo quase

duplicou em 15 anos, atingindo actualmente cerca de 260 000 toneladas anuais e colocando este país como o terceiro maior consumidor a nível mundial (www.casadoazeite.pt).

1.3.2. A Nível Nacional

Em Portugal, a produção de azeite tem um importante impacto sócio-económico. Nos últimos anos este tem aumentado, na medida em que se tem verificado um aumento da produção de azeite devido à extensão do olival e da introdução de melhores práticas agrícolas. Actualmente, de acordo com os dados oficiais do INE (www.ine.pt), existem 539 lagares espalhados por Portugal Continental, menos 23 que em 2009. Só na região da Beira Interior laboram 144, contudo são as regiões do Alentejo e de Trás-os-Montes que mais contribuem para a produção de azeite, que segundo os dados oficiais do INE (www.ine.pt) para o ano de 2010 obtiveram uma produção de 344 875 e 182 918 hl, respectivamente, num total de 686 832 hl.

Apesar de ser um país que face ao seu consumo em azeite, não é auto-suficiente, tem ainda a capacidade de exportar, sobretudo para o Brasil que absorve cerca de 65% do total das exportações nacionais de azeite (www.casadoazeite.pt).

1.4. Sistemas de Extracção de Azeite

O azeite, termo árabe *az-zait*, que significa sumo de azeitona (azeite e água), é uma gordura sintetizada naturalmente nas azeitonas como substância de reserva que disponibiliza a energia necessária ao desenvolvimento do fruto. É obtido da azeitona exclusivamente por processos mecânicos em condições, que não induza alteração.

A extracção de azeite realiza-se desde tempos imemoriais, por processos que foram sendo melhorados, no sentido de se obter uma maior eficácia na separação do mosto oleoso (água e azeite) do fruto (Gouveia & Saldanha, *cit. in* Aires, 2007).

O azeite começou por ser extraído dos frutos por esmagamento e adição de água, com recurso ao almofariz e pilão de pedra. Num outro método, designado por “método de compressão e enxaguamento”, as azeitonas eram colocadas num saco e batidas numa selha, sendo o azeite depois extraído torcendo o saco. A extracção era ajudada pela adição de água a ferver (Amouretti, 1996 *cit. in* Aires, 2007).

Outra técnica antiga usada no Médio Oriente envolvia a utilização de pias escavadas na superfície rochosa, ao ar livre, com um pendente suave, em que o esmagamento das azeitonas era feito com recurso a rolos cilíndricos com movimento de vaivém. Outros métodos existiram ao longo dos tempos, traduzindo o apuramento da técnica. Uma descoberta importante foi a do moinho com mós ou galgas rotativas, que terá surgido no século II a.C. Este processo tinha a vantagem de resultar de um movimento rotativo e não de um movimento de vaivém, dando

assim continuidade ao processo de moenda, com muito bons resultados na preparação da pasta para extracção do azeite e tornando possível a utilização da tracção animal e, mais tarde, a força da água, do vento e maquinaria. Após a moenda, a pasta de azeitona era então levada às prensas. Também estas evoluíram ao longo dos tempos: nas mais antigas (prensas de torre, de cunha e de parafuso), a pressão era exercida directamente sobre a pasta de azeitona, surgindo depois outras prensas que funcionavam pelo sistema de alavanca (prensas de vara simples, vara e tambor, de vara e parafuso ou de vara e quintal), com melhores rendimentos e que utilizavam capachos ou seiras. As prensas de varas chegaram até ao séc. XX e ainda se encontram hoje, alguns exemplares em lagares de azeite e de vinho. Com a revolução industrial e a aplicação do vapor ao lagar, surgem novas maquinarias e as prensas de varas são substituídas por prensas hidráulicas. Mais tarde, surgem os centrifugadores horizontais ou *decanters*, que permitindo o funcionamento dos lagares em modo contínuo, melhoraram os rendimentos e as condições higieno-sanitárias das instalações e reduziram a quantidade de mão-de-obra necessária (Gouveia & Saldanha, 2002 *cit. in* Aires, 2007).

Em Portugal, operam, sobretudo, três sistemas de extracção de azeite: o sistema clássico (pressão), sistema de extracção contínuo de três fases e o sistema de extracção contínuo de duas fases. O sistema tradicional ainda é o mais utilizado sobretudo entre as regiões do Minho, Ribatejo e Oeste, embora o sistema contínuo de duas fases esteja a ganhar terreno sendo o sistema mais utilizado na região do Alentejo. De acordo com o INE (www.ine.pt) e para o ano de 2010, produziu-se 47 914 hl de azeite pelo sistema tradicional, 116 527 hl através do sistema contínuo de três fases e 522 391 hl pelo sistema contínuo de duas fases.

1.4.1. Caracterização dos Sistemas de Extracção

Independentemente do processo de extracção utilizado, existe uma fase inicial que é transversal aos três sistemas. Compreende uma série de etapas que engloba a pesagem e descarga da azeitona no lagar, limpeza e lavagem (remoção de ramos, pedras, terra, folhas). O processo de extracção, seja ele qual for, requer primeiro que os frutos sejam dilacerados e reduzidos a pasta por meio de uma moenda e batedura, respectivamente. A moenda promove a ruptura das paredes celulares e das biomembranas das gotículas permitindo a libertação das gotas de azeite que se encontram na polpa da azeitona (Aires, 2007). A batedura consiste num batimento lento e contínuo da massa de azeitona, que simultaneamente é aquecida. Tem a finalidade de aumentar a percentagem de azeite livre, favorecendo, por um lado a fusão das gotículas de azeite em gotas maiores e por outro, rompendo a emulsão azeite/ água facilitando a separação das fases (Di Giovacchino (1991) e Garcia (2004) *cit. in* Aires, 2007). O rendimento em azeite e a sua qualidade depende destas duas etapas pelo que devem ser devidamente controladas, no que respeita ao grau de moenda, duração da batedura e temperatura da pasta (Gouveia, 1995).

O Sistema Clássico, Tradicional ou de Prensas, baseia-se no facto de, em condições apropriadas e sob a acção da pressão, a pasta de azeitona colocada entre os capachos, liberta o mosto oleoso (fase líquida constituída por azeite e água), que por decantação obtém-se o azeite através da diferença de densidades.

A necessidade em aumentar a capacidade de produção e rendimentos de extracção levou ao desenvolvimento de um novo sistema de extracção e na década de 70 surge um novo sistema de extracção contínuo designado por sistemas de 3 fases. Porém, até à década de 80, a extracção de azeite era feita exclusivamente pelo sistema tradicional de prensas.

O sistema de 3 fases separa os três constituintes principais da azeitona: azeite, água de vegetação (em conjunto com a água adicionada durante o processo e as substâncias que são solubilizadas, constituindo as chamadas águas ruças) e o bagaço ou também chamado de resíduo sólido (constituído por pele, polpa e caroço). Caracteriza-se pela adição de água à pasta de azeitona batida que se faz passar por uma centrífuga horizontal, *decantor*, de modo a separar a parte sólida do mosto oleoso. O mosto passa depois por uma centrífuga vertical onde se separa o azeite da água de vegetação.

Os problemas ambientais associados às águas ruças levaram à procura de novas metodologias de produção de azeite, mais amigas do ambiente. Surge assim o sistema de duas fases o qual permite reduzir substancialmente o volume de efluente produzido.

O sistema de 2 fases é semelhante ao anterior com a diferença de que a água existente no sistema é eliminada conjuntamente com a fase sólida, mais húmida, portanto. Este sistema tem a vantagem, em relação ao sistema de 3 fases, de produzir azeites com maior teor em antioxidantes naturais, como por exemplo, os polifenóis. No entanto, também este sistema não é totalmente inócuo em termos ambientais, uma vez que se produzem bagaços mais húmidos quando comparados com os dois sistemas anteriores.

Actualmente, perante a implementação do processo de 2 fases e a melhoria da tecnologia de extracção que permite diminuir as perdas de azeite para o bagaço, o escoamento dos bagaços de azeitona (de 2 e 3 fases) passou a constituir um problema importante para os lagareiros, transformando-se num custo o que até há pouco era uma fonte de rendimento adicional para o sector (Rosa *et al.*, 1997 *cit in* Baeta-Hall, *et al.*, consultado em 01-Outubro-2011).

A figura 1 representa, de uma forma muito sistematizada, a evolução dos sistemas de extracção de azeite ainda usados nos dias de hoje.

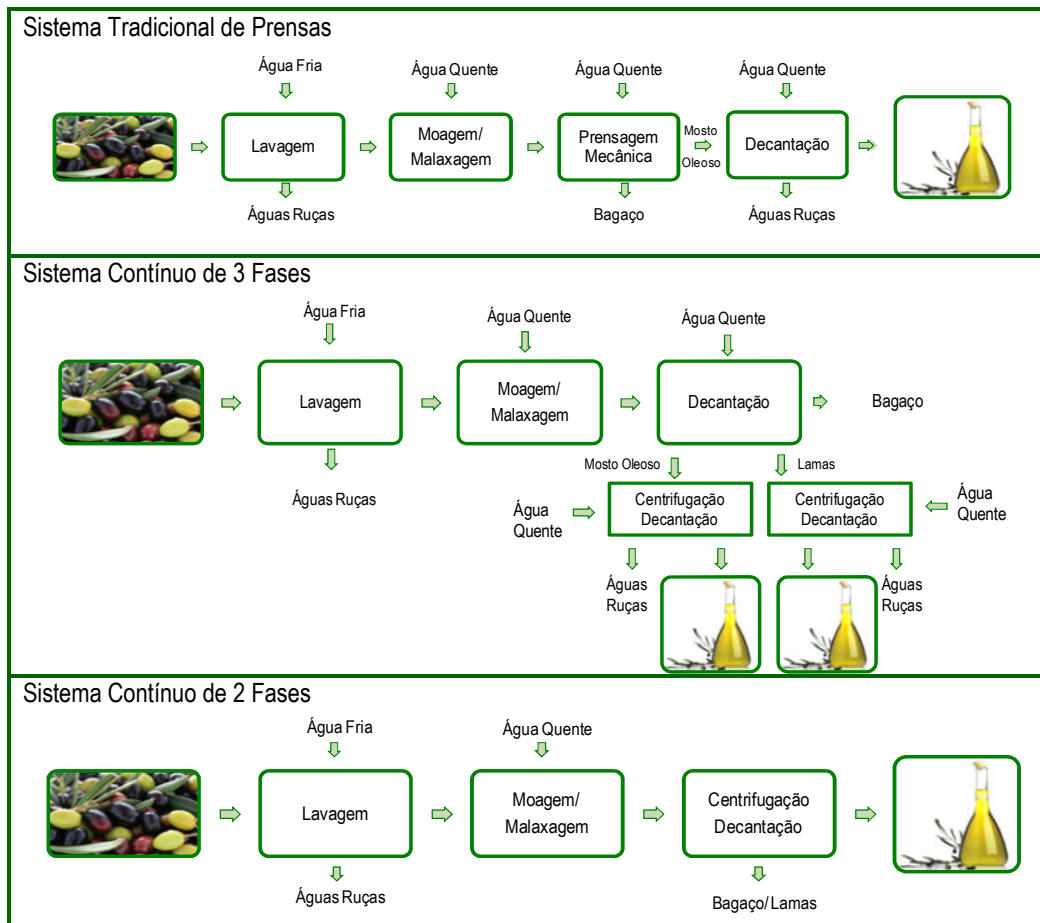


Figura 1 - Evolução dos sistemas de extração de azeite (adaptado de Vlyssides *et al.*, 2004).

Múltiplos estudos têm-se focado em avaliar o efeito de parâmetros de processamento como o tempo, temperatura e uso de enzimas no decorrer dos processos de extração e de que forma afectam a qualidade e propriedades nutricionais do azeite, com o objectivo de esgotar os bagaços e águas ruças nos compostos de interesse. Por exemplo, Artajo *et al.* (2007) estudaram o efeito da malaxagem no perfil fenólico da pasta de azeitona e a repartição dos compostos fenólicos pelos subprodutos resultantes da extração do azeite, a nível industrial, considerando ainda três períodos de colheita e produção. Verificaram perdas importantes nos diferentes grupos fenólicos para a fase sólida, diminuição progressiva do teor total de álcoois fenólicos com o tempo na etapa de malaxagem.

1.4.2. Vantagens e Desvantagens dos Sistemas de Extração

Sendo diferenciados os processos de extração descritos apresentam vantagens e desvantagens, como se pode constatar pelo resumo apresentado no quadro 2, pelo que a utilização de um ou de outro deve ser equacionada caso a caso.

Quadro 2 – Vantagens e Inconvenientes dos três sistemas de extracção de azeite (Aires, 2007)

Sistemas de Prensas	Sistema Contínuo de Três Fases	Sistema Contínuo de Duas Fases
Principais Vantagens		
Menor Investimento Inicial; Reduzida potência instalada;	Continuidade do processo	Continuidade do processo
Menor gasto energético;	Elevada capacidade de laboração e produtividade horária	Elevada capacidade de laboração e produtividade horária
Menor volume de água que o de 3 fases;	Possibilidade de automatização	Possibilidade de automatização
Bagaços mais secos;	Ocupa menos superfície que as prensas	Ocupa menos superfície que as prensas
Maior valor do bagaço;	Azeite com menor acidez que o das prensas	Azeite com menor acidez que o das prensas
Volume de água ruça menor que no de 3 fases;	Melhores características organolépticas do azeite obtido com azeitonas defeituosas	Melhores características organolépticas do azeite obtido com azeitonas defeituosas
		Menor volume de água do que no de 3 fases
		Reduzido volume de água ruça logo menor risco de poluição ambiental
		Azeite com maior teor em antioxidantes logo mais estável
Principais Inconvenientes		
Processo descontínuo, produtividade limitada; Equipamento que ocupa muito espaço	Maior custo de investimento que nas prensas;	Maior custo de investimento que nas prensas;
	Maior consumo de água;	Menor controlo visual e maior necessidade de controlo analítico;
Necessidade de muita mão-de-obra	Maior perda de substâncias antioxidantes na água ruça;	Necessidade de pessoal especializado;
Dificuldade em manter uma correcta higiene ao longo do processo	Maior produção de águas ruças e maior perigo de contaminação ambiental.	Bagaço com mais humidade, maior volume e maior dificuldade de extracção
Consumo de capachos e sua possível contaminação		

2. IMPACTO AMBIENTAL DOS RESÍDUOS E/OU SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE EXTRACÇÃO DE AZEITE

A indústria oleica produz uma quantidade substancial de resíduos e subprodutos quer seja a montante ou a jusante do processamento industrial do azeite. Entre os resíduos e os subprodutos constam as águas ruças, o bagaço de azeitona que inclui a polpa, peles, caroços e sementes das azeitonas, e folhas de oliveira que são eliminadas antes das azeitonas serem processadas. Ainda são pouco valorizados e conduzidos sobretudo para fertilizantes, alimentação animal e compostagem (Bouaziz *et al.*; 2008).

As águas ruças, produzidas pelo sistema de três fases, contêm menos gorduras do que as que se geravam pelo sistema tradicional de prensas, mas provocam um impacto ambiental importante, o que originou o aparecimento de legislação no sentido de obrigatoriedade do seu tratamento antes de serem descarregadas nos meios hídricos ou nos solos vizinhos.

A extracção de azeite, quer seja por prensagem, quer seja por um sistema contínuo de três fases (azeite, águas ruças e bagaço de azeitona) ainda com relativa expressão nos países produtores de azeite, conduz a problemas ambientais sérios devido às grandes quantidades de resíduos produzidos, sobretudo a quantidade de água utilizada nestes dois tipos de extracção. O sistema de 3 fases envolve a adição de grandes quantidades de água (cerca de 50 L/100 Kg pasta de azeitona), resultando numa produção de águas ruças de cerca de 30 milhões m³ só a nível europeu (Borja *et al.*, 1997).

No sistema de extracção de duas fases, a quantidade de água necessária ao processo é significativamente menor o que, de uma forma geral diminui a quantidade de resíduos produzidos. Trata-se de um processo que está a ganhar terreno face aos outros sistemas em muitos países produtores de azeite.

Os principais compostos orgânicos que constituem estes produtos são açúcares, compostos azotados, ácidos voláteis, poli-álcoois, pectinas, lípidos e polifenóis (D'Annibale *et al.*, 1998; Lafka *et al.*, 2011). Estes constituintes são altamente poluentes e fitotóxicos e que por serem resistentes à degradação biológica podem causar efeitos nocivos à flora e fauna nos locais onde são depositados (Schieber *et al.*, 2001). Segundo Bisignano *et al.* (1999) são os compostos fenólicos os responsáveis pela sua toxicidade, actividade antimicrobiana e conseqüente reduzida degradação biológica. A extracção de compostos biologicamente activos, nomeadamente os polifenóis, das águas ruças tornam este resíduo altamente poluente, numa fonte natural de antioxidantes. Estes compostos fenólicos são capazes de inibir a acção de espécies reactivas de oxigénio, susceptíveis de desencadear várias doenças humanas e responsáveis pela degradação oxidativa de alimentos (de Marco *et al.*, 2007). Tornam-se portanto, um objecto de grande interesse por parte das indústrias alimentar e farmacêutica.

É neste contexto que têm surgido diversos trabalhos de investigação no sentido de procurar soluções alternativas para a utilização do bagaço de azeitona e de outros subprodutos provenientes da produção de

azeite, que permitam o seu aproveitamento e diminuição do impacto ambiental. Contudo, face a uma maior preocupação ambiental todos os resíduos são tratados de forma a aumentar rendimentos e conservar energia.

3. VALORIZAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE EXTRACÇÃO DE AZEITE

Ainda não existe um sistema único que trate todos os resíduos/ subprodutos resultantes da produção de azeite derivado às limitações técnicas, económicas ou simplesmente pela natureza única de cada subproduto. A produção do azeite virgem encontra-se em expansão e em rápido crescimento o que para satisfazer a procura levará concomitantemente à produção de maiores quantidades de subprodutos, pelo que urge encontrar métodos e tecnologias que os valorizem, assim como políticas ambientais que favoreçam protocolos que incluam a valorização dos resíduos (Morillo *et al.*, 2009).

Desde a década de 90 têm vindo a ser desenvolvidos trabalhos de visando a valorização dos subprodutos da indústria do azeite. A União Europeia iniciou um projecto “Antioxidantes Naturais a partir de Águas Ruças resultantes da Indústria de Extracção de Azeite” de modo a desenvolver processos de extracção de compostos fenólicos a partir dos subprodutos. (Obied, *et al.*, 2005).

Apesar de haver muitas propostas para a valorização dos subprodutos da indústria do azeite entre as quais estão incluídas a aplicação para fontes de energia renovável (Vitolo *et al.*, 1999), ou compostagem (Vlyssides *et al.*; 1996) foi também proposto para ser usado como substrato de baixo custo para a produção de xantana (Lopez & Ramos-Cormenzana, 1996), etanol (Ballesteros *et al.*, 2001) e oxidases de fenóis (Fenice *et al.*, 2003). A produção de compostos com actividade antioxidante como é o caso dos compostos fenólicos presentes nos subprodutos da indústria do azeite constitui uma alternativa viável para a valorização destes desperdícios eventualmente problemáticos (Obied *et al.*, 2005).

Outras formas de utilização dos bagaços de azeitona visa a produção de bioenergia. Sensöz, Demiral, & Gercel, (2006) conduziram um trabalho utilizando o bagaço de azeitona, proveniente de extracção clássica, para a produção de energia renovável através da pirólise sob diferentes condições de temperatura, calor, tamanho de partícula, fluxo de azoto no rendimento da reacção e respectivas composições do bio-óleo.

De facto, os subprodutos da indústria oleícola são importantes fontes naturais de compostos de valor acrescentado como o hidroxitirosol ou outros compostos fenólicos com actividade antioxidante (de Marco *et al.*, 2007). De acordo com Lesage-Meessen *et al.*, (2001) o sistema de extracção de 2 fases produz um bagaço rico em hidroxitirosol de concentração ente 10 a 100 vezes maior que o presente num azeite.

A figura 2 representa, de forma muito sucinta o reaproveitamento industrial dos diversos subprodutos da indústria de extracção de azeite.

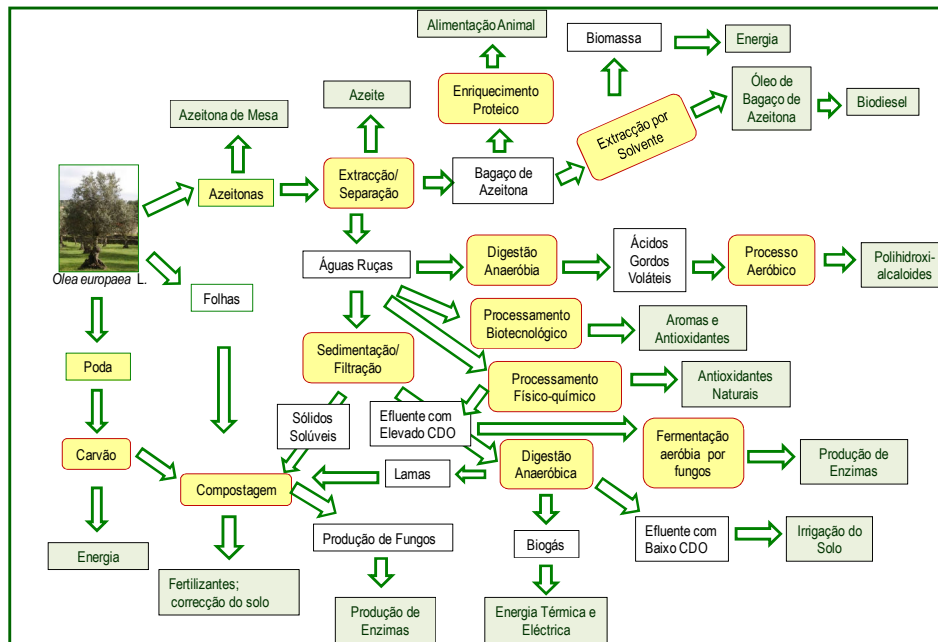


Figura 2 - Diagrama esquemático que exemplifica os principais subprodutos e respectivos destinos industriais da indústria do azeite (Federici *et al.*, 2009).

3.1. O Caso Particular do Bagaço de Azeitona

O bagaço de azeitona é definido como um dos subprodutos da indústria de extracção de azeite e constituído pela polpa, caroço e tegumento da azeitona. As respectivas proporções variam consoante a variedade da azeitona, condições edafo-climáticas e o sistema de extracção adoptado. No entanto, várias referências bibliográficas referem uma constituição em polpa e película que ronda os 30 a 35%, caroço também com cerca de 30 a 35% e 25 a 55% de água.

O bagaço contém ainda uma quantidade de azeite residual (5 a 8%), que já não é possível extrair por meios físicos sendo a sua extracção conseguida recorrendo a solventes orgânicos, permitidos por lei para a indústria alimentar. O óleo obtido designa-se por óleo de bagaço de azeitona bruto, porque nele ainda constam compostos indesejáveis, como produtos primários e secundários de oxidação, pigmentos, ácidos gordos livres, resíduos de solventes, gomas e mucilagens (Ganhão, 2003). Para que este óleo seja introduzido na alimentação humana como óleo de bagaço de azeitona, terá que sofrer uma refinação de modo a eliminar estas substâncias de modo a obter-se um óleo isento de ácidos gordos livres e produtos tóxicos (Proctor & Clark, 1993).

Em média, 100 Kg de azeitona correspondem a cerca de 40 Kg de bagaço e que um Kg de bagaço é composto por 400 g de polpa e 600 g de caroço (Freitas, 2007).

O bagaço de azeitona é um material muito húmido e pastoso, de pH ácido, rico em matéria orgânica onde quase metade é lenhina, com conteúdos interessantes em azoto e potássio e que apresenta concentrações significativas de gorduras e compostos fenólicos (Rosa *et al.*, 2000b e 2001; *cit. in* Baeta-Hall *et al.*, consultado a 1-Outubro-2011). A sua baixa degradabilidade, quando depositados no meio ambiente, deve-se às fracções fenólica e lipídica sendo essencialmente aos compostos fenólicos que se atribuem as propriedades antibacterianas e fitotóxicas (Baeta-Hall, *et al.*, consultado a 1-Outubro-2011). A presença destes compostos fenólicos livres tem a sua origem nos processos de hidrólise dos glucósidos e dos ésteres presentes na polpa da azeitona durante a elaboração do azeite.

4. COMPOSTOS BIOACTIVOS

4.1. Conceitos e Funções

Os principais fitoquímicos com bioactividade presentes nos vegetais são os polifenóis, terpenóides, glucosinolatos e outros compostos que possuem na sua estrutura o enxofre. Estes compostos são responsáveis por inúmeras características que conferem qualidade aos produtos e/ou seus derivados (vinho, sumos, etc.), nomeadamente a cor, sabor, aroma (Tomás-Barberán & Espin, 2001). Estes compostos são geralmente metabolitos secundários que desempenham funções específicas na planta tais como protecção aos raios ultravioletas e libertação de odores de modo a atrair animais para assegurar a polinização e dispersão de sementes entre outras funções (Harborne, 1982).

4.2. Actividade Antioxidante

A principal característica dos compostos antioxidantes é a capacidade de resgatar os radicais livres. Os radicais livres e espécies oxigénio estão presentes em todos os sistemas biológicos. Estes radicais livres oxidam ácidos nucleicos, proteínas, lípidos ou DNA podendo mesmo desencadear doenças degenerativas. Os compostos antioxidantes como os ácidos fenólicos, polifenóis e flavonoides captam os radicais livres como os peróxidos, hidroperóxidos e lípidos peróxilos e como tal inibem os mecanismos de oxidação que conduzem a doenças degenerativas.

A capacidade antioxidante depende de sinergias entre os constituintes presentes nos alimentos pelo que a combinação de dois ou mais métodos de determinação da capacidade antioxidante permitem compreender os mecanismos de actuação sobre os radicais livres (Matias, 2008).

Os métodos mais frequentemente utilizados são ORAC, FRAP, TEAC e DPPH. O método de ORAC (Oxygen Radical Absorbance) é o considerado para os sistemas biológicos, uma vez que mede a capacidade de resgate

do radical peróxido (ROO^\bullet), o radical livre mais abundante. O método FRAP (Ferric-Reducing Antioxidant Power) mede a capacidade que os compostos antioxidantes têm em reduzir o complexo ferrico-tripiridiltriazina. Este método apresenta a desvantagem de não estabelecer uma relação directa entre a capacidade de redução e actividade antioxidante uma vez que o método não inclui um substrato oxidável (Frankel & Meyer, 2000).

Os métodos TEAC e DPPH são operacionalmente simples e por isso os mais usados. O método TEAC é baseado na capacidade dos antioxidantes em captar o radical 2,2-azonobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS^\bullet). Este método tem sido bastante criticado uma vez que este composto não é encontrado nos sistemas biológicos (Rodríguez-Amaya, 2010). O método DPPH é baseado na captação do radical DPPH. Este radical encontra-se comercialmente disponível mas não possui similaridades com os radicais altamente reactivos que se formam durante a peroxidação lipídica, constituindo uma desvantagem deste método (Frankel & Meyer, 2000).

O método de HORAC (Hydroxyl Radical Averting Capacity) permite quantificar a capacidade de resgate e/ou inibir a produção do radical hidroxilo (HO^\bullet). O radical hidroxilo, bem como o peróxido, fazem parte de um conjunto de principais radicais livres desencadeadores de stress oxidativo celular responsáveis por promoverem doenças cardiovasculares, vários tipos de cancro, doenças degenerativas, como a doença de Alzheimer e Parkinson e envelhecimento celular (Fitó & Covas, 2007).

Existe uma forte correlação entre o conteúdo de polifenóis totais e a actividade antioxidante sendo considerado como os maiores contribuintes para a actividade antioxidante nos alimentos, uma vez que os métodos reflectem a capacidade de resgate dos radicais livres que é o principal motor de funcionamento dos compostos fenólicos. Os polifenóis totais são geralmente determinados pelo método de Folin-Ciocalteu. É um dos métodos mais antigos e mais usados como um mecanismo de reacção de oxidação/ redução (Prior *et al.*, 2005).

4.3. Compostos Bioactivos no Bagaço de Azeitona de maior Relevância

4.3.1. Compostos Fenólicos

Nos últimos anos, os compostos fenólicos têm despertado um interesse acrescido na comunidade científica das mais diversas áreas pela correlação entre a potencial actividade antioxidante e possíveis efeitos contra as doenças degenerativas (Artajo *et al.*, 2007).

O azeite apenas contém na sua composição 2% de fracção fenólica da azeitona, o que significa que os restantes 98% dos fenóis totais permanecem nos subprodutos da indústria do azeite (bagaço com 45% e águas ruças com 53% aproximadamente) (Rodis *et al.*, 2002 *cit. in* Obied *et al.*, 2005). Isto faz com que estes subprodutos sejam potenciais fontes de uma variedade de compostos fenólicos com diferentes níveis de actividade biológica. Os compostos fenólicos presentes nos subprodutos podem ocorrer naturalmente no fruto ou podem-se formar durante o processamento pela partição de fases lipídica e sólida (Obied *et al.*, 2005).

A ocorrência de compostos fenólicos específicos nos subprodutos depende da cultivar, grau de maturação, condições edafo-climáticas, tempo de armazenamento e método de extracção de azeite (Obied *et al.*, 2005;).

Entre os vários compostos fenólicos, apenas a oleuropeína, o hidroxitirosol e o tirosol serão mencionados pelas respectivas especificidades, características deste tipo de matriz.

4.3.1.1. Oleuropeína

É o fenol mais abundante nas folhas de oliveira (60-90 mg/g base seca) (Le Tutour & Guedon, 1992) embora estejam igualmente na árvore e fruto (pele, polpa e caroço) (Servili *et al.*, 1999).

Durante a extracção de azeite e mais concretamente nas etapas de esmagamento e malaxagem, a oleuropeína e a dimetiloleuropeína são hidrolisadas por glicosidasas presentes no fruto para as formas dialdeídicas da oleuropeína aglicónica (3,4-DHPEA-EA). As agliconas tornam-se solúveis na fase lipídica enquanto que os glicósidos permanecem nas águas ruças (Cortesi *et al.*, 1995 *cit. in* Shahidi & Naczki, 2006).

Há cerca de 30 anos que se tem estudado os diversos subprodutos da oliveira (folhas, rebentos/gomos, azeitona: polpa, caroço e semente, madeira, casca e raízes) de forma a isolar a oleuropeína.

À oleuropeína são atribuídos vários benefícios: prevenção de doenças cardíacas, protecção de enzimas e células hipersensíveis em pacientes cancerígenos (Bonoli *et al.*, 2004). Como vasodilatador, a oleuropeína aumenta a velocidade da corrente sanguínea na artéria coronária e melhora a arritmia (Zarzuelo *et al.*, 1991). Favorece o metabolismo lipídico reduzindo problemas de obesidade (Iwai *et al.*, 2005 *cit. in* Japón-Luján *et al.*, 2006); apresenta propriedades antivirais (Kubo *et al.*, 1995; Ucella, 2001).

Está provado que este composto é um forte antioxidante e possui propriedades anti-inflamatórias (Visioli & Galli, 2002). Outros estudos científicos demonstraram que a oleuropeína possui igualmente actividade antimicrobiana sobre vírus, retrovírus, bactérias, leveduras, fungos, bolores e outros parasitas (Guinda, 2006).

Outros efeitos clínicos atribuídos à oleuropeína são a fortificação celular e do sistema imunitário através dos macrófagos (Visioli *et al.*, 1998), inibição da agregação das plaquetas (Petroni *et al.*, 1995) e redução de cerca de 30% do nível dos LDL (Visioli & Galli, 1994).

4.3.1.2. Hidroxitirosol

O hidroxitirosol (HT) ou 3,4-dihidroxifeniletanol é um dos compostos hidroxi-aromáticos que pertence ao grupo dos secoiridoidos (de Leonardis, *et al.*, 2008).

Em natureza, o HT nativo raramente se encontra na forma livre exceptuando nas azeitonas já em estado de maturação avançado devido à hidrólise da oleuropeína. O mecanismo natural de produção de HT livre é através

de hidrólise enzimática o que requer especificamente as enzimas β -glicosidase e esterase. Contudo, a nível laboratorial e para processos industriais é a hidrólise por via ácida a mais corrente (de Leonardis *et al.* 2008). A figura 3 descreve a conversão da oleuropeína em hidroxitirosol mediante hidrólise levada a cabo por vias enzimática e ácida.

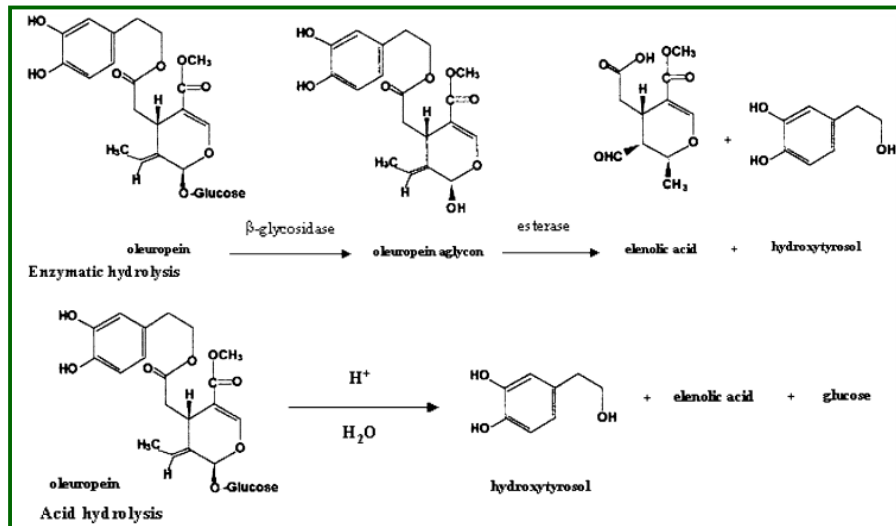


Figura 3 - Produção de hidroxitirosol através da hidrólise da oleuropeína por vias enzimática e ácida (de Leonardis *et al.*, 2008)

O hidroxitirosol é o composto fenólico da azeitona mais extensivamente estudado. Actualmente, muitos estudos são no âmbito da biodisponibilidade e metabolismo humano para estabelecer os efeitos benéficos na saúde (Miró-Casas *et al.*, 2003). Schaffer *et al.* (2007) afirmam que as diferentes actividades biológicas afectam diversos mecanismos de stress oxidativo e aparentemente não só *in vitro* mas também em *ex vivo*. Trata-se portanto, de um álcool orto-difenil muito bioactivo com propriedades antioxidantes (de Leonardis *et al.*, 2008) e actividade anti-inflamatória e anti-trombótica estão a ser investigados *in vivo* (Schaffer *et al.*, 2007). Estes últimos autores verificaram que HT oferece uma protecção neurológica e pode contribuir para diminuir a incidência de doenças degenerativas, como é observado nos países da orla mediterrânea. Exerce ainda efeitos positivos no sistema cardiovascular (Visioli & Galli, 1998a; Visioli & Galli, 1998b; Visioli & Galli, 1999). Aruoma *et al.* (1998) verificaram que HT inibe a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Petroni *et al.* (1995) demonstraram a inibição da agregação das plaquetas. O HT demonstrou ainda actividade antimicrobiana *in vitro* (Bisignano *et al.*, 1999).

Um índice de maturação rápido na azeitona, promove um aumento de concentração de hidroxitirosol na polpa (Artajo *et al.*, 2007).

Contudo o hidroxitirosol não está comercialmente disponível em grandes quantidades para ser utilizado como aditivo alimentar. Muitos métodos têm sido propostos para a produção de hidroxitirosol quer por via química

(Tuck & Hayball, 2002) ou por síntese enzimática (Espín *et al.*, 2001) mas os protocolos normalmente são morosos e envolvem custos elevados, resultando num número limitado de produtos comercialmente disponíveis contendo hidroxitirosol puro com elevado custo. Muitos protocolos têm sido desenvolvidos no sentido de purificar o hidroxitirosol e outros compostos fenólicos a partir dos subprodutos da indústria do azeite mas encontram-se patenteados (Japón-Luján *et al.*, 2006; de Marco *et al.*, 2007; de Leonardis *et al.*, 2008).

4.3.1.3. Tirosol

A par com o hidroxitirosol, o tirosol (TI) também designado por (2-hidroxi-etil)fenol, p-hidroxifeniletil álcool ou por 2-4-hidroxifenil-etanol, são os fenóis mais representativos na azeitona e por conseguinte no azeite e ocorrem sob a forma de esteres de ácido elenólico secoiridoido.

O tirosol encontra-se sobretudo no bagaço de azeitona, ao contrário do hidroxitirosol que está presente em maior quantidade no caroço/semente (Fernández-Bolaños, *et al.*, 1998).

Estudos efectuados por Papadopoulos & Boskou, (1991) demonstram que o tirosol possui um baixo factor de protecção e que por conseguinte, praticamente não possui nenhum efeito antioxidante.

4.3.2. Fitosteróis

Os esteróis de origem vegetal são convencionalmente designados por fitosteróis. São compostos tetracíclicos biosintetizados a partir do escelano. Apesar de não serem realmente lípidos, partilham algumas das suas propriedades físicas (Gunstone, 2008) e encontram-se sobretudo em óleos e gorduras constituindo a fracção insaponificável (Kris-Ethorn *et al.*, 2002).

A maior parte dos óleos vegetais brutos contêm cerca de 1000-5000 mg/Kg (0,1-0,5%) de fitosteróis, em parte como esteróis livres e como esteróis esterificados com os ácidos gordos. No azeite, os esteróis atingem concentrações entre os 1800 e 4939 mg/Kg (Mulinacci *et al.*, 2005 *cit. in* Gunstone, 2008) e o seu decréscimo durante o armazenamento está associado com o aumento do índice de peróxidos.

Os fitosteróis são ingredientes funcionais, e não sendo sintetizados pelo organismo humano são fracamente absorvidos e excretados rapidamente pelo fígado pelo que se encontram em pouca abundância nos tecidos humanos (Ling & Jones, 1995). Apresentam no entanto grande importância não só em termos nutricionais como também do ponto de vista fisiológico, uma vez que são responsáveis por baixar os níveis de colesterol e o LDL no plasma sanguíneo. Apenas o consumo de 1 g/dia de fitosteróis é suficiente para inibir a absorção do colesterol, contudo o consumo médio diário é de apenas de 200 - 400 mg/dia daí a importância de enriquecer determinados produtos alimentares com este tipo de compostos. Um dos exemplos recai sobre as margarinas (Belitz *et al.*, 2009) sendo consideradas como alimentos funcionais. O nível de esteróis num azeite ronda os 0,1-

0,2% o que é relativamente baixo quando comparados com as margarinas vegetais hipocolesterémicas disponíveis no mercado.

Os fitosteróis encontram-se em níveis muito baixos nos óleos alimentares refinados, uma vez que a maior parte é removida na etapa de desodorização, contudo, estes e outros compostos podem ser recuperados por processos de destilação e são uma fonte de grande interesse para a produção de precursores fármacos à base de esteróis (Gunstone, 2008).

O esteroide mais representativo é o β -sitosterol, seguido do Δ -5-avenasterol e campesterol. Outros esteróis presentes em menor quantidade são o sigmasterol, colesterol, brassicasterol, clerosterol, ergosterol, sitostanol, campestanol, Δ -7-avenasterol, Δ -7-colesterol, Δ -7-campesterol, Δ -7-stigmastenol, Δ -5,23-stimastadienol, Δ -5,24-stigmastadienol, Δ -7,22-ergastadienol, Δ -7,24-ergostadienol, 24-metileno-colesterol, e 22,23-dihidrobrassicasterol. Na figura 4 encontram-se as estruturas químicas dos fitosteróis mais representativos.

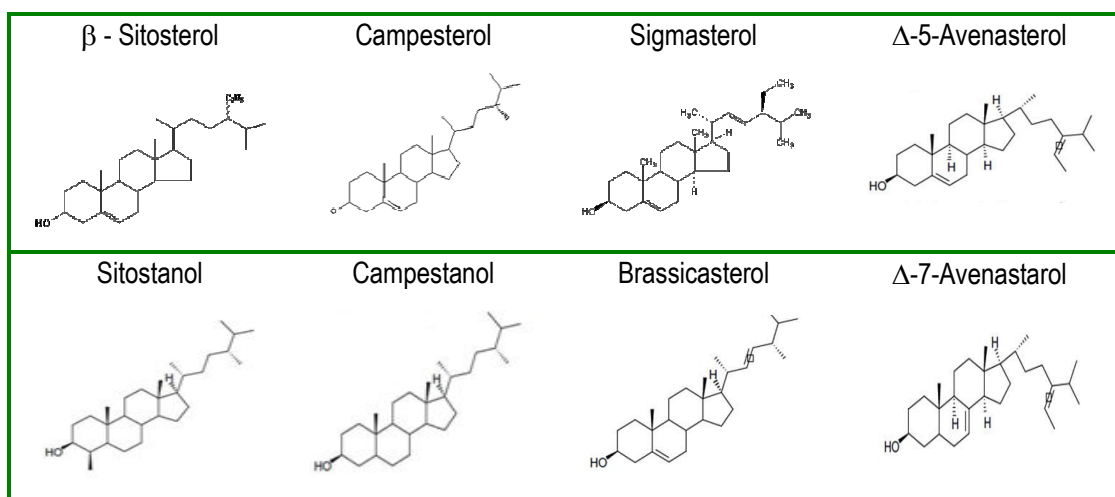


Figura 4 - Estruturas químicas dos fitosteróis mais representativos (adaptado de Plumb *et al.*, 2011).

Os fitosteróis podem apresentar outras propriedades biológicas importantes relacionadas com a redução de espécies reactivas de oxigénio que são produzidas, regulando as enzimas e efeitos inflamatórios. Foram observados efeitos antitumorais dos fitosteróis, mais concretamente de β -sitosterol em células cancerígenas provenientes do cancro da próstata. Verificou-se que o β -sitosterol diminuía o crescimento e induzia a apoptose das células. O β -sitosterol também evidenciou efeito benéfico no tratamento de hiperplasia prostática de natureza benigna. (Boskou, 2009). Os mesmos autores encontraram indícios que também o β -sitosterol exerce efeitos no cancro do cólon e da mama *in vitro*.

4.3.3. Álcoois Terpénicos

Os álcoois terpénicos encontram-se localizados sobretudo no epicarpo do fruto. Também designados de triterpenos pentacíclicos, o eritrodíol (homo-olestranol, 5-olean-12-ene-3 β ,28-diol) e uvaol (Δ 12-ursen-3 β ,28-diol) (figura 5) são os compostos mais representativos desta fracção (Bianchi *et al.*, 1992). Apesar de estes compostos se encontrarem no azeite virgem extra, os respectivos teores são mais expressivos no óleo de bagaço de azeitona (Cañabate-Díaz *et al.* 2007).

Os compostos triterpénicos possuem propriedades antioxidante e antitumorais (Allouche *et al.*, 2010). Para além disso o eritrodíol e o uvaol exibem um efeito protector sobre o DNA contra a acção do peróxido de hidrogénio (Allouche *et al.*, 2011).

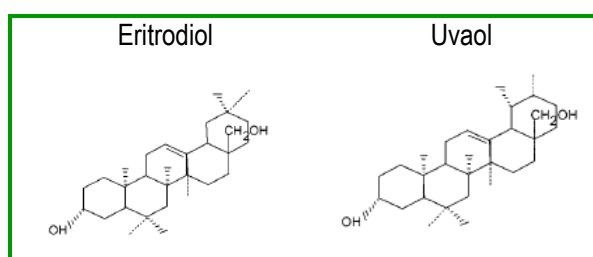


Figura 5 - Estrutura química dos dois álcoois triterpénicos mais representativos do óleo de bagaço de azeitona (Ramirez *et al.*, 2006)

Rodriguez-Rodriguez *et al.* (2006) investigaram a acção dos álcoois triterpénicos presentes no óleo de bagaço de azeitona, no vaso-relaxamento induzido da aorta em ratos com hipertensão espontânea *in vitro*. Verificaram que os triterpenos eritrodíol e uvaol induzem o vaso-relaxamento mas que o efeito se encontra dependente da concentração.

5. EXTRACÇÃO DE COMPOSTOS BIOACTIVOS

O sector dos ingredientes funcionais representa uma das áreas de maior crescimento num segmento de mercado novo mas já instituído. Isto levou a que tecnologias de extracção convencionais fossem modificadas e novas tecnologias emergissem no sentido de se obter, a partir de fontes naturais, extractos puros e isentos de solventes. A extracção química é uma das técnicas de extracção mais antigas que se conhece e se utiliza, cujo objectivo não se prende só em remover e separar os compostos de interesse de fracções insolúveis de elevado peso molecular como também de outros compostos que possam interferir em etapas subsequentes do processo analítico. Contudo, na última década, a crescente preocupação relacionada com a qualidade e segurança alimentar em paralelo com regulamentos estritos sobre a utilização de solventes e os seus níveis residuais nos produtos, levou a que a indústria alimentar seguisse linhas de orientação relacionadas com a preferência por produtos naturais e obtidos por tecnologias “limpas”.

5.1. Processos Emergentes

Os processos emergentes, essencialmente de natureza física, surgem como alternativa aos processos convencionais de extracção que implica a utilização de solventes numa linha de trabalho acima do respectivo ponto de ebulição e que pode conduzir à termodegradação dos compostos de interesse. Entre os vários processos emergentes envolvidos em fenómenos de extracção citam-se as altas pressões hidrostáticas, ultrasons, pulsos de campo eléctrico e extracção por fluidos supercríticos.

5.1.1. Extracção Por Fluidos Supercríticos

5.1.1.1. Conceitos e Fundamentos

Em busca de alternativas menos poluentes surge uma tecnologia que recorre à manipulação das propriedades termodinâmicas de certos solventes inertes para o ambiente e para os compostos a extrair. A tecnologia por fluidos supercríticos aparece nesta sequência como primeira alternativa à extracção tradicional para extracção, fraccionamento e isolamento de compostos activos. Segundo Mukhopadhyay (2000), a descoberta da fase supercrítica, aconteceu em 1822 por de la Tour, contudo, só apenas há três décadas que o uso de fluidos supercríticos foi aceite como uma nova técnica de separação.

Designa-se por fluido supercrítico (FSC) uma substância que se encontra a uma temperatura e pressão acima dos seus valores críticos (T_C e P_C , respectivamente) não co-existindo uma região distinta de gás ou líquido acima do ponto crítico (figura 6).

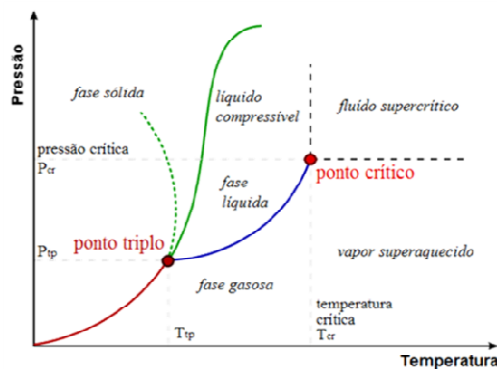


Figura 6 - Diagrama de fases de uma substância pura.

No estado supercrítico, os fluidos exibem propriedades físico-químicas intermédias entre os gases e líquidos. Isto permite que os fluidos supercríticos consigam dissolver compostos que são fracamente dissolvidos por um gás ou líquido.

Os fluidos supercríticos possuem propriedades que os tornam atractivos em processos de extracção porque possuem (Pereda, *et al.*, 2007; Dean, 2009):

- Poder de dissolução variável (possui propriedades intermédias entre os gases e os líquidos);
- Elevada difusividade (facilita a penetrabilidade do fluido e consequente transferência de massa na matriz vegetal);
- Baixa viscosidade, próxima dos gases (permite um escoamento apropriado do fluido e consequente transferência de massa);
- Tensão superficial mínima (facilita a penetrabilidade do fluido no interior de matrizes pouco porosas);
- Densidade semelhante à dos líquidos (favorece a interacção entre solvente e compostos a extrair da matriz);

Outras propriedades que tornam este tipo de extracção tão atractiva prendem-se com a elevada selectividade, tempos de extracção mais curtos, potencial redução de etapas de processamento e melhoramento da qualidade do produto.

Este poder de dissolução é influenciado pela densidade, que por sua vez, se encontra dependente do binómio temperatura/ pressão. Os constituintes dissolvidos no fluido supercrítico podem ser separados fazendo variar adequadamente as condições de pressão e temperatura (Ribeiro *et al.*, 2007).

O princípio básico de uma extracção por fluido supercrítico reside na difusão do solvente pela matriz vegetal, quando aquecido e pressurizado, dissolvendo e transportando os compostos a extrair para fora da matriz (Dean, 2009). Em termos práticos, trata-se de um método de separação baseado no poder de dissolução dos fluidos supercríticos, que é controlado unicamente com pequenas variações de pressão e temperatura.

5.1.1.2. Factores que afectam a extracção por fluidos supercríticos

É fundamental compreender as propriedades termodinâmicas e parâmetros de transferência de massa envolvidos numa extracção por fluidos supercríticos em matrizes biológicas, estruturalmente complexas, de forma a otimizar o processo de extracção e por conseguinte maximizar a quantidade extractada dos compostos de interesse. Os vários factores que afectam a extracção de compostos de valor acrescentado por fluidos supercríticos são os seguintes:

- Solubilidade dos compostos bioactivos em função da temperatura e pressão de extracção;
- Transferência de massa ou coeficientes de difusão dos compostos bioactivos nos fluidos supercríticos;
- Escolha da temperatura e pressão de extracção assim como pH, e velocidade superficial do fluido;
- Tamanho de partícula da matriz e morfologia (flocos, grãos, etc.);
- Teor de humidade da matriz;

A transferência de massa e a solubilidade dos compostos bioactivos nos fluidos supercríticos são influenciados pela temperatura, pressão, pH e velocidade superficial. Em processos de extracção por CO₂ supercrítico a pressão desempenha um papel dominante, contudo, a aplicação de velocidades superficiais de CO₂ elevadas conduz à compactação da matriz no extractor que resulta em passagens preferenciais do fluido ao longo da matriz, condicionando toda a extracção.

O teor de humidade e o tamanho de partícula também condicionam o rendimento de extracção. De uma maneira geral, a redução do tamanho de partícula aumenta a eficiência de extracção de compostos bioactivos por CO₂ supercrítico. Nagy e Simandi (2008) estudaram o efeito do teor de humidade e do tamanho de partícula na extracção supercrítica dos compostos bioactivos da paprika. Verificaram que um teor de humidade superior 18% e tamanho de partícula superior a 0,7 mm reduziu o rendimento de extracção dos compostos pretendidos.

Vários são os solventes com aplicabilidade em tecnologia supercrítica, contudo, de entre eles, apenas alguns são recomendáveis para a obtenção de produtos com fins alimentares, nomeadamente o etanol, água e o dióxido de carbono (Shi *et al.*, 2007). No entanto, de todos os fluidos supercríticos é o dióxido de carbono que se destaca.

5.1.1.3. Dióxido de carbono como fluido supercrítico

O dióxido de carbono tem a particularidade de apresentar uma baixa toxicidade, temperatura e pressão críticas baixas, elevada aplicabilidade em diversas áreas o que faz dele a melhor alternativa relativamente a outros fluidos supercríticos.

A molécula de CO₂ é apolar, ou seja, não possui momento dipolar, e quando se encontra no seu estado supercrítico também o é o que o torna tão bom solvente na extracção de compostos igualmente de natureza apolar (Mukhopadhyay, 2000). Contudo, e de acordo com o mesmo autor, o facto de possuir quatro pares de electrões não ligantes consegue dissolver substancias fracamente polares ou com alguma polaridade a pressões muito elevadas (superior a 250 bar).

Não obstante, de Valle & Aguilera (1988), constataram que para compostos de elevado peso molecular tais como os polissacáridos, aminoácidos, açúcares, proteínas, sais inorgânicos e flavonoides são relativamente insolúveis no CO₂ supercrítico.

5.1.1.3.1. Vantagens do CO₂ Como Fluido Supercrítico

O dióxido de carbono reúne propriedades que torna, relativamente aos outros, o mais qualificado na execução de trabalhos de investigação e nas diversas indústrias de extracção e este facto deve-se às inúmeras vantagens que apresenta (Mukhopadhyay, 2000; Shi *et al.*, 2007; Dean, 2009) nomeadamente:

- Pressão crítica moderada (73.8 bar);
- Temperatura crítica baixa (31.1°C);
- Toxicidade e reactividade baixa;
- Elevada pureza a baixo custo;
- Conveniente para extracções a operar a temperaturas inferiores a 150 °C;
- Ideal na extracção de compostos termolábeis;
- Ideal na extracção de compostos não polares (exemplo: alcanos);
- Extracção razoável de compostos com polaridade moderada (exemplo: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e bifenil policlorado (PCBs));
- Pode ser libertado directamente para a atmosfera;
- Pouca oportunidade para degradação na ausência de luz ou ar;
- Sendo um gás à temperatura ambiente, pode ser directamente acoplado a um cromatografo gasoso (GC) ou a uma instalação de extracção supercrítica;
- Tempos de extracção curtos e elevado rendimento de extracção.

5.1.1.3.2. Adição de co-solvente

A grande desvantagem na utilização do CO₂ como fluido supercrítico prende-se com a sua natureza não polar o que significa que não favorece a extracção de compostos de natureza polar. No entanto, esta limitação pode ser ultrapassada, adicionando um solvente orgânico polar.

É portanto, usual adicionar-se ao fluido supercrítico um composto orgânico – *co-solvente* – numa concentração de 1 a 5% mol e de volatilidade intermédia entre o fluido e os compostos a extractar, de modo a alterar as características do fluido em termos de polaridade e de interacções específicas sem modificar significativamente a densidade e compressibilidade do fluido supercrítico (Mukhopadhyay, 2000).

5.2. Extracção Supercrítica do Óleo De Bagaço De Azeitona

Os primeiros estudos sobre a aplicação da extracção por CO₂ supercrítico no bagaço de azeitona, em Portugal devem-se a Esquível (1994). O rendimento em óleo no bagaço de azeitona pode atingir os 21,7% e este óleo residual, é normalmente extractado por n-hexano e posteriormente refinado para ser utilizado para consumo humano (Esquível *et al.*, 1994 *cit. in* Mukhopadhyay, 2000). Os mesmos autores verificaram que a extracção por CO₂ supercrítico pode ser uma alternativa na recuperação do óleo de bagaço de azeitona. de Lucas *et al.* (1998) *cit. in* Mukhopadhyay, (2000), observaram que o rendimento de extracção aumenta com o aumento da pressão e para 350 bar a 60 °C obtendo uma recuperação de 90% em 3 - 4 horas de extracção para um tamanho de partícula médio de 0,17 mm.

A extracção supercrítica usando CO₂ é uma alternativa às técnicas convencionais de extracção e adequada para material biológico vegetal como o *bagaço de azeitona*. Como já referido na revisão bibliográfica, para além de inúmeras vantagens, trata-se de uma metodologia que permite trabalhar a temperaturas moderadas, não é tóxico e facilmente é separado do extracto ajustando os parâmetros pressão/temperatura.

6. MICROENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS BIOACTIVOS

Novos alimentos funcionais são constantemente desenvolvidos pelas industriais alimentar e de bebidas e colocados no mercado com o sentido de reforçar ou adicionar nutrientes e compostos bioactivos como vitaminas, minerais, antioxidantes, ácidos gordos ricos em ómega 3, extractos de plantas, prebióticos e probióticos e enriquecimento em fibras. Muitos destes ingredientes apresentam susceptibilidade à degradação e/ou podem interagir com outros componentes da matriz, conduzindo a uma perda na qualidade do alimento funcional. Uma forma de contornar este problema é o de isolar os compostos bioactivos do meio envolvente. O microencapsulamento é uma via para promover esse isolamento uma vez que os compostos activos são como que envolvidos exteriormente por um material secundário que depois será introduzido nos produtos alimentares (Sanguansri & Augustin, 2010).

Tecnologias de encapsulamento e libertação controlada sofreram um crescimento exponencial nas últimas duas décadas. A indústria farmacêutica foi pioneira e responsável por estes avanços e apenas recentemente foi adoptada e aplicada na indústria alimentar. Muita investigação tem sido feita no âmbito de encapsulamento e técnicas de libertação controlada, contudo, quando aplicados a sistemas reais, isto é, na introdução dos produtos alimentares e acção no organismo pouco se sabe sobre os seus mecanismos de acção.

6.1. Definição e Conceitos

O microencapsulamento é um processo que permite que compostos sensíveis possam ser fisicamente retidos numa matriz homogénea ou heterogénea conferindo-lhes protecção (Beirão-da-Costa *et al.*, 2011).

A microcápsula é frequentemente referida na literatura como invólucro, membrana, parede, revestimento, matriz, agente encapsulante. O conteúdo a proteger apresenta igualmente várias designações entre elas, recheio, carga, agente activo, composto activo, ou “core” do inglês. Na verdade, o material encapsulado pode estar distribuído ou incrustado numa massa mais ou menos contínua referente ao agente encapsulante ou fazer parte de um complexo molecular. De acordo com Desai & Park (2005), também é possível produzir microcápsulas com várias substâncias activas introduzidas numa mesma matriz (figura 7).

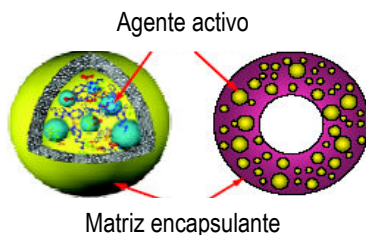


Figura 7 - Representação esquemática do encapsulamento de substâncias (Fonte: Soottitantawat, 2005).

Este mecanismo evita que interacções indesejáveis entre o composto activo e os constituintes do alimento ou a que reacções químicas possam conduzir à degradação do composto activo com consequências indesejáveis no sabor, odor ou efeitos negativos para a saúde (Sanguansri & Augustin, 2010).

Teoricamente, qualquer composto (ácidos, lípidos, enzimas, microrganismos, aromas, adoçantes, vitaminas, minerais, água, colorantes e sais) que necessite de ser protegido, isolado ou libertado controladamente no meio pode ser encapsulado (Duarte, 2006).

Um dos desafios da engenharia alimentar consiste em conceber o microencapsulamento de um composto activo em particular não esquecendo o fim para que é destinado. De acordo com (Sanguansri & Augustin, 2010), é necessário o conhecimento de: (1) composto bioactivo; (2) os materiais encapsulantes apropriados; (3) interacções entre o composto bioactivo, a matriz e o ambiente; (4) a estabilidade do composto microencapsulado em armazenamento e quando incorporado no produto alimentar; (5) e os mecanismos de libertação controlada do composto bioactivo.

A estrutura molecular do composto activo normalmente é conhecida, contudo a forma como o composto activo interacciona com o alimento, o destino depois de consumido, o local de acção caso se trate de um bioactivo e a sua função no organismo depois de ingerido pode ainda não estar esclarecido (de Vos *et al.*, 2006).

O micro encapsulamento encontrou, deste modo, uma grande aplicabilidade em diversas áreas, nomeadamente em farmácia, nas indústrias alimentar, do papel, perfumaria e cosmética, e em áreas de menor aplicação como na produção de lubrificantes e pesticidas (Reineccius, 1995).

6.2. Matrizes Encapsulantes

Existem disponíveis no mercado uma grande variedade de materiais susceptíveis de serem usados como matrizes encapsulantes mas as escolhas mais frequentes recaem sobre os amidos modificados, as maltodextrinas, as gomas, as proteínas e os açúcares (quadro 3). A selecção da matriz depende muito da composição química do material a encapsular, do método de encapsulamento, das características desejadas da microcápsula e da sua aplicação industrial. Outras considerações envolvem, por exemplo, o custo de produção (Westing *et al.*, 1988).

As matrizes devem proteger os compostos activos da oxidação, luz, humidade e de outras substâncias presentes no sistema, mascarar sabores, aromas e odores, retardar a libertação dos compostos activos, impedir a saída de componentes voláteis, possuir a capacidade de incorporar o composto activo em formas que possibilitem o seu fácil manuseamento e introdução na produção de alimentos (King *et al.*, 1976).

Quadro 3 -Classes de materiais utilizados como matrizes encapsulantes no encapsulamento de ingredientes alimentares (Fonte: Desai & Park, 2005).

Classe	Matriz	Métodos de encapsulamento aplicáveis
Glúcidos	Amido, maltodextrinas, amidos modificados, sacarose, ciclodextrinas	Atomização, extrusão, coacervação, inclusões complexas
Celulose	Carboximetilcelulose, metilcelulose, etilcelulose, nitrocelulose, acetilcelulose	Coacervação, atomização, filmes comestíveis
Gomas	Goma acácia, agar, alginato de sódio, carragenina	Atomização, método da seringa (<i>gel beads</i>)
Lípidos	cera, parafina, cera de abelha, diacilglicerol, óleos, ácidos gordos	Emulsão, formação de filmes
Proteínas	Glúten, caseína, gelatina, albumina, hemoglobina, péptidos	Emulsão, atomização

6.2.1. Requisitos Gerais de uma Matriz Encapsulante

Propriedades como permeabilidade, estabilidades térmica e mecânica, e estabilidade para com as substâncias a encapsular são características essenciais para a eficiência de encapsulamento. Contudo, nenhuma matriz compreende todas as propriedades em simultâneo, sendo o mais frequente proceder a modificações químicas (adicionando antioxidantes, agentes quelantes e surfactantes) nas matrizes já existentes de forma a alterar as suas propriedades iniciais, reflectindo-se num melhoramento das propriedades físicas e mecânicas (Desai & Park, 2005).

De acordo com Pegg & Shahidi (1999) e Desai & Park (2005), para que se verifiquem estas condições, uma matriz ideal deve possuir as seguintes características:

- Boas propriedades reológicas, que se traduz numa baixa viscosidade, a altas concentrações de modo a facilitar o processo de encapsulamento;
- Boa capacidade para dispersar e emulsionar as partículas e estabilizar a emulsão produzida;
- Não ser reactivo com as substâncias a encapsular tanto durante o processo como no armazenamento;
- Capacidade para selar e manter a substância na sua estrutura durante o processo e armazenamento;

- Capacidade para libertar completamente o solvente ou outras substâncias usadas durante o processo de encapsulamento;
- Capacidade de protecção máxima ao encapsulado contra condições ambientais (e.g. oxigénio, calor, luz, humidade);
- Solúvel em solventes usados na indústria alimentar (e.g. água, etanol);
- Qualidade alimentar e baixo custo.

Os materiais escolhidos como agentes encapsulantes devem ser ainda formadores de filmes, flexíveis, inodoros, insípidos e não higroscópicos. Solubilidade em meio aquoso ou noutro solvente e/ou exibir uma fase de transição como, fusão ou gelificação são por vezes, requisitos desejáveis e que estão dependentes do composto activo e de quando for incorporado no produto alimentar. Outros aditivos como emulsionantes, plastificantes ou anti-espumas, são por vezes adicionados à formulação para afinar as características finais do produto final (Sanguansri & Augustin, 2010).

6.2.1.2. A Inulina como Matriz Encapsulante

6.2.1.2.1. Caracterização estrutural e físico-química

A inulina é uma fructana, também designada por fruto-oligossacárido, um termo amplo que compreende todos os oligossacáridos indegestíveis que contém frutose na sua estrutura. Do ponto de vista estrutural, a inulina é composta por uma cadeia de frutose podendo ou não ser terminada por uma unidade D-glucose (Figura 8). O número de unidades de frutose ligadas a uma unidade de glucose terminal varia de 2 até mais de 60 unidades, ligadas exclusivamente por ligações β (2 \rightarrow 1) (Baynast & Renard, 1994).

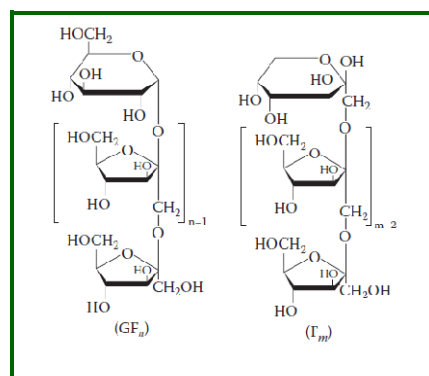


Figura 8 - Estrutura química da inulina

Os diferentes tipos de inulina podem ser classificados de acordo com o grau de polimerização (GP). O GP exprime o número total de unidades de frutose e glucose (Blecker *et al.*, 2001). O GP da inulina, assim como a presença de ramificações, determinam as propriedades tecnológicas e funcionais da inulina. A inulina de origem

vegetal é geralmente pouco ramificada (1-2%) e com GP inferior a 200. Já a inulina de origem bacteriana é muito ramificada ($\geq 15\%$) e com GP da ordem dos 10 000 – 1 000 000 (Franck & Leenheer, 2002).

A inulina ocorre em muitas plantas sobretudo como fonte de reserva. Está especialmente presente nas plantas pertencentes à família das Liliacea (alho-francês, cebola, alho e espargos), e na família das Compositae (tupinambo, chicória) (Franck & Leenheer, 2002). Para além de ser uma fonte de reserva, duas funções geralmente citadas são: a crioprotecção, e regulação osmótica, permitindo a sobrevivência e o crescimento da planta sob condições de escassez de água induzidas pela seca ou por baixas temperaturas. Durante o período de seca, consideráveis quantidades de glucose, frutose e inulina são encontradas nas raízes e folhas (de Roover *et al.*, 2000). No inverno, a inulina da chicória é hidrolisada, do que resulta num decréscimo das fracções GP enquanto aumenta a frutose livre, que é osmoticamente mais activa que a inulina nativa.

A inulina é moderadamente solúvel em água (máximo de 10% à temperatura ambiente). Em solução apresenta uma viscosidade relativamente baixa (1,65 mPa.s a 10 °C para uma solução de 5% de teor de sólidos e de 100 mPa.s para 30% teor de sólidos) (Frank & Bosscher, 2009). Em meios ácidos, as ligações β (2-1) entre as unidades de frutose podem parcialmente hidrolisar. A frutose é formada neste processo sendo mais pronunciado para níveis de pH baixo, temperatura elevada. A inulina é estável para pH superior a 4. Mesmo para valores de pH baixos a hidrólise de inulina pode ser limitada até 10%, se os produtos tiverem teor de humidade superior a 70%, forem acondicionados a uma temperatura inferior a 10 °C ou tiverem estado sujeitos a um tempo de conservação curto. Para elevadas concentrações (superior a 25% em água para a inulina nativa e maior que 15% para inulina de cadeia longa) a inulina apresenta propriedades de gelificação. A inulina nativa é ligeiramente doce (10% de poder adoçante quando comparado com a sacarose) enquanto a inulina de cadeia longa não apresenta poder adoçante (Frank & Bosscher, 2009).

A inulina também melhora a estabilidade de espumas e emulsões de algumas sobremesas, gelados, molhos e outros. A inulina tem um papel importante na indústria alimentar por ser considerada uma fibra dietética mas também por ser um agente espessante e substituto de lípidos e açúcares (Ronkart *et al.*, 2010). A inulina encontra-se comercialmente disponível na forma de pó, pelo que também foi proposta como excipiente para estabilização proteica para a indústria farmacêutica (de Jonge *et al.*, 2007).

À escala comercial é extraída principalmente das raízes da chicória. É um produto com baixos custos de produção por se encontrar disponível sob a forma de um pó branco resultante do processo de secagem utilizado ser a atomização (Ronkart *et al.*, 2009).

6.2.1.2.2. Propriedades nutricionais

A inulina tem uma vasta aplicabilidade na indústria alimentar não só pelas suas propriedades tecnológicas mas também porque apresenta benefícios nutricionais importantes fazendo deste fruto-oligossacárido um ingrediente

funcional único. Devido à sua estrutura química (ligações β (1-2)) que as enzimas digestivas humanas não conseguem hidrolisar, a inulina passa por todo o sistema digestivo sem ser alterada. Cerca de 90% da inulina ingerida chega ao cólon e é completamente metabolizada pela microflora intestinal. Mesmo ingerindo uma dose elevada não foi detectada nas fezes uma quantidade significativa de inulina (Roberfroid, 1993).

Uma vez que os fruto-oligossacáridos não são absorvidos, crê-se que muitos dos seus efeitos benéficos na saúde advêm da sua actividade prebiótica exercida no cólon. Os fruto-oligossacáridos são fermentados no cólon pela microflora residente promovendo o crescimento e desenvolvimento de bactérias benéficas em detrimento das bactérias prejudiciais. Dentro do grupo dos fruto-oligossacáridos, a inulina é a principal fruto-fibra e considerada como ingrediente funcional (Marinangeli & Jones, 2010).

Apresenta um baixo valor calórico e é completamente convertida sobretudo em ácidos gordos de cadeia curta (acetato, proprienato e butirato), lactato, biomassa bacteriana e gases (Frank & Bosscher, 2009).

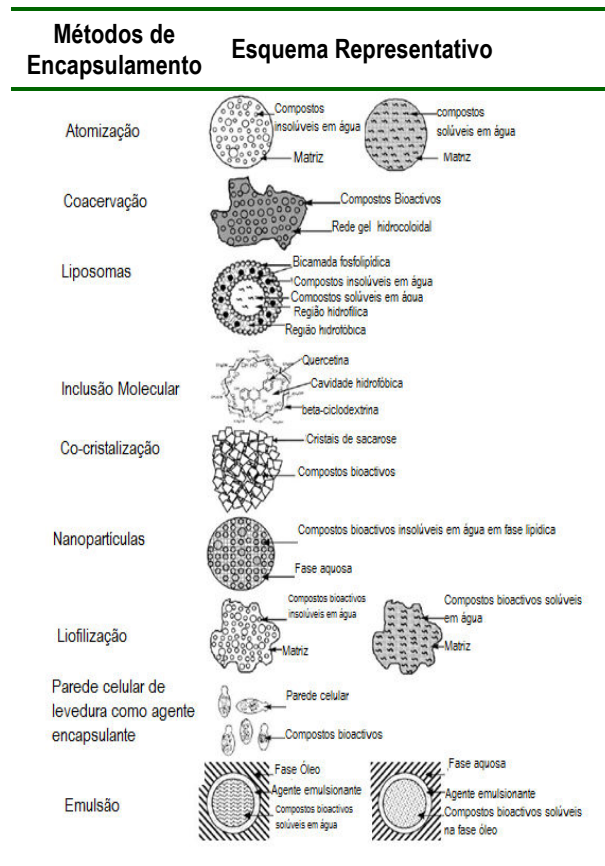
6.2.1.2.3. Capacidade de formação de cápsulas

A utilização da inulina como matriz encapsulante de compostos bioactivos é relativamente recente. Barreiros (2009) e Beirão-da-Costa *et al.* (2011) estudaram a viabilidade da utilização da inulina como agente encapsulante tendo sido usado como modelo o óleo essencial (OE) de orégão. Foi possível concluir da eficiência do encapsulamento na matriz de inulina que paralelamente (Duarte *et al.*, 2011) foram também efectuados estudos de encapsulamento em inulina de extractos ricos em licopeno proveniente de repiso de tomate.

6.3. Processos de Encapsulamento

O encapsulamento de ingredientes alimentares em matrizes pode ser conseguido mediante vários processos. A selecção do processo de micro encapsulamento é baseada, tendo em conta as propriedades físicas e químicas da substância activa e da matriz e a sua aplicação. Estas microcápsulas podem atingir várias dimensões, desde micrómetros até milímetros e apresentarem uma grande variedade de formas consoante os métodos e materiais usados para as produzir (Desai & Park, 2005) (quadro 4).

Quadro 4 -Métodos de encapsulamento de compostos bioativos e esquemas representativos (adaptado de Fang & Bhandari, 2010)



A escolha do processo de micro encapsulamento baseia-se em vários parâmetros tais como: tamanho médio desejado das partículas, propriedades físico-químicas do núcleo e do revestimento, aplicações do material micro encapsulado, mecanismos de libertação desejados, escala de fabrico industrial e os custos de processo (Santos, 2005). No quadro 5 apresentam-se de forma sucinta diferentes processos de encapsulamento e formas de utilização.

Quadro 5 –Alguns métodos de encapsulamento aplicados na indústria alimentar (Fonte: Madene *et al.*, 2006).

Métodos de encapsulamento	Forma	Aplicações
Atomização	Material pulverulento	Produtos de confeitaria, leite em pó, sobremesas instantâneas, produtos aromáticos, bebidas instantâneas
Coacervação	Pasta/material pulverulento/cápsulas	Pastilhas elásticas, pasta de dentes, alimentos processados termicamente
Leito fluidizante	Material pulverulento/grânulos	Pratos preparados, produtos de confeitaria
“Spray cooling/chilling”	Material pulverulento	Pratos preparados, gelados
Extrusão	Material pulverulento/grânulos	bebidas instantâneas, produtos de confeitaria, chás
Inclusão Molecular	Material pulverulento	Produtos de confeitaria, bebidas instantâneas, snacks extrudidos

Os processos de encapsulamento podem ser englobados em dois grupos:

Processos Mecânicos: Atomização, “*spray chilling/cooling*”, leito fluidizante, extrusão.

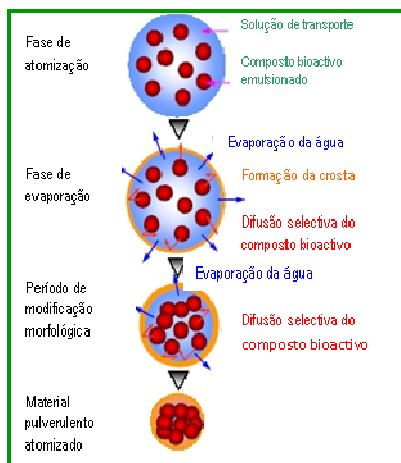
Processos Químicos: Coacervação, inclusão molecular

Por ser o mais amplamente utilizado e por ser o método utilizado neste trabalho descreveremos apenas o processo de atomização.

6.3.1. Processo de Atomização

Secagem por atomização, ou do inglês “*spray-drying*”, é sem dúvida o método de encapsulamento mais utilizado na Indústria Alimentar principalmente pelas inúmeras vantagens que apresenta, nomeadamente, o baixo custo de produção, variedade de matrizes encapsulantes, boa retenção de compostos voláteis, boa estabilidade dos encapsulados e produção em larga escala em modo contínuo (Reineccius, 1988; Desobry & Debeaufort, 2011).

É por definição a transformação de produtos no estado líquido em partículas sólidas por meio de uma operação de secagem a quente. O processo de encapsulamento por atomização envolve: a formação de uma emulsão ou suspensão contendo o material que servirá de matriz e a substância a encapsular; a nebulização da emulsão no interior de uma câmara de secagem por circulação de ar seco e quente; a evaporação da água presente nas gotículas da emulsão e retenção da substância a encapsular na matriz encapsulante.



A suspensão ou emulsão formada, é bombeada para a câmara de atomização do secador, na qual se transforma num aerossol de finas gotículas que quando entram em contacto com o ar quente, gerado no interior da câmara de secagem perde a água conduzindo à solidificação do material de transporte e subsequentemente ao aprisionamento do composto a proteger no seu interior (Tuley, 1996) (figura 9).

Figura 9 - Etapas do micro encapsulamento de aromas por atomização. (Fonte: Soottintawat, 2005).

Apresenta-se todavia como desvantajoso em materiais termosensíveis pela utilização de temperaturas elevadas e produz um pó muito fino (10 – 100 μm de diâmetro) que por vezes necessita de sofrer aglomeração (Desobry & Debeaufort, 2011). As matrizes encapsulantes possuem ainda uma certa permeabilidade, podendo

sujeitar os compostos encapsulados a fenómenos de oxidação, levando a perdas dos componentes voláteis e diminuição da estabilidade durante o armazenamento, reduzindo os seus tempos de vida útil (Reineccius, 1988), para além de apenas se conseguir reter cerca de 20-30 % de substâncias activas.

6.4. Mecanismos de Libertação Controlada

Uma substância presente num alimento pode ser libertada aquando do consumo ou ser impedida de se difundir durante as diversas operações de processamento (exemplos: aromas, nutrientes). Em processo similar, um aditivo pode ser libertado numa etapa específica do processamento, mas estar protegido nas etapas subsequentes (exemplos: ácidos, agentes levedantes, agentes de ligações cruzadas) (Karel & Langer, 1988).

Segundo Risch (1995), algumas metodologias de encapsulamento permitem que determinada substância activa possa ser libertada lentamente ou ser libertada num momento específico. O microencapsulamento é portanto, uma solução lógica na introdução dos compostos activos em alimentos funcionais, protegendo-os durante o trânsito digestivo e aumentando a respectiva biodisponibilidade quando libertados num ponto estratégico do corpo. Apresenta outras vantagens, nomeadamente dosagens mais reduzidas durante a formulação resultando num menor custo de produção (Sanguansri & Augustin, 2010).

De acordo com de Roos (2006), os factores que controlam a retenção e libertação das substâncias activas são essencialmente a volatilidade dos seus componentes (factor termodinâmico) e a resistência à transferência de massa (factor cinético). Consequentemente, a substância activa é libertada do sistema controladamente por difusão, biodegradação, intumescimento ou por pressão osmótica (Pothakamury & Barbosa-Cánovas, 1995).

As vantagens que advêm da existência de uma libertação controlada são as seguintes (Pothakamury & Barbosa-Cánovas, 1995):

- Os ingredientes activos são libertados a taxas controladas por períodos prolongados de tempo;
- As perdas de ingredientes tais como vitaminas e minerais podem ser evitadas ou diminuídas durante o processamento e cozedura;
- Os componentes reactivos ou incompatíveis podem ser separados.

Quando se trata de alimentos processados termicamente, o maior perigo reside na perda de aroma, devido à volatilização dos componentes voláteis. Para controlar este problema, é essencial que depois do processamento térmico haja uma concentração ainda elevada de aroma no produto para que aquando da ingestão a libertação do aroma não esteja comprometida (de Roos, 2006). Por exemplo, uma baixa volatilidade é exigida quando se pretende uma capacidade de retenção elevada durante o processamento térmico, enquanto que se exige uma volatilidade elevada para que se tenha também uma intensidade de aroma elevada, de modo a ser perceptível quando ingerido (de Roos & Mansencal, 2003 *cit. in* de Roos, 2006). Daí uma vantagem sobre a aplicabilidade

do encapsulamento como meio de protecção dos aromas quando são introduzidos em produtos que serão processados termicamente. Face a isto, o encapsulamento deve melhorar a capacidade de retenção do aroma durante o processamento térmico, sem que afecte, de modo adverso, a sua libertação durante a ingestão do produto. Outro facto a ter em conta é a capacidade de retenção e/ou libertação, que se não for verificado, não faz sentido aplicar esta metodologia (de Roos, 2006).

Os principais factores que afectam a migração dos compostos activos encapsulados são a concentração do composto encapsulado, peso molecular, solubilidade, difusividade, coeficiente de partição entre o polímero e o alimento, tempo, temperatura, polímero e composição do alimento, e estrutura (densidade, cristalinidade, cadeias ramificadas) (Desobry & Debeaufort, 2011).

Em termos quantitativos, a taxa de difusão, também designada por coeficiente de difusão ou difusividade, é determinada segundo o modelo teórico clássico baseado na lei de Fick e expresso em m^2s^{-1} (Desobry & Debeaufort, 2011).

Num sistema homogéneo, a difusão é definida como sendo a quantidade de massa transferida (R) perpendicularmente, por unidade de área e de tempo e que é proporcional ao gradiente de concentração (equação 1).

$$R = \frac{dM}{A dt} = -D \frac{dC}{dx} \quad \text{Equação 1}$$

onde D corresponde ao coeficiente de difusão (m^2s^{-1}); A é a área (m^2); C corresponde à concentração (gm^{-3}), t o tempo (s) e x corresponde à espessura do filme ou revestimento (m). A quantidade de composto que se encontre revestido ou encapsulado e que migre do respectivo sistema para o meio (alimento sólido ou líquido) depende das propriedades físico-químicas do alimento e polímero (Desobry & Debeaufort, 2011).

III - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

Este capítulo contempla toda a actividade experimental desenvolvida, organizada em 3 sub-capítulos:

1. Caracterização e Selecção do Bagaço de Azeitona

Nesta fase procedeu-se a uma caracterização preliminar de bagaços de 3 variedades diferentes com o objectivo de seleccionar o material mais interessante para a extracção de compostos bioactivos. Os ensaios preliminares basearam-se sobretudo na caracterização da fracção lipídica, em termos de rendimento bruto, composição em ácidos gordos totais e fitosteróis.

2. Extracção de Compostos Bioactivos do Bagaço de Azeitona por CO₂ Supercrítico

Após selecção do bagaço de azeitona a utilizar, as condições de extracção por CO₂ supercrítico foram delineadas em 2 fases. Numa primeira fase avaliou-se a eficiência da extracção supercrítica para um determinado valor de pressão e temperatura e a influência de um pré-tratamento nas mesmas condições. O pré-tratamento consistiu numa pré-pressurização da amostra, durante 1 hora, antes de começar a extracção propriamente dita. Na segunda fase, estudou-se a influência do teor de humidade do bagaço de azeitona na eficiência de extracção supercrítica e caracterização dos extractos resultantes.

3. Encapsulamento dos Compostos Bioactivos do Bagaço de Azeitona

Nesta fase, procurou-se estudar a viabilidade do encapsulamento por atomização, do extracto do bagaço de azeitona mais interessante em termos de bioactividade, em matriz de inulina. Extracto obtido por extracção convencional foi igualmente encapsulado em matriz de inulina para comparação e validação dos processos de extracção e encapsulamento face aos objectivos traçados no ponto 1.

1 - Caracterização e Selecção do Bagaço de Azeitona

1.1. Material e Métodos

1.1.1. Material Vegetal

Foram recepcionados dois bagaços de azeitona da cultivar *Arbosana* (provenientes de duas extracções consecutivas) e um bagaço de cada cultivar - *Arbequina* e *Koroneiki*, todos resultantes do sistema de extracção de duas fases da indústria *Elaia- Grupo Sovena*.

Os bagaços de azeitona foram acondicionados em câmara frigorífica até à data de utilização.

1.1.2. Reagentes

- Éter de petróleo 40-60°C (*Fisher Scientific*)

1.2. Métodos

1.2.1. Determinação do Teor de Humidade

O teor de humidade dos quatro tipos de bagaço de azeitona foi determinado em estufa, a 100-105°C, até peso constante. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

1.2.2. Caracterização dos Extractos Lipídicos do Bagaço de Azeitona obtidos com Éter de Petróleo

Os bagaços de azeitona foram sujeitos a uma extracção em aparelho de soxhlet utilizando éter de petróleo como solvente, segundo o método interno praticado pelo laboratório acreditado L.E.T. (Laboratório de Estudos Técnicos) baseado na Norma Portuguesa NP-2568. A metodologia encontra-se descrita no anexo 1. Os compostos presentes no extracto lipídico foram quantificados por técnicas cromatográficas realizadas também no L.E.T.

1.2.2.1. Quantificação dos Ácidos Gordos Totais

O teor e composição em ácidos gordos foram determinados nos extractos por cromatografia gás-líquido. O método adoptado para esta determinação assenta-se no que se encontra descrito no Regulamento (CE) nº 796/2002 com o anexo XB. As análises foram efectuadas no cromatógrafo *Perkin Elmer, auto system* nas seguintes condições cromatográficas:

- Temperatura do injector - 250 °C;
- Temperatura do detector - 260 °C
- Gás de arraste - 20 Psig;
- Volume de injeção – 0,5 µL

As condições de aquecimento do forno encontram-se descritas no quadro 6.

Quadro 6 – Condições de análise dos ácidos gordos totais por GC

Taxa de aumento de temperatura (°C/minuto)	Temperatura (°C)	Hold (minutos)
0,0	165	45
7,5	230	15

1.2.2.2. *Quantificação dos Fitosteróis*

Os extractos obtidos foram analisados por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar de modo a caracterizar e quantificar os fitosteróis do bagaço de azeitona. O método adoptado para esta determinação assenta-se no que se encontra descrito no Regulamento (CEE) nº 2568/91 com o anexo V. As análises foram efectuadas no cromatógrafo *Perkin Elmer, auto system* nas seguintes condições cromatográficas:

- Temperatura do injector - 320 °C;
- Temperatura do detector - 320 °C
- Temperatura do forno – 260 °C
- Gás de arraste - 20 Psig;
- Volume de injeção – 0,5µL
- Tempo de equilíbrio -0,5 minutos

2 - Extracção de Compostos Bioactivos do Bagaço de Azeitona por CO₂ Supercrítico

2.1. Materiais e Métodos

2.1.1. Material Vegetal

Face aos resultados obtidos na 1ª etapa, o delineamento experimental subsequente foi desenvolvido para o bagaço da 1ª extracção proveniente da variedade *Arbosana*, uma vez que foi a variedade cujo subproduto forneceu extractos mais ricos nos compostos pretendidos e com maior rendimento de extracção.

2.1.2. Reagentes

- Dióxido de Carbono 99,5% (m/m) de pureza (*Air Liquid*)
- Acetona (99,5%)
- Reagente de Folin-Ciocalteu (*Panreac*)
- Carbonato de Sódio Anidro (*Panreac*)
- Metanol (*Panreac*)

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação do Material

2.2.1.1. Liofilização do Material

O bagaço de azeitona foi liofilizado num liofilizador TELABE – J.D.F. LF.10/BFC.

2.2.1.2. Redução da Dimensão do Material por Moenda

Com o objectivo de homogeneizar o material e prepará-lo para as fases seguintes procedeu-se à moenda do bagaço de azeitona de 2 fases liofilizado, utilizando para tal um moinho de martelos, modelo SK100C, marca *Retsch* munido de uma malha com 1 mm de abertura de crivo.

2.2.2. Determinação da Granulometria

Após a moenda, o bagaço de azeitona foi classificado granulometricamente recorrendo a um peneiro vibratório, *Filtra*, constituído por uma sequência de crivos de malhas: 2 mm, 1mm, 0,5 mm, 0,355 mm, 0,032 mm, e colector.

2.2.3. Determinação do Teor de Humidade

Procedeu-se de forma semelhante à descrita no ponto 1.2.1.

2.2.4. Extracção por CO₂ Supercrítico

Com base nos estudos anteriores (Matias, 2008 e Almeida, 2009), delinearam-se condições de extracção conducentes aos melhores rendimentos em extracto e riqueza destes em compostos bioactivos. Desenvolveram-se ensaios em duas fases.

2.2.4.1. 1ª Fase (influência de um pré-tratamento)

Foram testadas dois tipos de condições. A condição (A), condição já utilizada por (Matias, 2008 e Almeida, 2009). A condição (B) foi definida com base na condição (A) mas introduzindo um pré-tratamento, caracterizado pela pressurização inicial do extractor carregado com bagaço de azeitona durante uma hora, antes da extracção propriamente dita. Traçaram-se curvas de extracção, em função do tempo, para ambas as condições. O quadro 7 sistematiza as condições e os parâmetros envolvidos nesta 1ª fase.

Quadro 7 -Delineamento experimental referente à extracção supercrítica do bagaço de azeitona da variedade *arbozana*

Condições	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Caudal	Tempo de Extracção (min)
*A	250	40	2 mL/min	1º ponto 30 min 2º ponto 60 min 3º ponto 60 min 4º ponto 60 min
B	250	40	2 mL/min	Pré-tratamento (60 min) 1º ponto 30 min 2º ponto 60 min 3º ponto 60 min 4º ponto 60 min

*(Matias, 2008 e Almeida, 2009).

2.2.4.2. 2ª Fase (influência o teor de humidade na composição dos extractos)

A 2ª fase teve como objectivo estudar a influência do teor de humidade na matriz vegetal, na extracção supercrítica de compostos hidrofílicos, nomeadamente os compostos fenólicos. O bagaço de azeitona, contendo inicialmente cerca de 4% de humidade foi re-hidratado para conter 10, 15, 20 e 40% de humidade. As extracções estabelecidas para a 2ª fase foram efectuadas mediante a condição de extracção (B) de forma contínua durante 210 minutos.

2.2.4.3. Descrição da Instalação e Obtenção dos Extractos

A instalação e/ou funcionamento da extracção supercrítica envolve 4 zonas: (1) compressão, (2) extracção, (3) descompressão e (4) recolha dos extractos.

A extracção supercrítica iniciou-se com o CO₂ a uma pressão de 60 bar (correspondente à pressão da garrafa) e foi comprimido por uma bomba de pistão mantida a temperaturas de 0 °C até à pressão de trabalho (250 bar). O extractor entretanto carregado com a amostra e previamente aquecido até à temperatura de extracção (40 °C), fica preparado para se iniciar a extracção. Cerca de 40 a 50 g de bagaço liofilizado e moído foram utilizados para os diversos ensaios de extracção por CO₂ supercrítico.

Os valores de pressão e temperatura, apresentados no quadro 8, permitiram a precipitação dos extractos nos vasos colectores. A recolha dos mesmos foi efectuada mediante sucessivas lavagens com acetona, de modo a arrastar os respectivos solutos. Os extractos supercríticos foram evaporados até à secura em evaporador rotativo *Heidolf VV2000* com banho de água *Heidolf WB200* a 30 °C de modo a facilitar a remoção da acetona.

Quadro 8 -Condições de recolha dos extractos

	Pressão (bar)	Temperatura (°C)
1º Colector	50	5
2º Colector	10	15

2.2.5. Caracterização dos Extractos Supercríticos, Bagaço e Bagaços Residuais

Os extractos provenientes quer da 1^a fase quer da 2^a fase, foram avaliados quanto à composição em ácidos gordos e esteróis tal como descrito no ponto 1.2.2.1 e 1.2.2.2. respectivamente. Todos os extractos supercríticos bem como o bagaço de azeitona e os bagaços residuais (bagaços resultantes da extracção por CO₂ supercrítico ao fim de 210 minutos), foram analisados em termos de polifenóis totais e composição em fenóis, nomeadamente em hidroxitirosol e tirosol. A quantificação dos polifenóis totais foi determinada recorrendo ao método colorimétrico Folin-Ciocalteu. A identificação e quantificação de hidroxitirosol e tirosol foram efectuada recorrendo ao HPLC-DAD-ED. A actividade antioxidante foi determinada de acordo com os métodos de ORAC e HORAC.

2.2.5.1. Determinação dos Polifenóis Totais

A determinação dos polifenóis totais foi feita recorrendo ao método colorimétrico adaptado por Almeida (2009) utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. O método de análise encontra-se descrito no anexo 2 para cada tipo de extracto considerado.

2.2.6. Identificação e Quantificação do Perfil em Polifenóis: Hidroxitirosol e Tirosol

A presença dos polifenóis hidroxitirosol e tirosol foi avaliada nos mesmos extractos que os considerados no ponto 2.2.5.1. por *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) acoplado a um detector de díodos (HPLC-DAD) (*Surveyor, Thermo Finnigan, San José, C.A., USA*). As separações foram efectuadas a 35°C com uma pré-coluna LiChrospher (5 m, d.i. 250 mm x 4 mm) RP-18 da *Merck* com uma pré-coluna com o mesmo enchimento. O injector de amostras foi mantido a 12°C e utilizou-se um *loop* de injeção de 20 µL para efectuar a injeção das amostras. A fase móvel consiste numa mistura de gradiente do eluente A (ácido fosfórico 0,1%) com o eluente B (ácido fosfórico – acetonitrilo – água 1:400:595, v/v/v), com um caudal de 700 µL/min (Almeida, 2009).

Para a confirmação da presença de hidroxitirosol e tirosol nos extractos foi acoplado, em série, ao HPLC-DAD um detector electroquímico (HPLC-DAD-ED). Os compostos foram quantificados recorrendo a um software de aquisição e tratamento de dados: *Chromquest (versão 4.0 - Thermo Finnigan, San José, C.A., USA)* (Almeida, 2009).

2.2.7. Avaliação da Capacidade Antioxidante

2.2.7.1. Método de ORAC

O método de ORAC, *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, mede a capacidade de certos compostos presentes nos extractos resgatarem o radical peróxido e consequentemente inibirem a oxidação da fluoresceína (fluoróforo utilizado). Os valores de actividade antioxidante são calculados a partir da perda de fluoresceína relativamente a um antioxidante padrão – Trolox (análogo hidrofílico da vitamina E) (Matias 2008). Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox (Capacidade Antioxidante em Equivalentes de Trolox - µM CAET).

O método experimental adoptado para a determinação da actividade antioxidante dos extractos aquosos e supercríticos (incluindo os que sofreram extracção por metanol) foi o de Almeida (2009) e encontra-se descrito no anexo 3.

2.2.7.2. Método de HORAC

O método de HORAC, *Hydroxyl Radical Advertising Capacity*, permite avaliar a capacidade dos extractos em inibir a produção do radical hidroxilo (HO•). Este método permite quantificar a capacidade que os extractos naturais têm para quelar iões metálicos reactivos, catalisadores de reacções de oxidação. De forma indirecta, é possível determinar a capacidade dos extractos em inibir a formação de radicais livres de hidroxilo recorrendo a uma

reação do “Tipo Fenton” entre um metal, Co(II), e o peróxido de hidrogénio, H₂O₂. O Co(II) e H₂O₂ ao reagirem formam espécies reactivas que oxidam o fluoróforo com o qual entram em contacto, neste caso a fluoresceína que na sua forma oxidada se torna incolor (Matias, 2008). Tal como no método de ORAC, a cinética da reação de oxidação é acompanhada medindo a redução da fluorescência da solução de forma a quantificar a capacidade protectora dos extractos testados. Os resultados finais de HORAC são calculados através da regressão linear entre os valores de concentração de ácido cafeíco, a área abaixo da curva de fluorescência (AUC), sendo expressos em equivalentes de ácido cafeíco (Capacidade Antioxidante em Equivalentes de Ácido Cafeíco - μM CAEAC) (Almeida, 2009).

O método experimental adoptado para a determinação da actividade antioxidante dos extractos considerados em 2.2.5.1. foi o de Almeida (2009) e encontra-se descrito no anexo 4.

3 – Encapsulamento dos Compostos Bioactivos do Bagaço de Azeitona

Esta etapa dá sequência à última fase do delineamento experimental e continuidade a uma linha de investigação sobre o encapsulamento de aromas e/ou compostos bioactivos (Duarte, 2006; Ribeiro, 2007; Barreiros, 2009; Carvalho, 2009; Beirão-da-Costa *et al.*, 2011). Estes trabalhos incidiram na caracterização exaustiva de certos agentes encapsulantes, nomeadamente amido de arroz, gelatina, gelatina/sacarose e inulina. Perante o tipo de extracto presentemente estudado e atendendo ao conhecimento adquirido com os trabalhos acima citados sobre as diferentes matrizes encapsulantes, a matriz que suscitou maior interesse para levar a cabo o processo de encapsulamento por atomização foi a inulina. Nesta fase, procurou-se portanto, estudar a viabilidade do encapsulamento do extracto do bagaço de azeitona com 20% de teor de humidade quando sujeito à extracção por CO₂ supercrítico, em matriz de inulina. A escolha do extracto baseou-se essencialmente nos resultados obtidos nos métodos de ORAC e HORAC e face ao rendimento de extracção. Extractos obtidos por extracção convencional foram igualmente encapsulados em matriz de inulina para comparação e validação dos processos de extracção e encapsulamento face aos objectivos traçados no ponto I.

3.1. Materiais e Métodos

3.1.1. Materiais

- Inulina comercial (> 90% inulina; GP ≥ 10) (Raftiline ST), obtida a partir da chicória, gentilmente fornecida por Beneo-Orafti (Tienen, Belgium)
- Emulsionante Tween-60 (Sigma-Aldrich Co.)
- Extracto lipídico obtido via convencional por n-Hexano
- Extracto obtido por CO₂ supercrítico proveniente do bagaço com teor de humidade de 20%

3.1.2. Métodos

3.1.2.1. Produção de emulsões com extractos do bagaço de azeitona em solução de inulina

Para preparar as emulsões com os extractos provenientes do bagaço de azeitona sujeito à extracção por n-Hexano e por CO₂ supercrítico, seguiram-se as seguintes fases:

1. Preparação da solução de inulina 25% (m/m) em água destilada pré-aquecida a 70 – 80 °C;
2. Arrefecimento da solução até temperatura ambiente e adição de 0,5% de Tween-60 (base inulina);
3. Adição de 20% (base inulina) de extracto à emulsão e agitação em placa magnética a 4000 r.p.m. durante 15 minutos.

O teor de sólidos e níveis de incorporação, quer de emulsionante quer de extracto foi estabelecido com base um estudo realizado em paralelo, sobre o encapsulamento de oleoresina do repiso de tomate em matriz de inulina (Duarte *et al.*, 2011).

3.1.2.2. Atomização das emulsões

Todas as emulsões produzidas mediante a metodologia descrita no ponto 3.1.2.1. foram secas num atomizador pneumático de modelo *Lab-Plant SD-05* à escala laboratorial (figura 10). As condições de atomização foram as seguintes: velocidade de alimentação de 5,8 mL/min; pressão e fluxo de ar máximos; temperaturas de secagem de 120, 155 e 190 °C. A temperatura de saída das amostras foi de 50±10°C (parâmetro não controlável e dependente da temperatura de secagem).



Figura 10 - Atomizador pneumático, modelo SD-05

O quadro 9 sintetiza as emulsões produzidas e as temperaturas de secagem utilizadas.

Quadro 9 – Emulsões produzidas e temperaturas de secagem

Extracto obtido com n-Hexano	Extracto obtido por CO ₂ Supercrítico (bagaço 20% H)
25% Inulina	25% Inulina
20% Extracto (base inulina)	20% Extracto (base inulina)
0,5% Tween 60	0,5% Tween 60
Temperaturas de secagem: 120, 155 e 190 °C	Temperaturas de secagem: 120, 155 e 190 °C

3.1.2.3. Caracterização dos extractos encapsulados por atomização em matriz de inulina

De modo a avaliar se o encapsulamento por atomização promovia alterações nos extractos e em particular, perda de bioactividade, a caracterização dos mesmos baseou-se na determinação dos polifenóis totais e actividade antioxidante pelo método de ORAC (métodos descritos nos anexos 2 e 3 respectivamente).

IV – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

1 - Caracterização dos diferentes bagaços de azeitona

Os diferentes bagaços de azeitona foram caracterizados atendendo ao teor de humidade, e foram sujeitos a uma extracção convencional, em aparelho de soxhlet, para caracterização da fracção lipídica, de modo a conhecer-se a composição em ácidos gordos e esteróis. O conhecimento destes parâmetros permitiu estabelecer qual o subproduto mais interessante para o delineamento do desenvolvimento experimental subsequente.

1.1. Teor de Humidade

O teor de humidade foi determinado nos quatro bagaços e os valores registados encontram-se de acordo com a bibliografia encontrada para este tipo de bagaços provenientes de um sistema de duas fases. Os bagaços estudados apresentaram teores de humidade entre 64,7% (variedade Arbequina) e 75,9% (Arbosana de 2ª extracção) (quadro 10).

Quadro 10 – Valores de humidade (%) para os quatro bagaços em estudo e desvio padrão associado.

Cv Arbosana (1ªExtracção)	Cv Arbosana (2ªExtracção)	Cv Arbequina	Cv Koroneiki
75,3 ± 0,7	75,9 ± 1,1	64,7 ± 0,7	68,2 ± 0,6

1.2. Rendimento de Extracção por Éter de Petróleo

O rendimento de extracção, calculado em função da razão extracto/ bagaço (m/m), permitiu identificar qual o bagaço que conduz à maior percentagem de extracto lipídico. Este parâmetro é importante, uma vez que os constituintes lipídicos, ácidos gordos e esteróis, serão reportados em função do rendimento de extracção. Os resultados dos rendimentos de extracção química encontram-se na figura 11.

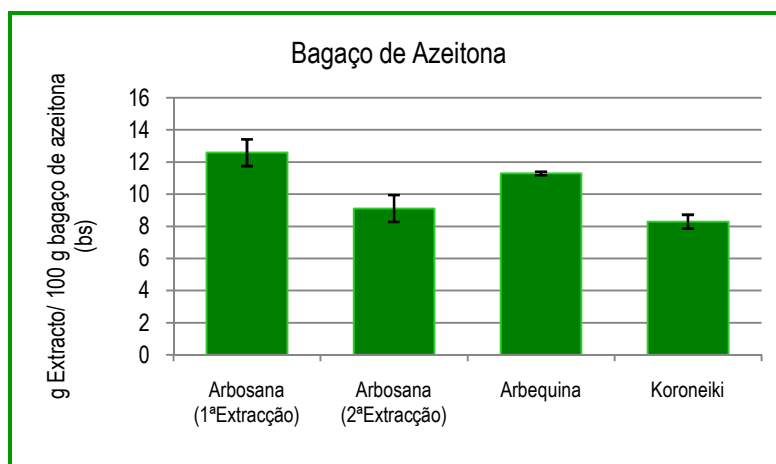


Figura 11 - Rendimentos de extracção obtidos após 16 horas de extracção em soxhlet dos diferentes bagaços (g extracto/ 100 g bagaço azeitona reportada à base seca). Os valores representados são os valores médios com o desvio padrão associado.

Analisando a figura 11, verifica-se que os rendimentos de extracção mais relevantes, por apresentarem maior valor, foram obtidos no caso das variedades Arbosana (1ª extracção) (12,6%) e Arbequina (11,3%), sendo idênticos para a Arbosana de 2ª extracção (9,1%) e para a variedade Koroneiki (8,3%),

1.3. Caracterização da Fracção Lipídica obtida por Extracção Convencional

1.3.1. Quantificação dos Ácidos Gordos

Os extractos obtidos foram analisados por GC no sentido de determinar a constituição em ácidos gordos nos diferentes bagaços de azeitona. A identificação de cada ácido gordo foi estabelecida de acordo com o tempo de retenção e a respectiva quantificação foi determinada segundo a razão entre as áreas de cada ácido gordo e a área total. Os resultados encontram-se reportados em função dos respectivos rendimentos de extracção (figura 12).

Pela análise da figura 12, verificam-se diferenças na composição em ácidos gordos, quando são reportados às unidades de massa inicial. Observa-se que os bagaços mais interessantes são aqueles a partir dos quais já tinham produzido maiores rendimentos de extracção, isto é o bagaço resultante da 1ª extracção da cv Arbosana bem como o proveniente da cv Arbequina, pelo que apresentam teores em ácidos gordos muito próximos.

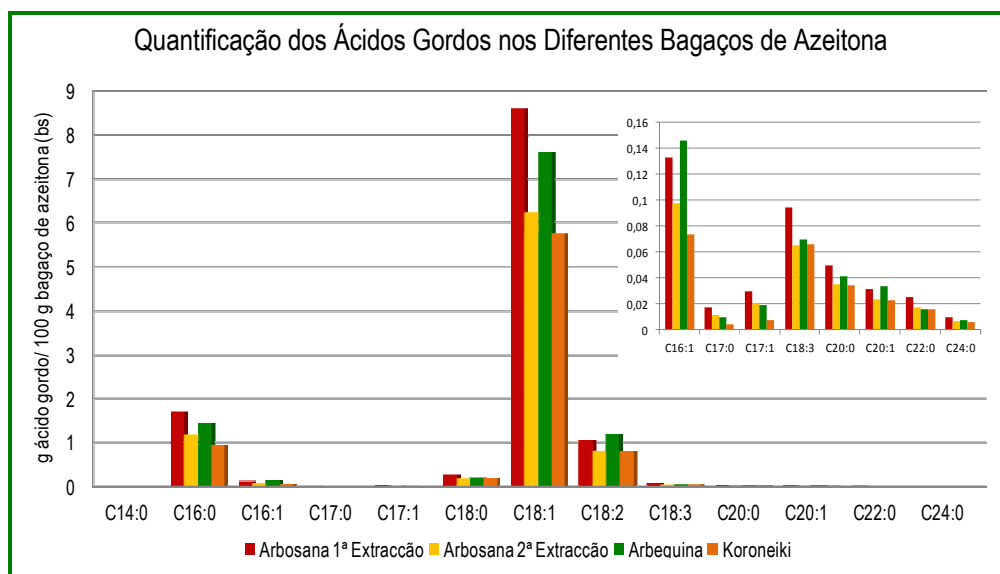


Figura 12 - Composição em ácidos gordos nos diversos extractos lipídicos resultantes dos respectivos bagaços após 16 horas de extracção com éter de petróleo. Legenda: **C14:0** – mirístico; **C16:0** – palmítico; **C16:1** – palmitoleico; **C17:0** – margárico; **C17:1** – margaroleico; **C18:0** – esteárico; **C18:1** – oleico; **C18:2** – linoleico; **C18:3** – linolénico; **C20:0** – araquídico; **C20:1** – gadoleico; **C22:0** – beénico; **C24:0** – lignocérico ((A) g de ácidos gordos/ g extracto; (B) g ácidos gordos/ 100 g bagaço de azeitona (bs)).

O ácido oleico, é o ácido mais representativo no fruto, no azeite e por conseguinte também o é no bagaço de azeitona independentemente das cultivares como está patente na figura 12. A recuperação do ácido oleico foi maior no bagaço proveniente da 1ª extracção da arbosana com cerca de 8,6 g ácido oleico/ 100 g bagaço base seca (bs), seguido do bagaço da arbequina com 7,6 g ácido oleico/ 100 g bagaço (bs) e dos bagaços resultantes da 2ª extracção de arbosana e koroneiki resultaram respectivamente, cerca de 6,2 e 5,7 g de ácido oleico/ 100 g

bagaço reportado à matéria seca. Outros resultados sobre a caracterização dos diferentes bagaços com respeito aos ácidos gordos encontram-se no anexo 5 (quadro III).

1.3.2. Quantificação dos Fitosteróis

A identificação dos fitosteróis por cromatografia gasosa foi estabelecida de acordo com o tempo de retenção e a quantificação foi determinada segundo a razão entre as áreas de cada fitosterol e a área total. Os resultados da análise aos esteróis encontram-se reportados em função dos respectivos rendimentos de extracção na figura 13. Os teores de eritrodiol e uvaol, também se encontram quantificados neste ponto, uma vez que o método adoptado permite igualmente a quantificação destes álcoois terpénicos.

Observando a figura 13, verificam-se diferenças relevantes entre os diversos esteróis que constituem os quatro bagaços em análise. O esterol de maior interesse nesta fracção é o β -Sitosterol, pela bioactividade que lhe é reconhecida e por ser o de maior expressão nos produtos de origem vegetal e em particular no bagaço de azeitona como é constatável pela figura 13. No gráfico está representado o β -Sitosterol aparente, resultante da integração dos picos cromatográficos: clerosterol, β -Sitosterol verdadeiro, sitostanol, Δ -5-avestanol e Δ -5-24-estigmasterol. Neste ponto, apenas é de salientar o β -Sitosterol, uma vez que é o esterol que apresenta maiores diferenças entre os bagaços em estudo e volta a sobressair o bagaço proveniente da 1ª extracção da arbosana que atinge cerca de 54 mg de β -Sitosterol/ 100 g bagaço de azeitona em base seca. O bagaço proveniente da Arbequina tem uma composição em β -Sitosterol de cerca de 44 mg/ 100 g bagaço enquanto que nos restantes bagaços, se consegue apenas recuperar, cerca de 36 mg β -Sitosterol/ 100 g bagaço (bs).

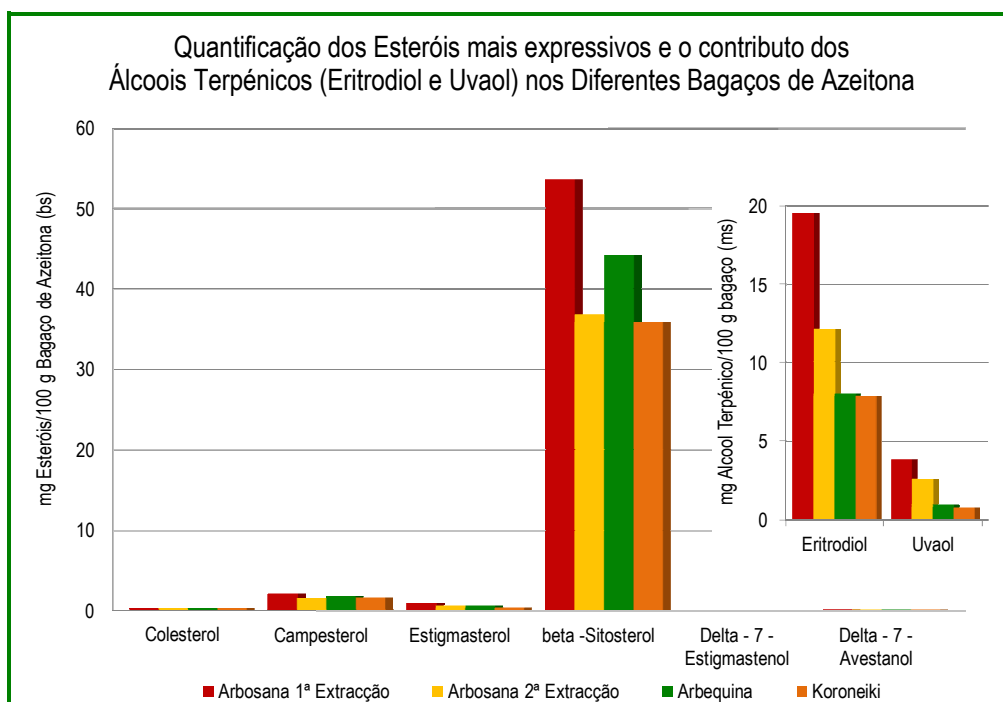


Figura 13 - Estudo comparativo da composição esterólica e dos álcoois terpénicos *eritrodiol* e *uvaol* nos diversos extractos lipídicos resultantes dos respectivos bagaços de azeitona após terem sido submetidos a 16 horas de extracção com éter de petróleo (mg esteróis/ 100 g bagaço de azeitona).

Relativamente aos álcoois terpénicos, verifica-se que são os bagaços de 1^a e 2^a extracção da Arbosana que apresentam teores mais elevados em eritrodiol e uvaol o que sugere que esta variedade seja mais rica nestes compostos que as cvs Arbequina e Koroneiki. Teores de eritrodiol e uvaol, desta ordem de grandeza eram esperados, uma vez que estando essencialmente acumulados nas películas, são mais facilmente removidos através de processos de extracção por solventes do que através de processos físicos como acontece com a extracção de azeite.

Outros resultados sobre a caracterização dos diferentes bagaços com respeito aos esteróis encontram-se no anexo 5 (quadro IV).

Face aos resultados obtidos verificou-se que o bagaço proveniente da 1^a extracção da Arbosana apresenta extractos mais interessantes para se proceder ao estudo alvo do presente trabalho.

2 - Extracção de Compostos Bioactivos do Bagaço de Azeitona por CO₂ Supercrítico

2.1. Preparação do Bagaço de Azeitona para a Extracção por CO₂ supercrítico

2.1.1. Determinação da Granulometria

O conhecimento da granulometria do material é de extrema importância, sobretudo para estabelecer o modelo matemático consequente de uma extracção por fluido supercrítico. É ainda um parâmetro determinante no rendimento de extracção, uma vez que uma redução significativa do tamanho de partícula conduz ao aumento da sua superfície específica que se traduz no aumento de transferência de massa entre a matriz e o fluido supercrítico.

O processo de classificação granulométrica iniciou-se com cerca de 180 g de bagaço de azeitona liofilizado, admitindo que não houve perdas de massa durante a operação. O respectivo fraccionamento foi estabelecido pela diferença dos tamanhos médios das partículas retidas em cada crivo. O gráfico de frequências, que se encontra representado como figura 14, estabelece a distribuição granulométrica do bagaço de azeitona liofilizado após ter sido sujeito a moenda em moinho eléctrico.

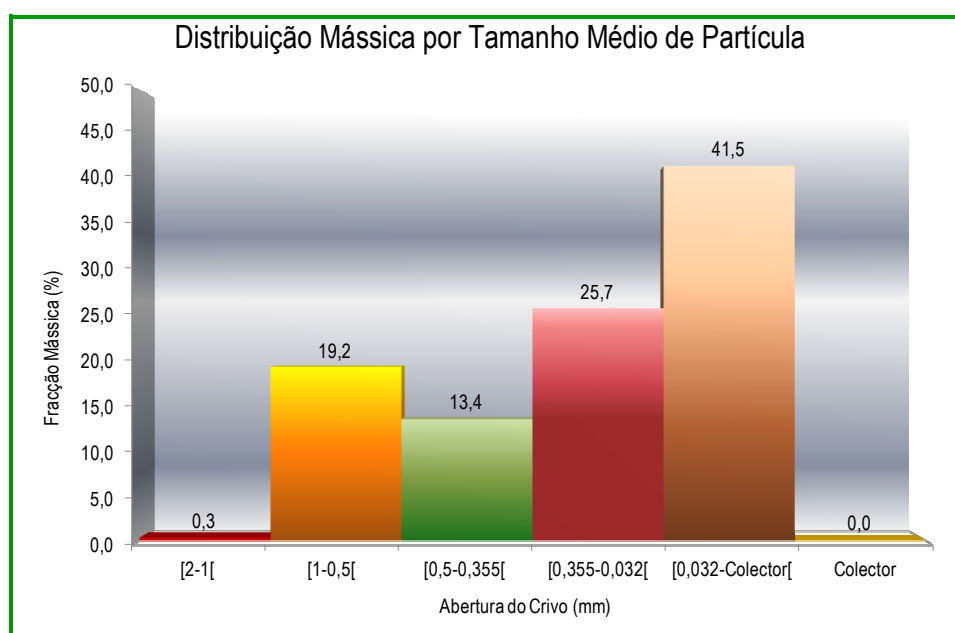


Figura 14 - Distribuição de frequências do tamanho de partícula do bagaço de azeitona liofilizado

Observando a figura 14, é de notar que a moenda permitiu a redução do tamanho de partícula mas a heterogeneidade das fracções é essencialmente consequência da natureza do material vegetal que levou a três tipos de granulometria: (i) uma mais grosseira apresentando dimensões entre 2 e 0,5 mm, representa 19,5% da fracção mássica e é constituída essencialmente por caroços/sementes; (ii) a granulometria intermédia, entre 0,5 e 0,032 mm, refere-se a cerca de 39,1% e inclui todos os constituintes do bagaço de azeitona: caroço/semente, película e polpa; (iii) a fracção mais representativa é constituída essencialmente por polpa, correspondente a cerca de 41,5% das partículas com diâmetro médio entre 0,032 mm inclusive e o colector (suporte dos crivos) e

que corresponde à granulometria mais fina. Em termos de diâmetro médio das partículas, o valor obtido foi de 0,3 mm. Outros resultados sobre granulometria encontram-se no anexo 6 (quadro V).

2.1.2. Teor de Humidade

O bagaço de azeitona depois de liofilizado e que foi direccionado para a 1ª fase de ensaios de extracção supercrítica, apresentou um teor médio de humidade de 4,3%.

Para a 2ª fase de extracção supercrítica, o bagaço de azeitona foi re-hidratado a teores de humidade de 10%, 15%, 20% e 40% ($\pm 2\%$).

2.2. Extracção por CO₂ Supercrítico (1ª Fase – Influência de um pré-tratamento)

Num 1º ensaio foram testadas duas condições de extracção por CO₂ supercrítico, A e B, mantendo como constantes as condições de pressão (250 bar) e temperatura (40 °C). A diferença entre as duas condições reside na ausência / presença de um pré-tratamento que compreende a pressurização do extractor carregado com a amostra, à pressão de trabalho, durante uma hora. Os extractos foram recolhidos de forma contínua ao longo do tempo independentemente das duas condições.

2.2.1. Eficiência de Extracção

Na figura 15 encontra-se representado os rendimentos mássicos ao longo do tempo para as duas condições de extracção supercrítica definidas no desenvolvimento experimental no ponto 2.2.4.1. Analisando a figura 15 é de notar que ao fim de 3,5 h o patamar está praticamente estabelecido conseguindo-se um rendimento de cerca de 12 g de extracto/100 g bagaço de azeitona (base seca) para a condição A e de 12,7 g de extracto/100 g bagaço de azeitona (base seca) para a condição B.

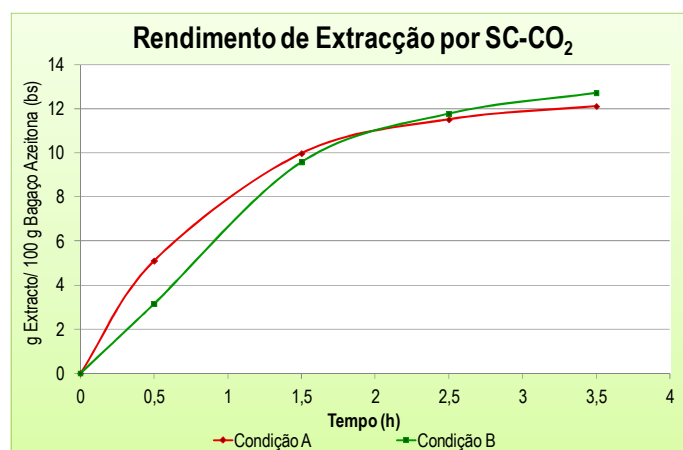


Figura 15 - Curvas cumulativas de extracção da fracção lipídica do bagaço de azeitona por CO₂ supercrítico em função do tempo ao fim de 3,5 h. Condição (A) – sem pré-tratamento; Condição (B) – com pré-tratamento.

Comparando os dois tipos de extracção, convencional (12,6%) e supercrítica, os rendimentos mássicos entre ambas são da mesma ordem de grandeza, de cerca de 12% (m/m), não havendo portanto, diferenças entre os dois tipos de extracção. É de notar ainda que Almeida (2009), apesar de ter feito um fraccionamento dos constituintes do bagaço de azeitona (caroço e polpa) obteve, no seu conjunto, resultados da mesma ordem de grandeza, cerca de 11% (m/m). Este facto faz da extracção supercrítica uma metodologia de interesse para este tipo de material.

É possível observar que no caso da condição A, é na primeira hora e meia que o rendimento de extracção é maior, quando comparado com a condição B e que o pré-tratamento que define a condição B parece não influenciar o rendimento final de extracção.

2.2.2. Caracterização da Fracção Lipídica

Os extractos resultantes das extracções por CO₂ supercrítico, provenientes das condições A e B, foram caracterizados em termos de constituição em ácidos gordos e em esteróis recorrendo a técnicas de cromatografia de forma similar à adoptada anteriormente na caracterização dos extractos provenientes da extracção com éter de petróleo nos diferentes bagaços de azeitona.

2.2.2.1. Quantificação dos Ácidos Gordos Totais

Os diversos ácidos gordos que constituem os extractos recolhidos em cada ponto de extracção, quer da condição A, quer da condição B foram identificados, quantificados e reportados em função dos respectivos rendimentos de extracção (figura 16). Na figura 16 encontra-se ainda representado graficamente os teores de ácidos gordos resultantes da extracção química por éter de petróleo ao bagaço de azeitona.

Numa apreciação mais rigorosa à presente figura, verifica-se que, de uma maneira geral, o CO₂ supercrítico é pouco selectivo na extracção dos ácidos gordos, uma vez que, por cada ponto de extracção, o teor em ácidos gordos pouco ou nada se altera. No entanto, verifica-se que no caso dos ácidos palmítico e palmitoleico, ocorre maior extracção nos primeiros 90 minutos, ao contrário dos restantes ácidos gordos que parecem ser extraídos em maior quantidade nas últimas duas horas de extracção.

Tendo como método de referência a extracção por éter de petróleo e atendendo que o tempo de extracção para a obtenção da gordura bruta foi de 16 horas, verifica-se que quando comparada com os dois ensaios realizados por extracção por CO₂ supercrítico, os resultados são igualmente muito semelhantes. Na verdade, com apenas 3,5 h (210 minutos) de extracção supercrítica, conseguiu-se extrair teores muito semelhantes aos verificados para a extracção convencional, inclusive, para ácidos gordos com número de carbonos maiores ou iguais a 18 os teores foram ligeiramente superiores. É por exemplo o caso dos ácidos esteárico, oleico, araquídico, gadoleico, beénico e lignocérico.

Os ensaios de extracção supercrítica A e B, apenas diferem no primeiro ponto de extracção, na medida em que, segundo a condição A, há uma recolha de extracto logo ao fim de 30 minutos e de acordo com a condição B, o

bagaço é envolvido em CO₂ pressurizado durante 1 hora e o extracto é recolhido passados 30 minutos. Esta diferença de condições levou a uma menor recuperação de extracto no primeiro ponto relativo ao ensaio B. No entanto, nos restantes pontos de extracção, a quantidade de extracto recolhido foram semelhantes entre si, e isso reflectiu-se no teor em ácidos gordos quando convertidos em unidades de massa como é possível verificar através da figura 16.

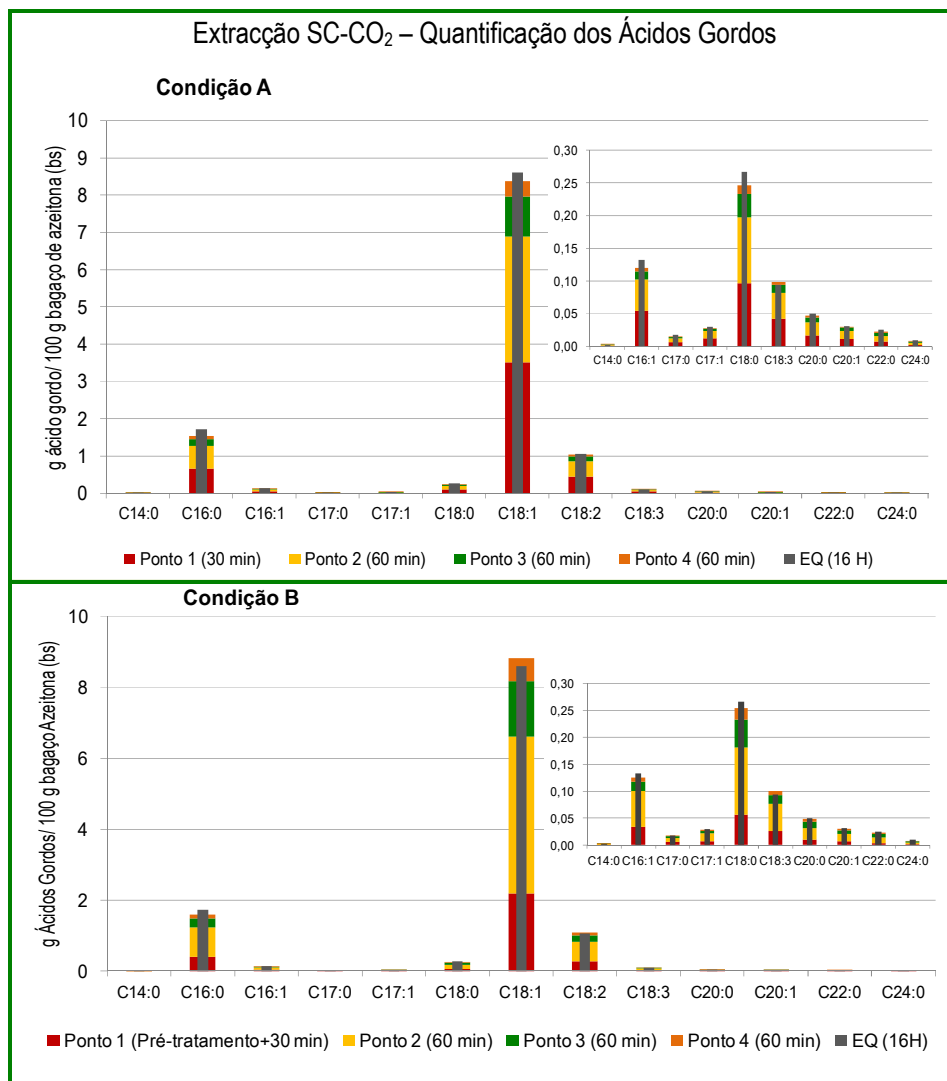


Figura 16 - Composição em ácidos gordos do óleo de bagaço de azeitona da variedade arbosana extraído por CO₂ supercrítico. Legenda: C14:0 – mirístico; C16:0 – palmítico; C16:1 – palmitoleico; C17:0 – margárico; C17:1 – margaroleico; C18:0 – esteárico; C18:1 – oleico; C18:2 – linoleico; C18:3 – linolénico; C20:0 – araquídico; C20:1 – gadoleico; C22:0 – beénico; C24:0 – lignocérico; EQ – extracção química.

Os teores em ácidos gordos, extraídos por CO₂ supercrítico assemelham-se aos teores de ácidos gordos quando recuperados por extracção convencional que são considerados como valores de referência e que determinam a eficiência da extracção supercrítica nesta matriz. Em termos práticos, pode-se dizer que ao fim de 1,5 h de extracção supercrítica são recolhidos em média, cerca de 80% dos ácidos gordos independentemente do tipo de ensaio e ao fim de 2,5 h obtém-se em média cerca de 95% dos ácidos gordos por extracção supercrítica. Uma diferença entre os ensaios e que merece alguma atenção é o facto de que se conseguiu extrair mais ácido oleico no ensaio B que no ensaio A e até foi superior inclusive, ao quantificado na extracção convencional. Outros

resultados sobre a caracterização dos extractos supercríticos com respeito aos ácidos gordos encontram-se no anexo 9 (quadro X e quadro XI).

2.2.2.2. Quantificação dos Fitosteróis

Os diversos fitosteróis que constituem os extractos recolhidos em cada ponto de extracção, quer da condição A, quer da condição B foram identificados, quantificados e reportados em função dos respectivos rendimentos de extracção (figura 17). Na mesma figura encontra-se ainda representado graficamente os teores de fitosteróis resultantes da extracção por éter de petróleo ao bagaço de azeitona.

Apenas foram analisados os dois primeiros pontos das duas extracções, condições A e B, uma vez que, nos pontos subsequentes a quantidade de extracto disponível para análise era insuficiente. Quando os teores em esteróis são reportados em mg/ g de extracto verifica-se que o comportamento esterólico é diferente entre os dois ensaios, ao contrário do que sucedia para os ácidos gordos (g/g extracto) (anexo 5). Na condição A, verifica-se que a quantidade de esteróis extractada é praticamente a mesma nos dois pontos de recolha de extracto e que se consegue teores muito próximos quando se compara com os extractos provenientes da extracção convencional.

No que diz respeito à condição B, a recuperação de alguns dos esteróis como é o caso do campesterol e β -sitosterol, é inferior no primeiro ponto de extracção. Contudo, no segundo ponto de extracção, consegue-se obter o mesmo teor de campesterol, quando comparado com a extracção química e no caso do β -sitosterol o respectivo teor chega a ser superior.

Quanto aos álcoois terpénicos, os teores extractados são semelhantes entre as duas condições de extracção mas é de notar que se consegue extrair ligeiramente mais no 2º ponto de recolha. Não obstante, verificou-se que a extracção por CO₂ supercrítico mostrou ser menos selectivo para estes dois compostos para as condições de extracção estabelecidas.

Na figura 17 encontra-se expresso os teores dos diversos esteróis reportados em termos de rendimento em bagaço de azeitona (mg esteróis/ 100 g bagaço de azeitona (base seca)) respeitantes aos dois pontos de extracção analisados, quer do ensaio A, quer do ensaio B, bem como os teores de esteróis resultantes da extracção por éter de petróleo para o bagaço de azeitona em estudo.

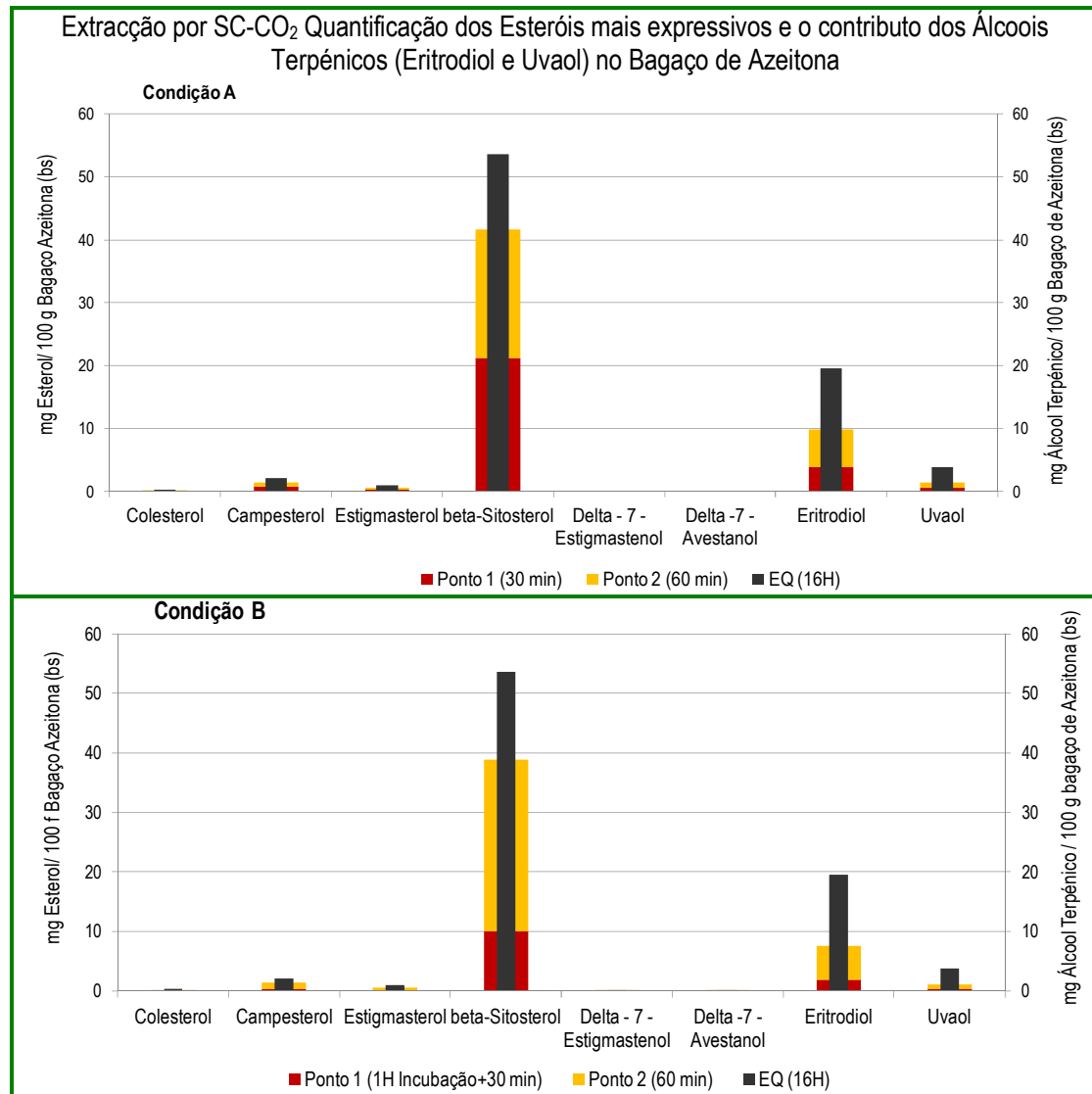


Figura 17 - Comparação entre os rendimentos de extracção obtidos via convencional e por CO₂ supercrítico para a fracção esterólica e álcoois terpénicos (Eritrodiol e Uvaol) que constituem os extractos lipídicos do bagaço de azeitona após ter sido submetido a uma extracção por CO₂ supercrítico.

Como já se tinha observado na figura anterior, as diferenças entre os dois ensaios de extracção supercrítica são mínimas, no que diz respeito à quantidade extractada dos diversos esteróis e de álcoois terpénicos. No entanto, os teores de esteróis representados na figura 17 dizem respeito a 90 minutos de extracção que quando comparados com a extracção convencional verifica-se que na condição A conseguiu-se, para este tempo de extracção, uma recuperação do β -sitosterol de cerca de 78% e na condição B obteve-se uma recuperação de 73%. Atendendo que ainda se fez mais duas horas de extracção, é válido pressupor que ao fim de 3,5 h de extracção se conseguisse teores em esteróis muito semelhantes aos obtidos na extracção por éter de petróleo.

Outra conclusão que se pode tirar, prende-se com o facto de que nas últimas horas de extracção supercrítica, estejam a ser recuperados extractos mais ricos nos compostos bioactivos de interesse, quer em termos de esteróis, como é o caso de β -sitosterol, ou dos ácidos gordos como o oleico. Outros resultados sobre a

caracterização dos diferentes extractos supercríticos com respeito aos esteróis encontram-se no anexo 7 (quadro VI e quadro VII).

2.3.Extracção por CO₂ Supercrítico (2ª Fase – Influência do Teor de Humidade na composição dos extractos)

2.3.1.Eficiência da Extracção

A figura 18 apresenta os rendimentos de extracção por CO₂ supercrítico obtidos para os bagaços de azeitona re-hidratados para 10, 15, 20 e 40% ao fim de 3,5 h de extracção. Encontra-se ainda representado na figura o rendimento de extracção obtido na condição B como parâmetro de comparação. Os resultados encontram-se expressos em g de extracto/ 100 g de bagaço de azeitona reportado à base seca.

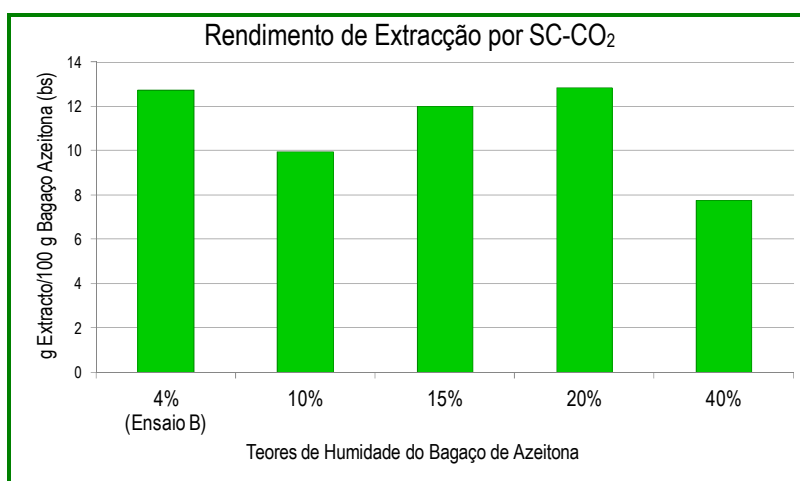


Figura 18 - Rendimentos de extracção após 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico para diferentes níveis de re-hidratação do bagaço de azeitona

Através da análise à figura 18, verifica-se que os rendimentos de extracção para os bagaços com teores de humidade entre 4 e 20% são muito semelhantes, variando entre 10 e 13%. Quando o bagaço de azeitona foi re-hidratado para 40%, o rendimento de extracção diminuiu para cerca de 4%. Nobre *et al.*, (2009), em trabalhos paralelos relacionados com a extracção supercrítica de licopeno a partir do repiso de tomate também verificaram que para teores de humidade elevado, o rendimento de extracção diminuía. Este facto sugere que para teores de humidade elevados, independentemente do tipo de matriz, a água presente no meio dificulta o contacto entre o CO₂ supercrítico e a matriz (Ge *et al.*, 2002).

De realçar que depois dos bagaços de azeitona terem sido sujeitos à extracção supercrítica o teor de humidade de todos eles diminuiu cerca de 10% (verificado para os bagaços com humidade entre 15 e 40%). A extracção supercrítica parece assim exercer, sobre a matriz, um efeito de secagem, uma das novas aplicações desta metodologia sugeridas (Abbas *et al.*, 2008). De facto quando se recupera o extracto dos vasos de recolha duas fases são visíveis, lipídica e aquosa.

2.3.2. Caracterização da Fracção Lipídica

2.3.2.1. Quantificação dos Ácidos Gordos Totais

Os ácidos gordos totais referentes aos extractos supercríticos obtidos na 2ª fase, foram caracterizados de igual modo ao que foi descrito no desenvolvimento experimental, no ponto 2.2.2.1.

Quando o teor em ácidos gordos é reportado em função do rendimento de extracção (figura 19), surgem diferenças sobretudo na matriz com 10% de humidade com teores de ácidos gordos inferiores às restantes amostras. Apesar de não haver diferenças entre as matrizes com 15 e 20% de humidade, o conteúdo em ácidos gordos mais semelhante ao obtido por extracção com éter de petróleo é a obtida para o bagaço com 20% de humidade.

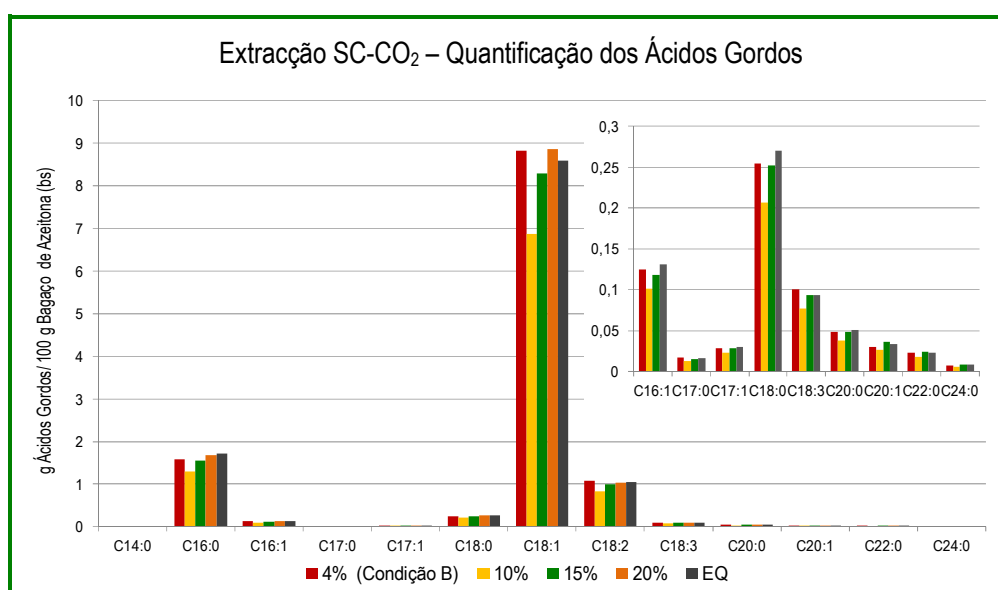


Figura 19 - Composição em ácidos gordos do óleo de bagaço de azeitona da variedade arbosana extraído por CO₂ supercrítico ao fim de 3,5 h. Legenda: C14:0 – mirístico; C16:0 – palmítico; C16:1 – palmitoleico; C17:0 – margárico; C17:1 – margaroleico; C18:0 – esteárico; C18:1 – oleico; C18:2 – linoleico; C18:3 – linolénico; C20:0 – araquídico; C20:1 – gadoleico; C22:0 – beénico; C24:0 – lignocérico; EQ – extracção química.

A composição em ácidos gordos não é influenciada quando o bagaço de azeitona apresenta-se com teores de humidade entre 4 e 20%. Para teores de humidade iguais ou superiores a 40%, a extracção torna-se mais selectiva para compostos lipossolúveis pela interferência da água livre no bagaço (para este teor de humidade) e competição com o CO₂, como solvente. Ou seja, nas primeiras horas de extracção e sob a influência da água na amostra, os primeiros compostos a serem extractados serão os mais hidrofílicos. Nas últimas horas de extracção e porque no decorrer dela, a quantidade de água na amostra vai diminuindo, possibilita a extracção dos compostos lipossolúveis mas não na totalidade face ao tempo de extracção estipulado. Razão pela qual não foi possível quantificar os diferentes ácidos gordos quando o bagaço foi re-hidratado para 40% de teor de humidade. Outros resultados sobre a caracterização dos diferentes extractos supercríticos com respeito aos ácidos gordos encontram-se no anexo 10 (quadro XII).

2.3.2.2. Quantificação dos Fitosteróis

A composição esterólica referente aos extractos supercríticos obtidos na 2ª fase, foi avaliada de igual modo ao que foi descrito no desenvolvimento experimental no ponto 2.2.2.2.

À semelhança da composição em ácidos gordos também no que respeita aos esteróis e álcoois terpénicos dos extractos lipídicos é possível verificar que a fracção esterólica se mantém constante independentemente do teor de humidade a que o bagaço esteja condicionado. No entanto, para os álcoois terpénicos o aumento do teor de humidade parece favorecer a extracção destes compostos apesar de não ser muito perceptível quando a matriz se encontra entre os 15 e os 20% de humidade (anexo 7 quadros VI e VII).

Quando os resultados são reportados à matriz (figura 20) é necessário entrar em linha de conta com o rendimento de extracção e é nesta etapa que se verificam as maiores diferenças entre as amostras.

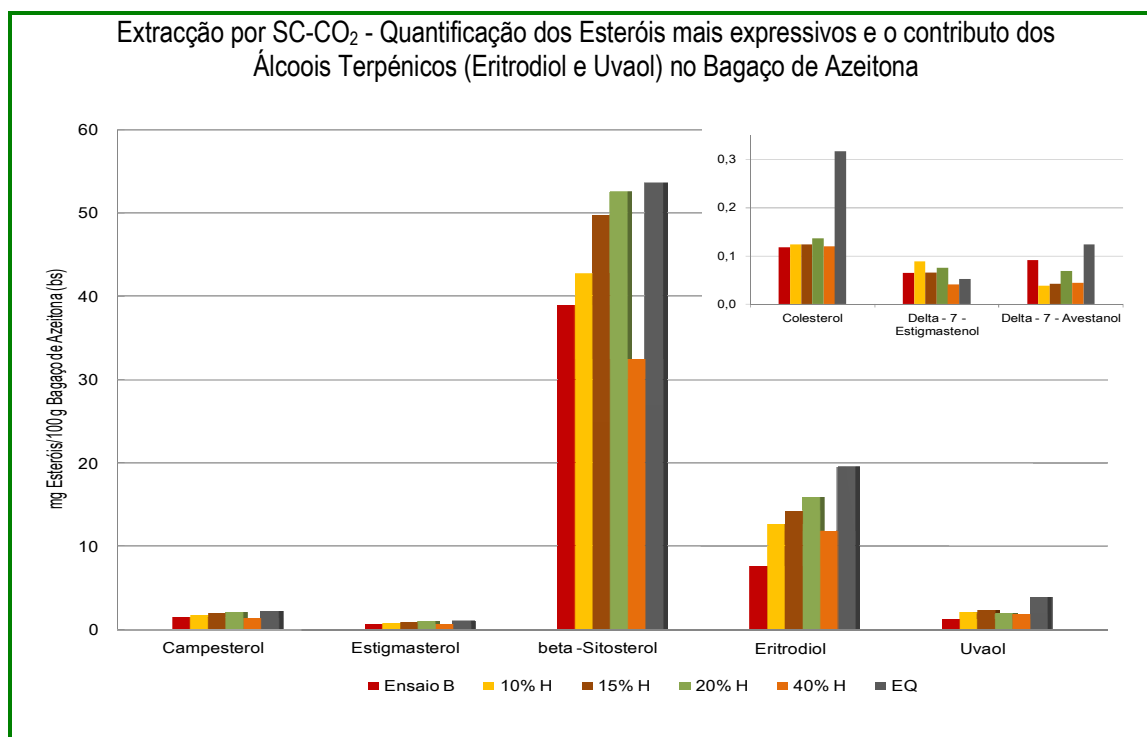


Figura 20 - Comparação entre os rendimentos de extracção obtidos via convencional e por CO₂ supercrítico para a fracção esterólica e álcoois terpénicos (Eritrodiol e Uvaol) que constituem os extractos lipídicos do bagaço de azeitona após ter sido submetido a uma extracção por CO₂ supercrítico durante 3,5 h.

Atendendo que o rendimento de extracção referente ao bagaço com 40% de humidade foi o mais baixo também os seus principais constituintes esterólicos (campesterol, estigmasterol e β - sitosterol) se encontram em menores concentrações quando comparado com as restantes matrizes. Curiosamente, é o bagaço com 20% de humidade que apresenta maior selectividade para o β - sitosterol, o esterol de maior expressão com propriedades bioactivas, pela relação entre os esteróis totais (mg/Kg matéria gorda) e o rendimento do esterol em função da matriz. Inclusivamente, é nestas condições que se atinge um rendimento em β - sitosterol muito próximo ao obtido por extracção química. Também o eritrodiol se revê neste tipo de comportamento enquanto que, o rendimento em uvaol parece decrescer com o aumento do teor de humidade. A caracterização esterólica

para o ensaio B também se encontra representada graficamente mas os seus resultados reflectem apenas a primeira 1,5 hora de extracção supercrítica e portanto a sua quantificação encontra-se expressa por defeito. Outros resultados sobre a caracterização dos diferentes extractos supercríticos com respeito aos esteróis encontram-se no anexo 8 (quadro VIII e quadro IX).

2.4. Quantificação dos Polifenóis Totais

2.4.1. Extractos Aquosos

Na figura 21 encontram-se sintetizados os resultados médios obtidos na determinação dos polifenóis totais nos diferentes bagaços de azeitona pelo método de Folin-Ciocalteu.

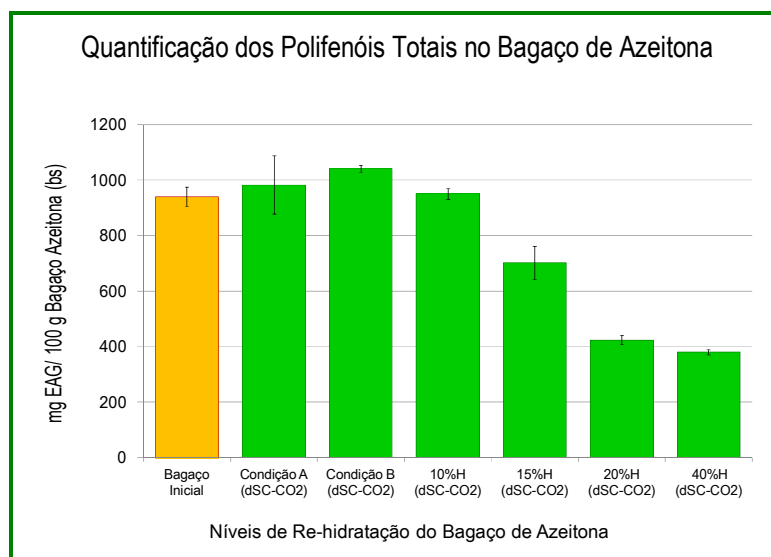


Figura 21 - Estudo comparativo dos polifenóis totais presentes nos extractos aquosos do bagaço de azeitona e nos extractos aquosos dos bagaços residuais após 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico

Analisando os resultados expressos na figura 21, verifica-se algumas diferenças nos teores de polifenóis entre os bagaços. O bagaço inicial (liofilizado possuindo um teor de humidade de 4,3% e que não foi sujeito a extracção) contém cerca de 941 mg EAG/100 g bagaço (base seca). Quando o bagaço é sujeito aos ensaios de extracção supercrítica (condições A e B), o teor em polifenóis totais aumenta o que sugere que de facto a extracção em si tem uma acção de pré-tratamento sobre o bagaço. O CO₂ supercrítico parece introduzir-se na matriz e modificar a permeabilidade das estruturas celulares mas como não possui natureza polar não consegue dissolver estes compostos e transportá-los juntamente com os compostos de natureza lipídica. O aumento do teor em polifenóis é mais evidente no ensaio B pelo que a pressurização do sistema, antes da extracção propriamente dita, parece favorecer a desordem estrutural da matriz tornando mais disponíveis os compostos fenólicos para a extracção aquosa.

No entanto quando se re-hidrata o bagaço para 10, 15, 20 e 40%, o teor em polifenóis totais presentes nos bagaços residuais vai diminuindo substancialmente, especialmente no bagaço residual com 40% de humidade; registando-se valores de 950, 702, 423 e 380 mg EAG/100 g bagaço (matéria seca), respectivamente. Este indício aponta para o facto de que é possível que o teor de humidade possa actuar como co-solvente e que facilite a extracção destes compostos. A possível extracção dos polifenóis deverá ocorrer logo no início da extracção supercrítica, ou seja até haver água disponível no meio que facilite a difusão dos compostos hidrofílicos no CO₂ supercrítico.

2.4.2. Extractos Supercríticos

Os extractos resultantes da 2ª fase de extracção por CO₂ supercrítico, estabelecido no desenvolvimento experimental no ponto 2.2.4.2. foram sujeitos a uma extracção com metanol para recuperar os compostos hidrofílicos e em particular, os polifenóis. Na figura 22 encontram-se sintetizados os resultados médios obtidos na determinação dos polifenóis totais aos diferentes extractos supercríticos resultantes do bagaço de azeitona re-hidratado para 10, 15, 20 e 40%, pelo método de Folin-Ciocalteu.

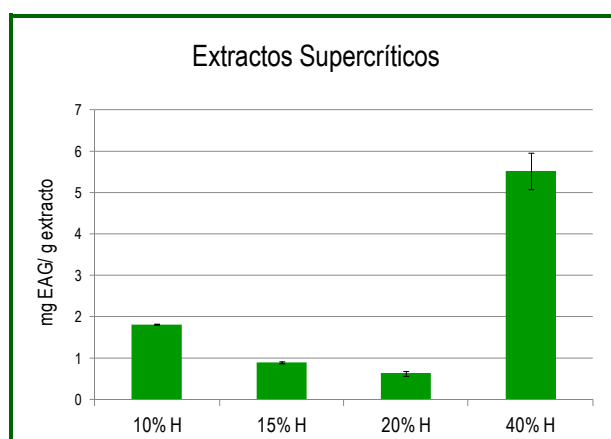


Figura 22 - Estudo comparativo dos polifenóis totais presentes nos extractos supercríticos provenientes de 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico aos bagaços de azeitona com teores de humidade de 10, 15, 20 e 40%.

Analisando a figura 22 é possível verificar a presença de compostos fenólicos nos extractos supercríticos. O extracto que possui maior composição em polifenóis totais é o que resultou da extracção supercrítica do bagaço com teor de humidade de 40%, obtendo-se cerca de 5,5 mg EAG/g extracto. No entanto para teores de humidade entre 10 e 20% os teores de polifenóis totais variam entre 0,5 e 1,8 mg EAG/g extracto. Este facto parece sugerir que, para teores de humidade entre 10 e 20% os compostos fenólicos estejam ainda fortemente ligados às estruturas celulares e que apenas uma pequena fracção passe para o CO₂ supercrítico. Para um teor de humidade de 40%, a água presente no bagaço encontra-se no estado livre, pelo que há maior predisposição dos compostos hidrofílicos, incluindo os polifenóis, de passarem para a fase aquosa durante a extracção por CO₂ supercrítico. No entanto, para este nível de hidratação, o meio torna-se ácido, pela possibilidade de a água livre reagir com o CO₂ e formar H₂CO₃ (ácido carbónico) que pode condicionar a extracção tornando-a menos

selectiva uma vez que pode arrastar compostos que não sejam exclusivamente polifenóis e que sejam capazes de reduzir igualmente o reagente de *Folin-Ciocalteu* em condições básicas (Tsimidou *et al.*, 1992).

2.5. Identificação e Quantificação dos Polifenóis: Hidroxitirosol e Tirosol

2.5.1. Identificação dos perfis hidroxitirosol e tirosol por HPLC-DAD

Os extractos resultantes da extracção aquosa do bagaço de azeitona e dos diversos bagaços residuais, e os extractos supercríticos, foram analisados por HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) acoplado com detector de díodos (HPLC-DAD) no comprimento de onda a 280 nm de modo a identificar os polifenóis hidroxitirosol e tirosol. Os respectivos perfis cromatográficos encontram-se apresentados nas figuras 23, 24 e 25.

Na figura 23 encontram-se os perfis cromatográficos, em duplicado, resultantes da extracção aquosa do bagaço de azeitona (O1 e O2d) e dos bagaços residuais resultantes da extracção supercrítica definida pelas condições A (A e Ad) e B (B e Bd).

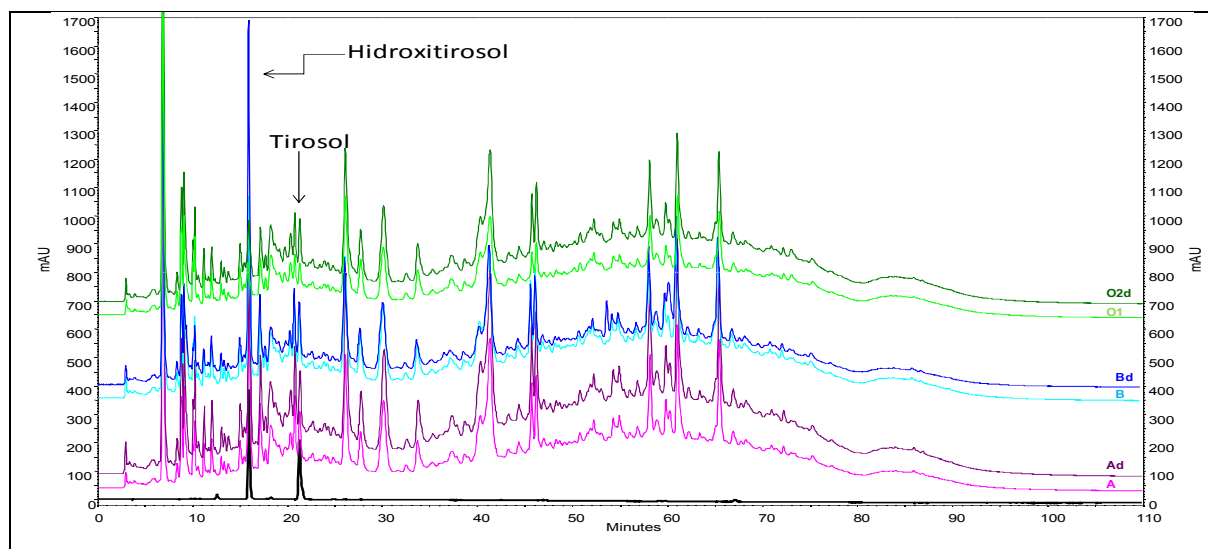


Figura 23 - Comparação de perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD a 280 nm dos extractos aquosos: **O1** e **O2d** – extractos aquosos de bagaço de azeitona liofilizado, **A** e **Ad** – extractos aquosos do bagaço residual após ter sido submetido a 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico (condição A), **B** e **Bd** - extractos aquosos do bagaço residual após ter sido submetido a 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico (condição B). Perfil cromatográfico da mistura tirosol e hidroxitirosol (40 ppm) a preto determinado por HPLC-DAD a 280 nm.

Através da figura 23, é possível verificar que os espectros dos três extractos e respectivos duplicados apresentam perfis cromatográficos semelhantes deferindo apenas na intensidade do sinal que corresponde à maior ou menor presença dos compostos detectados pelo HPLC-DAD.

O mesmo é observado nos espectros correspondentes aos extractos aquosos resultantes dos bagaços residuais que antes da extracção por CO₂ foram re-hidratados para 10, 15, 20 e 40% (figura 24). Nestes ensaios foram também analisados os respectivos duplicados (d). Verifica-se que a intensidade dos picos, independentemente dos compostos detectados, diminui com o aumento da hidratação imposta no bagaço de azeitona.

Comparando o perfil cromatográfico do bagaço inicial (O1 e o respectivo duplicado), com os perfis dos extractos aquosos resultantes dos bagaços residuais provenientes das 4 re-hidratações efectuadas (figura 23 e 24) é possível constatar que não houve alterações qualitativas no bagaço de azeitona, apenas houve em termos quantitativos.

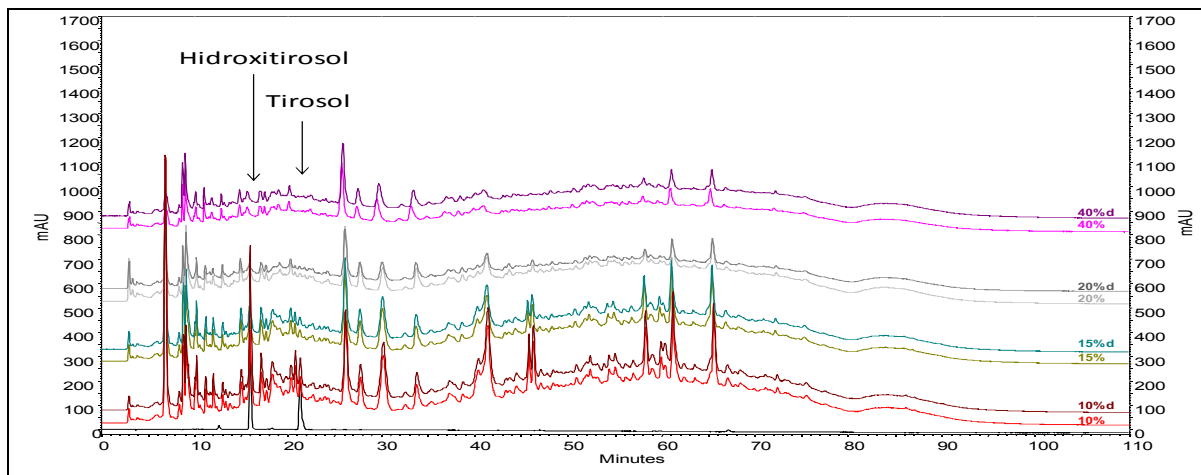


Figura 24 - Comparação de perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD a 280 nm dos extractos aquosos dos bagaços residuais após terem sido sujeitos a 3,5 h de extração por CO₂ supercrítico: **10% e 10%*d*** – extractos aquosos de bagaço de azeitona residual, com 10% de teor de humidade inicial, **15% e 15%*d*** - extractos aquosos de bagaço de azeitona residual, com 15% de teor de humidade inicial, **20% e 20%*d*** - extractos aquosos de bagaço de azeitona residual, com 20% de teor de humidade inicial e **40% e 40%*d*** - extractos aquosos de bagaço de azeitona residual, com 40% de teor de humidade inicial. Perfil cromatográfico da mistura tirosol e hidroxitirosol (40 ppm) a preto determinado por HPLC-DAD a 280 nm.

À semelhança ao realizado no ponto 2.4.2 os extractos supercríticos foram sujeitos a uma extração com metanol, de modo a concentrar os compostos fenólicos e proceder-se à sua identificação e posterior quantificação. A figura 25 representa os perfis cromatográficos resultantes dos extractos supercríticos provenientes da extração supercrítica realizada no bagaço sujeito aos quatro níveis de hidratação de 10, 15, 20 e 40%.

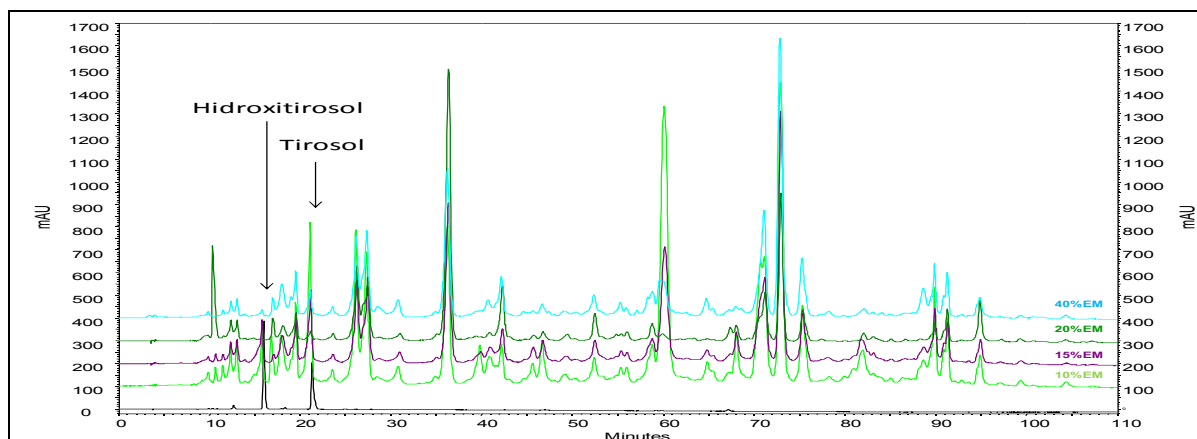


Figura 25 - Comparação de perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD a 280 nm dos extractos supercríticos obtidos ao fim de 3,5 h de extração por CO₂ supercrítico: **10%*EM*** – extracto supercrítico de bagaço de azeitona com 10% de teor de humidade, **15%*EM*** - extracto supercrítico de bagaço de azeitona com 15% de teor de humidade, **20%*EM*** - extracto supercrítico de bagaço de azeitona com 20% de teor de humidade e **40%*EM*** - extracto supercrítico de bagaço de azeitona com 40% de teor de humidade. Perfil cromatográfico da mistura tirosol e hidroxitirosol (40 ppm) a preto determinado por HPLC-DAD a 280 nm.

Analisando a figura 25, é possível verificar que os perfis resultantes dos extractos supercríticos, quando comparados com os das figuras 23 e 24, são semelhantes, no entanto revelam a presença de compostos com tempos de retenção entre os 70 e os 100 minutos que nas figuras anteriores não são visíveis. Isto pode significar que estes compostos estejam na fronteira hidrofóbica/ hidrofílica e por esse motivo não tenham sido detectados nos extractos aquosos, principalmente nos do bagaço de azeitona.

Em todos os extractos, foi possível detectar e identificar os compostos de interesse, hidroxitirosol e tirosol, sugerindo as respectivas presenças no bagaço de azeitona liofilizado, no bagaço de azeitona residual (depois de ter sido submetido à extracção por CO₂ supercrítico) e nos próprios extractos supercríticos.

2.5.2. Identificação por HPLC-ED

À semelhança do ponto 2.5.1. do presente capítulo, os mesmos extractos foram analisados por HPLC acoplado com detector electroquímico (HPLC-ED). Os perfis cromatográficos encontram-se apresentados nas figuras 26, 27 e 28.

A figura 26 reflecte os perfis cromatográficos respeitantes aos extractos aquosos do bagaço (O1 e O2d) e dos bagaços residuais resultantes da extracção supercrítica definida pelas condições A (A e Ad) e B (B e Bd).

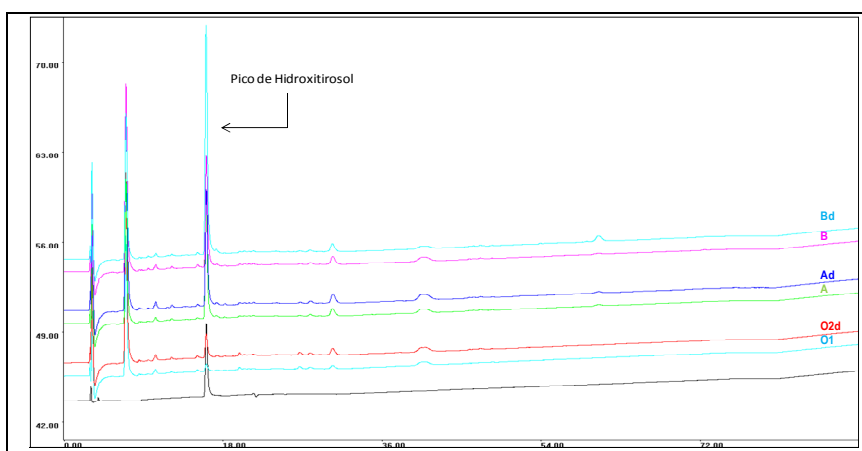


Figura 26 - Comparação de perfis cromatográficos determinados por HPLC-ED a 280 nm dos extractos aquosos: **O1** e **O2d** – extractos aquosos de bagaço de azeitona liofilizado, **A** e **Ad** – extractos aquosos do bagaço de azeitona residual após ter sido submetido a 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico (condição A), **B** e **Bd** - extractos aquosos do bagaço de azeitona residual após ter sido submetido a 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico (condição B). Perfil cromatográfico da mistura tirosol e hidroxitirosol (40 ppm) a preto determinado por HPLC-ED a 280 nm

Através da figura 26 é possível observar que os perfis dados pelo detector electroquímico, são semelhantes entre os extractos analisados, deferindo apenas na intensidade dos picos observados, e em particular o do hidroxitirosol, que reflecte uma maior presença nos extractos aquosos resultantes dos bagaços residuais sujeitos às condições de extracção A e B.

Na figura 27, encontram-se os perfis cromatográficos relativos aos extractos aquosos resultantes dos bagaços residuais inicialmente com 10, 15, 20 e 40%. Nestes ensaios foram também analisados os respectivos duplicados.

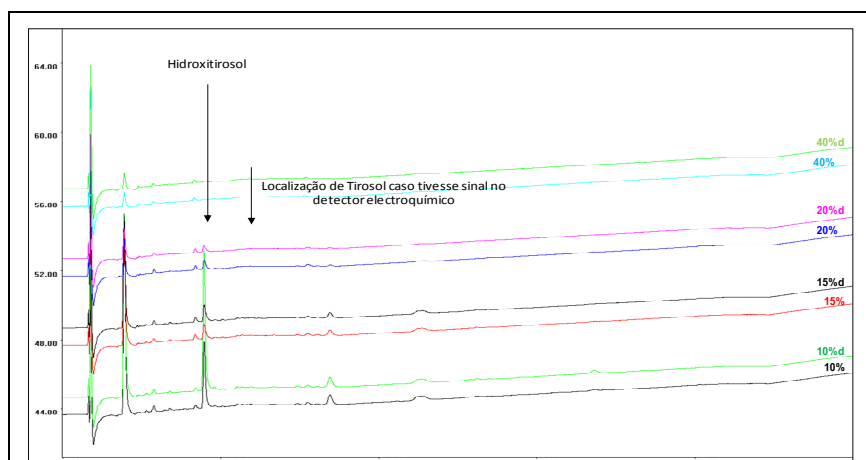


Figura 27 - Comparação de perfis cromatográficos determinados por HPLC-ED dos extractos aquosos dos bagaços residuais após terem sido sujeitos a 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico: **10%** e **10%d** – extractos aquosos de bagaço de azeitona residual, com 10% de teor de humidade inicial, **15%** e **15%d** - extractos aquosos de bagaço de azeitona residual, com 15% de teor de humidade inicial, **20%** e **20%d** - extractos aquosos de bagaço de azeitona residual, com 20% de teor de humidade inicial e **40%** e **40%d** - extractos aquosos de bagaço de azeitona residual, com 40% de teor de humidade inicial. Perfil cromatográfico da mistura tiroso e hidroxitirosol (40 ppm) a preto determinado por HPLC-ED.

Pela análise à figura 27 e comparando com a figura 26, é possível verificar que os diferentes extractos aquosos apresentam o mesmo tipo de padrão cromatográfico, contudo nota-se que a intensidade dos picos diminui com o aumento do teor de humidade imposto ao bagaço, sobretudo no pico correspondente ao hidroxitirosol. Este dado volta a sugerir que houve migração deste e de outros compostos para os extractos supercríticos correspondentes.

À semelhança ao realizado no ponto 2.4.2 os extractos supercríticos foram sujeitos a uma extracção com metanol, de modo a concentrar os compostos fenólicos e proceder-se à sua identificação e posterior quantificação. A figura 28 representa os perfis cromatográficos referentes aos extractos metanólicos provenientes do bagaço re-hidratado para 10, 15, 20 e 40%.

Através da comparação dos perfis cromatográficos entre todos os extractos considerados (extractos aquosos dos bagaço, bagaços residuais resultantes das condições A e B de extracção supercrítica e bagaços residuais sujeitos inicialmente a re-hidratação e os extractos supercríticos) (figuras 26, 27 e 28) verifica-se a presença de compostos com tempos de retenção entre os 60 e os 80 minutos apenas nos perfis cromatográficos dos extractos supercríticos.

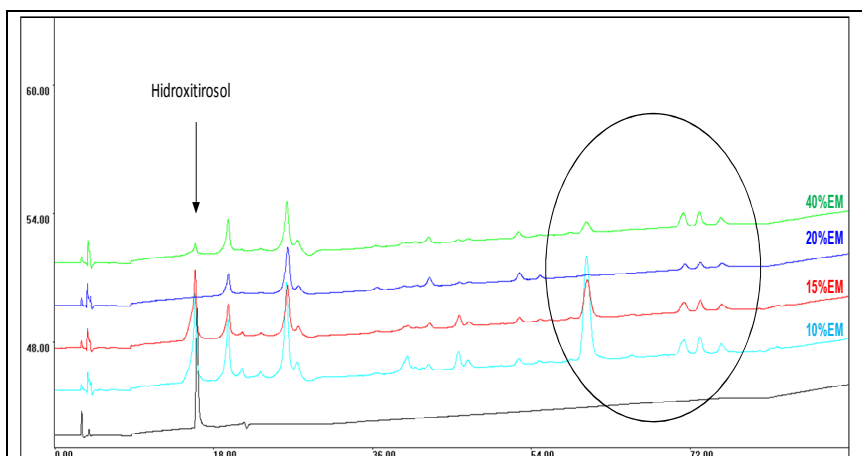


Figura 28 - Comparação de perfis cromatográficos determinados por HPLC-ED dos extractos supercríticos obtidos ao fim de 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico: **10%EM** – extracto supercrítico de bagaço de azeitona com 10% de teor de humidade, **15%EM** - extracto supercrítico de bagaço de azeitona com 15% de teor de humidade, **20%EM** - extracto supercrítico de bagaço de azeitona com 20% de teor de humidade e **40%EM** - extracto supercrítico de bagaço de azeitona com 40% de teor de humidade. Perfil cromatográfico da mistura tirosol e hidroxitirosol (40 ppm) a preto determinado por HPLC-ED.

Em todos os extractos, foi apenas possível detectar e identificar por HPLC-ED o hidroxitirosol. Verifica-se ainda que a intensidade do pico, referente ao hidroxitirosol diminui substancialmente quando os extractos supercríticos provêm do bagaço re-hidratado para 20 e 40% (figura 28).

2.5.3. Quantificação dos polifenóis Hidroxitirosol e Tirosol por HPLC-DAD-ED

Os polifenóis hidroxitirosol e tirosol, quer dos extractos aquosos efectuados no bagaço e nos bagaços residuais (depois de sujeitos à extracção supercrítica definidas na 1^a e 2^a fase dos ensaios supercríticos), quer nos próprios extractos supercríticos considerados foram quantificados recorrendo a cromatografia líquida (HPLC) e os respectivos resultados encontram-se expressos nas figuras 29 e 30.

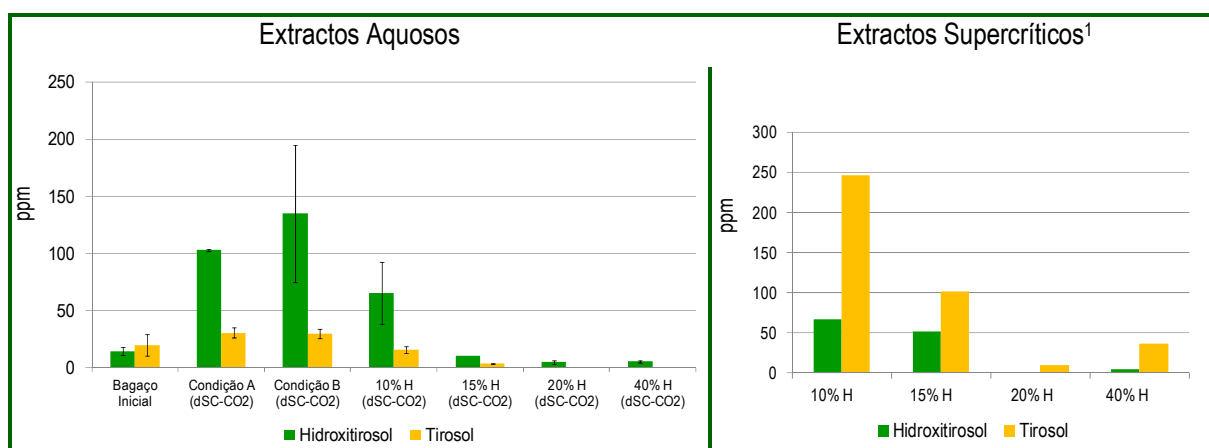


Figura 29 - Quantificação do hidroxitirosol e tirosol (ppm) existentes nos diferentes extractos aquosos: bagaço e bagaços residuais (resultantes das condições A e B e re-hidratados para 10, 15, 20 e 40%) depois de 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico e os extractos supercríticos provenientes dos bagaços re-hidratados.

¹ Os extractos supercríticos foram sujeitos a uma extracção com metanol para concentrar os compostos hidrofílicos e foram estes últimos os analisados

Na figura 29, constam os teores em ppm de hidroxitirosol e tirosol provenientes dos perfis cromatográficos obtidos no detector de díodos (HPLC-DAD) no c.d.o. de 280 nm. Relativamente aos extractos aquosos, e a par do que se tinha verificado com a determinação dos polifenóis totais (2.4.1.), veio confirmar-se que de facto a extracção supercrítica funciona como um pré-tratamento ao bagaço, favorecendo a recuperação dos polifenóis, sobretudo do hidroxitirosol. Este facto é comprovado pela diferença obtida entre o bagaço (antes de sofrer qualquer extracção supercrítica) e os bagaços residuais resultantes das condições A e B, cujos valores em hidroxitirosol são de 14,2; 102,9 e 134,8 ppm, respectivamente. Apesar da extracção supercrítica ter facilitado a recuperação do tirosol a diferença entre os três extractos não é significativa atendendo ao desvio padrão associado no bagaço inicial. Não obstante, os valores médios de tirosol para o bagaço e bagaços residuais resultantes das condições de extracção supercrítica A e B foram de 19,7; 30,5 e 29,8 ppm, respectivamente.

Ainda na figura 29, observa-se que os teores de tirosol e hidroxitirosol decrescem nos extractos aquosos com o aumento do teor de humidade no bagaço, o que também se verifica para os respectivos extractos supercríticos. Um dado curioso é o facto de que os extractos supercríticos possuem teores de tirosol significativamente superiores aos seus extractos aquosos correspondentes, sobretudo quando o bagaço foi sujeito à re-hidratação de 10%. Assumindo que os teores totais de tirosol e hidroxitirosol, para este tipo de bagaço de azeitona são os obtidos na extracção aquosa do bagaço residual sujeito à condição B de extracção supercrítica, verifica-se que o tirosol obteve uma percentagem de recuperação de cerca de 400%, 170%, 16% e 60% nos extractos supercríticos provenientes dos bagaços com humidade de 10%, 15%, 20% e 40%, respectivamente. No caso do hidroxitirosol e assumindo o mesmo raciocínio, verifica-se que a percentagem de recuperação do hidroxitirosol foi de 50%, 39%, 0% e 3,4% nos extractos supercríticos provenientes dos bagaços com humidade de 10%, 15%, 20% e 40%, respectivamente.

Neste ponto conclui-se que o factor humidade influencia positivamente a extracção supercrítica dos polifenóis totais e em particular o hidroxitirosol e tirosol, para teores de humidade até 10 a 15% e negativamente para teores de humidade superiores a 15%. Não obstante, a extracção supercrítica de bagaço de azeitona com teores de humidade entre 10 e 15% parece ser mais selectiva para a extracção de tirosol enquanto que a extracção de hidroxitirosol é favorecida quando a extracção supercrítica funciona como pré-tratamento e o bagaço residual resultante é sujeito a uma extracção aquosa.

Na figura 30, constam os teores em ppm de hidroxitirosol provenientes dos perfis cromatográficos obtidos no detector de díodos (HPLC-ED) ao c.d.o. de 280 nm. Os teores em hidroxitirosol fornecidos pelo HPLC-ED, nos diversos extractos (aquosos e supercríticos) em estudo são muito semelhantes aos obtidos pelo HPLC-DAD. Inclusivamente observa-se o decréscimo do teor em hidroxitirosol com o aumento do teor de humidade no bagaço, visível nos extractos aquosos e supercríticos. A principal diferença entre os dois métodos de identificação/quantificação residiu na incapacidade do HPLC-ED detectar o sinal do tirosol nos extractos.

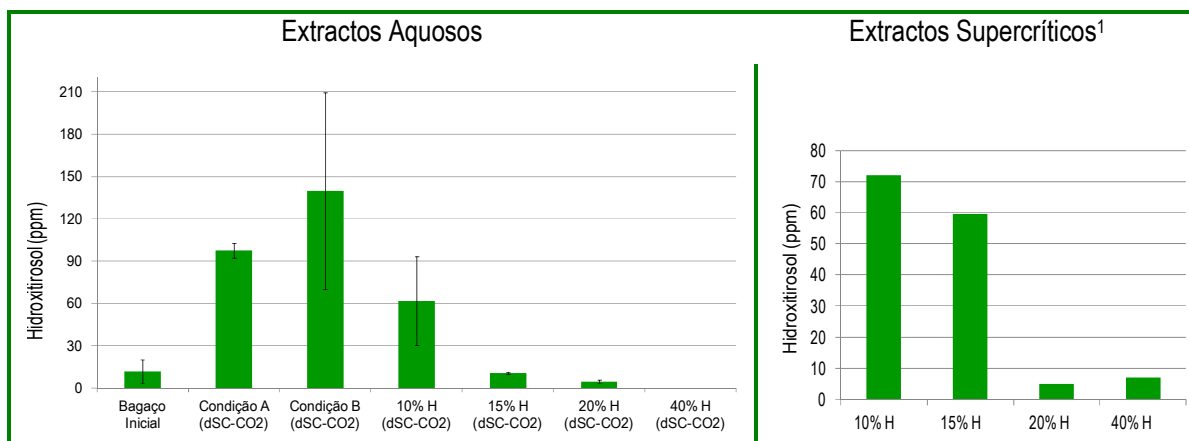


Figura 30 - Quantificação do hidroxitirosol (ppm) existente nos diferentes extractos aquosos: bagaço, bagaços residuais sujeitos às condições A e B de extracção supercrítica e bagaços residuais inicialmente re-hidratados para 10, 15, 20 e 40% depois de 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico e os extractos supercríticos provenientes dos bagaços re-hidratados.

2.6. Avaliação da Capacidade Antioxidante

2.6.1. Método de ORAC

Na figura 31, estão representadas as actividades antioxidantes dos extractos aquosos obtidos a partir do bagaço de azeitona e dos bagaços residuais nas diferentes condições supercríticas em estudo. Os resultados encontram-se expressos em equivalentes de Trolox (Capacidade Antioxidante em Equivalentes de Trolox - μM CAET).

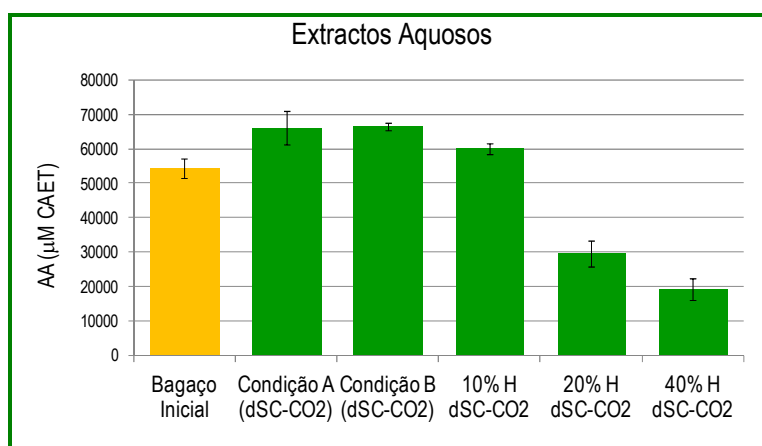


Figura 31 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante dos extractos aquosos obtidos a partir do bagaço de azeitona e bagaços residuais depois de 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico expresso em μmol CAET

Através da figura 31, é possível constatar que o bagaço de azeitona, *per si*, ainda apresenta uma elevada capacidade antioxidante da ordem dos 50 000 μmol CAET. No entanto, quando o bagaço é sujeito à extracção supercrítica (condições A e B) há um aumento de 10 000 sobre a capacidade antioxidante.

¹ Os extractos supercríticos foram sujeitos a uma extracção com metanol para concentrar os compostos hidrofílicos e foram estes últimos os analisados

De facto, a extracção supercrítica parece funcionar como um pré-tratamento, permitindo que compostos intracelulares fiquem disponíveis para serem recuperados apenas usando solventes como a água, como foi o caso. Este aumento de actividade antioxidante parece estar relacionado com os polifenóis totais e em particular com hidroxitirosol, uma vez que para as mesmas condições também se verificou, respectivamente concentrações mais elevadas.

Tal como aconteceu nas determinações referentes aos polifenóis quer totais, quer no hidroxitirosol e tirosol, verifica-se que à medida que se aumenta o teor de humidade no bagaço de azeitona, ocorre um decréscimo na actividade antioxidante nos respectivos extractos aquosos, especialmente quando o bagaço apresenta teores de humidade de 20 e 40%. De notar ainda que quando o bagaço de azeitona contém um teor de 10% de humidade, a sua actividade antioxidante permanece muito próxima à verificada para as condições A e B de extracção supercrítica.

De salientar ainda que, os extractos aquosos provenientes dos bagaços residuais resultantes das condições A e B mostraram maior capacidade de resgate do radical peróxido com valores médios de actividade antioxidante de 66 000 μM CAET.

Na figura 32, estão representadas as actividades antioxidantes dos extractos supercríticos obtidos a partir da extracção supercrítica dos bagaços com 10%, 15%, 20 e 40% de humidade. Atendendo ao interesse em estudar a influência do teor de humidade na extracção supercrítica de compostos bioactivos no bagaço, os quatro extractos supercríticos foram ainda sujeitos a uma extracção com metanol, para concentrar os compostos hidrofílicos responsáveis pela bioactividade que migraram do bagaço para o extracto durante a extracção supercrítica (à semelhança ao efectuado para o ponto 2.4.2 do presente capítulo).

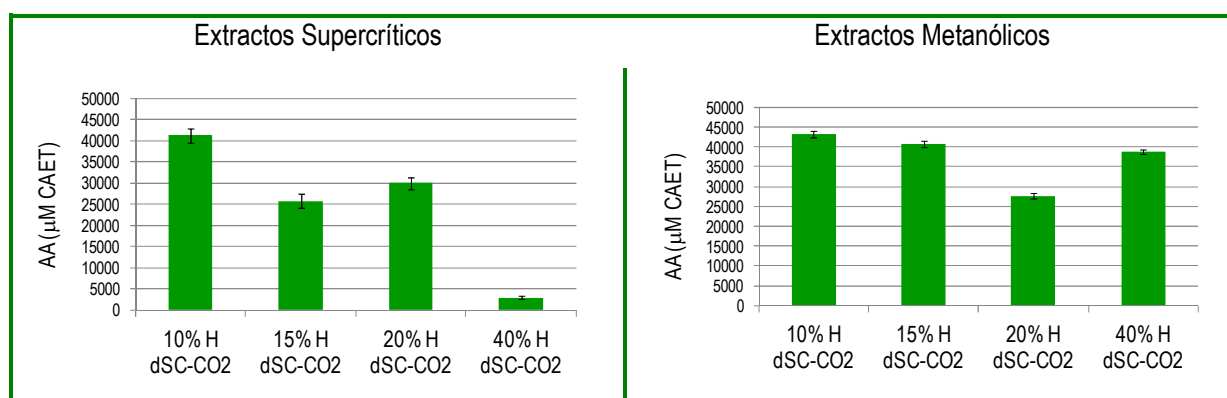


Figura 32 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante dos extractos supercríticos e metanólicos obtidos a partir do bagaço de azeitona com 10, 15, 20 e 40% de humidade depois de 3,5 h de extracção por CO_2 supercrítico expresso em μM CAET

Observando a figura 32, verifica-se que tanto os extractos supercríticos como os extractos designados de metanólicos, possuem actividade antioxidante. Curiosamente, para 10 e 20% de teor de humidade, os respectivos extractos (supercrítico e metanólico) possuem a mesma ordem de grandeza de actividade antioxidante de cerca de 42 000 e 30 000 μM CAET, respectivamente. Houve um decréscimo na actividade

antioxidante nos extractos supercríticos correspondentes aos bagaços com 15 e 40% de humidade e aumento nos respectivos extractos metanólicos. Uma vez que os extractos supercríticos possuem igualmente a fracção que engloba os extractos metanólicos, faz sugerir que a actividade antioxidante deve-se sobretudo a esta fracção o que explicaria a elevada actividade antioxidante no extracto metanólico resultante da extracção supercrítica do bagaço de azeitona com 40% humidade por exemplo.

2.6.2. Método de HORAC

Na figura 33, estão representados as actividades antioxidantes dos extractos aquosos obtidos a partir do bagaço de azeitona e dos bagaços residuais nas diferentes condições supercríticas em estudo. Os resultados encontram-se expressos em $\mu\text{M CAE}$ (Equivalentes de Ácido Cafeico).

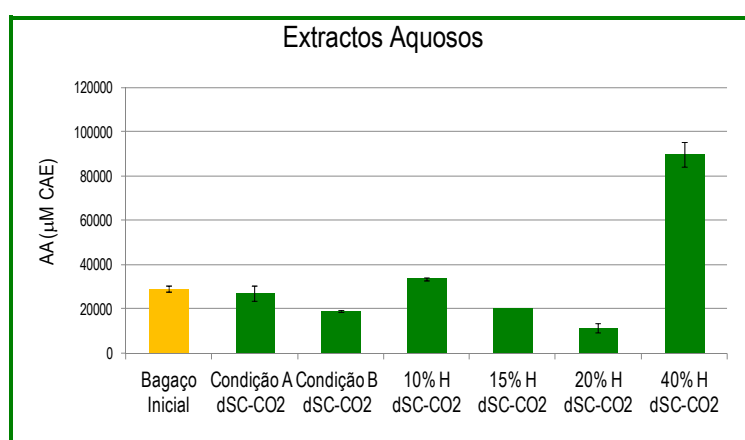


Figura 33 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante dos extractos aquosos obtidos a partir do bagaço de azeitona e bagaços residuais depois de 3,5 h de extracção por CO₂ supercrítico expresso em $\mu\text{M CAE}$

Através da figura 33, é possível verificar que o bagaço de azeitona, apresenta uma capacidade antioxidante da ordem dos 22 000 $\mu\text{M CAE}$, muito semelhante aos obtidos para os bagaços residuais resultantes das condições A e B e o que resultou da hidratação de 15%. Contudo, o bagaço que conduziu a um extracto aquoso com maior actividade antioxidante foi o sujeito a 40% de hidratação apresentando cerca de 90 000 $\mu\text{M CAE}$.

Observa-se também que a actividade antioxidante, relativamente aos extractos aquosos quer do bagaço, quer dos bagaços residuais, é mais baixa para o método de HORAC do que pelo método de ORAC o que revela a natureza protectora dos compostos presentes nos extractos sobre as espécies reactivas.

Na figura 34, estão representadas as actividades antioxidantes dos extractos supercríticos obtidos a partir da extracção supercrítica dos bagaços com 10%, 15%, 20 e 40% de humidade. Estes extractos foram igualmente sujeitos a uma extracção com metanol para concentrar os compostos hidrofílicos responsáveis pela bioactividade que migraram do bagaço para o extracto durante a extracção supercrítica (à semelhança ao efectuado para o ponto 2.4.2 do presente capítulo).

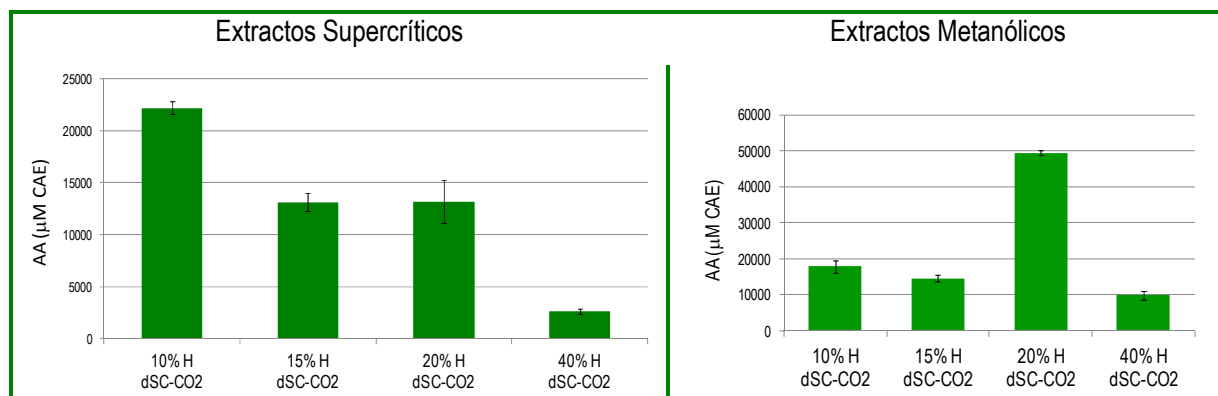


Figura 34 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante dos extractos supercríticos e metanólicos obtidos a partir do bagaço de azeitona com 10, 15, 20 e 40% de humidade depois de 3,5 h de extração por CO₂ supercrítico expresso em μMCAE

Observando a figura 34, verifica-se que a actividade antioxidante é influenciada negativamente com o aumento do teor de humidade nos extractos supercríticos, uma vez que decresce de 22 000 para 2 500 μmol CAE. No entanto parece manter-se constante para valores de humidade entre os 15 e 20%. Relativamente aos extractos designados de metanólicos, a actividade antioxidante não é tão influenciada pelo teor de humidade, sendo que o extracto metanólico proveniente do bagaço re-hidratado para 20% é o que possui maior actividade antioxidante por este método, atingindo cerca de 50 000 μM CAE.

Face ao exposto, é complicado escolher a melhor condição de extração sob o ponto de vista de obtenção de extractos com maior interesse em termos de bioactividade. Com este delineamento obteve-se quase como que um fraccionamento dos constituintes dos extractos, todos eles de grande interesse, dependendo da aplicabilidade. As condições de extração supercrítica (A, B e 10% H) favorecem o bagaço como ainda matéria-prima para a extração de polifenóis, especialmente de hidroxitirosol, possuindo ainda elevada actividade antioxidante pelo método de ORAC. Enquanto que em termos de extractos supercríticos analisados, as melhores condições recaíram sobre a extração para o bagaço hidratado a 10 e 15% para a obtenção de hidroxitirosol e tirosol; em termos de actividade antioxidante, por ORAC os extractos supercríticos de 10, 15 e 40% revelaram-se mais interessantes; enquanto que pelo método de HORAC os extractos aquoso, resultante do bagaço residual sujeito à hidratação de 40%, e supercrítico com 20% de humidade pareceram os mais interessantes.

No entanto, a escolha do extracto supercrítico recaiu sobre a condição correspondente ao bagaço sujeito a 20% de hidratação atendendo à elevada actividade antioxidante verificada pelo método de HORAC, como também ao rendimento de extração e composição em esteróis.

3 – Encapsulamento dos Compostos Bioactivos do Bagaço de Azeitona

O encapsulamento dos compostos bioactivos do bagaço de azeitona em inulina foi efectuada por *spray-drier* para 3 temperaturas de secagem: 120, 155 e 190 °C. A inulina (25% m/m) foi dissolvida em água destilada a 70 - 80 °C. O nível de incorporação dos extractos bioactivos foi estabelecido para 20% (m/m base inulina) e o emulsionante tween 60 foi adicionado (0,5% m/m base inulina) para criar uma emulsão estável.

Os encapsulados produzidos foram analisados em termos de polifenóis totais e a actividade antioxidante foi avaliada através do método ORAC.

3.1. Quantificação dos Polifenóis Totais

Na figura 35 estão representados os compostos bioactivos resultantes das extracções convencional e por CO₂ supercrítico que foram encapsulados em matriz de inulina, em função dos polifenóis totais. Os valores apresentados são valores médios associados aos respectivos desvios padrão.

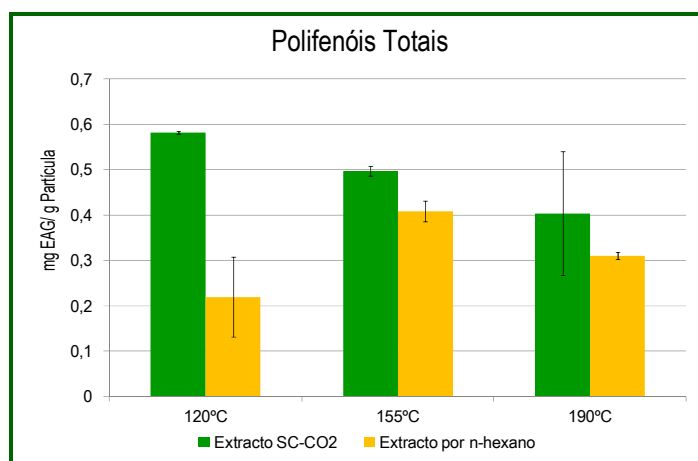


Figura 35 - Teor em polifenóis totais (mg EAG/ g partícula) presentes nos encapsulados produzidos para diferentes temperaturas de secagem: 120, 155 e 190 °C.

Através da figura 35, verifica-se que o extracto proveniente da extracção por CO₂ supercrítico apresenta maior composição em polifenóis totais (reportados a mg de equivalentes de ácido gálico/ g de partícula) que o extraído por extracção convencional. No caso do extracto proveniente da extracção supercrítica, verifica-se que à medida que a temperatura de atomização aumenta, ocorre um decréscimo no teor total de polifenóis. Quanto ao extracto obtido por extracção convencional, parece ter menos estabilidade térmica, face ao primeiro, principalmente quando a temperatura de secagem é de 120 °C. Isto porque, a taxa de evaporação do sistema (emulsão) é mais lenta para esta temperatura, podendo degradar os compostos fenólicos, o que pode explicar o facto de o teor em polifenóis ser mais elevado quando as temperaturas de secagem são de 155 e 190 °C.

3.2. Avaliação da capacidade Antioxidante

Na figura 36 estão representadas as actividades antioxidantes dos extractos bioactivos encapsulados em matriz de inulina, determinadas pelo método de ORAC.

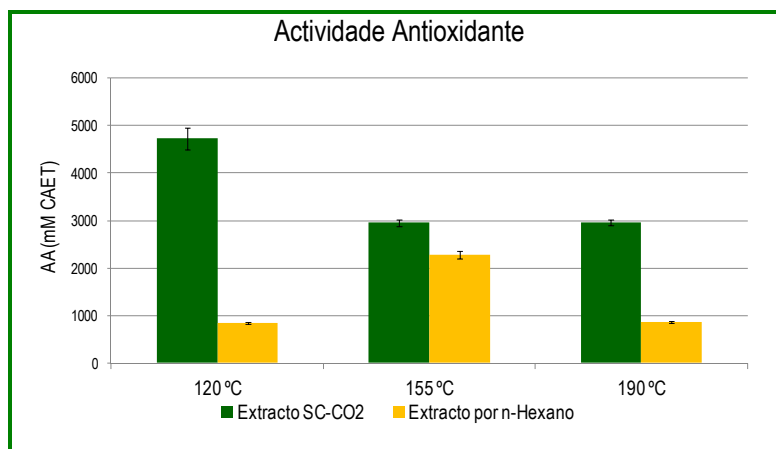


Figura 36 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante dos extractos bioactivos encapsulados em matriz de inulina atomizados a 120, 155 e 190°C, previamente obtidos a partir de 3,5 h de extracção supercrítica do bagaço de azeitona com 20% de humidade e extracção convencional durante 8 horas utilizando n-hexano como solvente expresso em $\mu\text{M CAET}$

O extracto bioactivo proveniente da extracção por CO_2 supercrítico do bagaço com 20% de humidade apresentava uma actividade antioxidante de 30 000 $\mu\text{M CAET}$ e analisando a figura 36, é possível verificar que a actividade antioxidante decresce substancialmente no processo de encapsulamento registando-se valores médios de 5 000 $\mu\text{M CAET}$ quando a atomização é feita a 120 °C e 3 000 $\mu\text{M CAET}$ para temperaturas de secagem de 155 e 190°C. O extracto obtido por extracção convencional apresentava uma actividade antioxidante de cerca de 17 380 $\mu\text{M CAET}$ pelo que com o processo de encapsulamento também diminuiu para cerca de 800 $\mu\text{M CAET}$ para temperaturas de secagem de 120 e 190 °C e de 2 200 $\mu\text{M CAET}$ para uma temperatura de secagem de 155 °C. Não obstante, verifica-se que a actividade antioxidante é maior nos extractos bioactivos provenientes da extracção por CO_2 supercrítico que os obtidos por extracção convencional e que decresce com o aumento da temperatura de secagem. No entanto, verifica-se ser possível encapsular os extractos bioactivos do bagaço de azeitona na matriz de inulina por atomização, quer se trate de extractos provenientes de extracção supercrítica ou convencional preservando os compostos polifenólicos e actividade antioxidante.

V - CONCLUSÕES

No decorrer do trabalho experimental foi possível retirar as seguintes conclusões:

- Com este delineamento obteve-se quase como que um fraccionamento dos constituintes dos extractos, todos eles de grande interesse, dependendo da aplicabilidade. O bagaço de azeitona, é um subproduto a valorizar pela sua riqueza em compostos bioactivos, nomeadamente em ácido oleico, β -Sitosterol e compostos polifenólicos como é o caso do hidroxitirosol e tirosol;
- A extracção por CO₂ supercrítico mostrou ser uma metodologia viável, com elevada reprodutibilidade na recuperação de compostos bioactivos deste tipo de subproduto;
- As condições de extracção supercrítica (A, B e 10% H) favorecem o bagaço como ainda matéria-prima para a extracção de polifenóis, especialmente de hidroxitirosol e tirosol, possuindo ainda elevada actividade antioxidante pelo método de ORAC.
- Re-hidratando o bagaço de azeitona para valores de humidade entre 10 a 40% é igualmente possível recuperar compostos bioactivos de natureza hidrofílica no extracto supercrítico. Inclusivamente a extracção supercrítica dos álcoois terpénicos, sobretudo o eritrodíol, é favorecida com o aumento do teor de humidade;
- Para teores de humidade iguais ou superiores a 40% a extracção por CO₂ supercrítico torna-se mais selectiva para compostos lipossolúveis, razão pela qual não foi possível quantificar os ácidos gordos;
- Actividade antioxidante elevada foi observada em todos os extractos analisados, quer pelo método de ORAC, quer pelo método de HORAC revelando uma elevada sinergia entre os compostos presentes nos extractos;
- É possível, através do processo de atomização, enquanto metodologia de encapsulamento, encapsular os compostos bioactivos provenientes do bagaço de azeitona, quer por extracção por CO₂ supercrítico, quer recorrendo a extracção convencional preservando s compostos polifenólicos e actividade antioxidante.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, K.; Mohamed, A.; Abdulmir, A.; H.A., Abas. 2008. A review on supercritical fluid extraction as a new analytical method. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 4:345-353.
- Aires, C. M. 2007. Contribuição para o estudo da aplicação de subprodutos da indústria de extracção de azeite em solos agrícolas. Efeito sobre alguns parâmetros químicos indicadores do estado de fertilidade do solo, o estado de nutrição e produtividade de algumas culturas. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. Pp 1-26.
- Allouche, Y.; Beltrán, G.; Gaforio, J. J.; Uceda, M.; Mesa, M. D. 2010. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food Chemistry and Toxicology*. 48:2885-2890.
- Allouche, Y.; Warleta, F.; Campos, M.; Sánchez-Quesada, C.; Uceda, M.; Beltrán, G., et al. 2011. Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic capacities of pentacyclic triterpenes found in the skin of olives on mcf-7 human breast cancer cells and their effects on DNA damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59:121-130.
- Almeida, A.P.C. 2009. Utilização da tecnologia supercrítica no isolamento de ingredientes biofuncionais. Aplicação ao caroço de azeitona e refugo de cereja. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia, Faculdade de Ciências e Tecnológica. Universidade Nova de Lisboa., Lisboa. Pp 130.
- Artajo, L.; Romero, M.; Suárez, M.; Moltiva, M. 2007. Partition of phenolic compounds during the virgin olive oil industrial extraction process. *European of Food Research Technology*. 225:617-625.
- Aruoma, O. 1998. Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 73:199-212.
- Baeta-Hall, L., Sáagua, M., Bartolomeu, M. A., & Rosa, M. (s.d.). Obtido em 01 de Outubro de 2011, de <http://www.deqb.ist.utl.pt/bbio/72/pdf/compostagem.pdf>
- Ballesteros, I.; Oliva, J.; Ballesteros, M. 2001. Ethanol production from lignocellulosic byproducts of olive oil extraction. *Appl biochem and biotechnol*. 91-93; 237-252.
- Barreiros, A.C.B.V. 2009. Inulina como Agente Encapsulante de Compostos Bioactivos. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Pp30-41.
- Baynast, R.; Renard, C. 1994. Procédés d'extraction et de transformation des sucres de chicorée. Comptes rendus de L'academie D'agriculture de France. 80:31-46.
- Beirão-da-Costa, S.; Duarte, C.; Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Serra, T.A., Moldão-Martins, M., Januário, M.I.N., Vicente, A.A., Duarte, C.M.M., Beirão-da-Costa, M.L. 2011. Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. *Journal of Food Engineering*. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.05.043
- Belitz, H.; Grosch, W.; Schieberle, P. 2009. Food Chemistry (4^a ed.). Heidelberg, Germany. Springer.
- Bianchi, G.; Murelli, C.; Vlahov, G. 1992. Surface waxes from olive fruits. *Phytochemistry*. 31:3503-3506.
- Bisignano, G.; Tomaino, A.; Cascio, R.; Crisafi, G.; Uccella, N.; Saija, A. 1999. On the In-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 51:971-974.
- Blecker, C.; Chevalier, J.; Van Herck, J.; Fougnes, C. D.; Paquot, M. 2001. Inulin: its physicochemical properties and technological functionality. *Recent Research and Development in Agricultural & Food Chemistry*. 5:125-131.

- Bonoli, M.; Bendini, A.; Cerretani, L.; Lercker, G.; Toschi, T. 2004. Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:7026-7032.
- Borja, R.; Alba, J.; Banks, C. 1997. Impact of the main phenolic compounds of olive mill wastewater (OMW) on the kinetics of acetoclastic methanogenesis. *Process Biochemistry*. 32:121-133.
- Boskou, D. 2006. Characteristics of the Olive Tree and Olive Fruit. In D. Boskou, (ed), *Olive Oil. Chemistry and Technology*. Illinois: American Oil Chemists' Society. p. 24.
- Boskou, D. 2009. Other Important Minor Constituents. In D. Boskou (ed.), *Olive Oil, Minor Constituents and Health* Boca Raton, EUA: CRC Press, Taylor & Francis Group. pp. 45-54.
- Bouaziz, M.; Hammami, H.; Bouallagui, Z.; Jemai, H.; Sayadi, S. 2008. Production of antioxidants from olive processing by-products. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 8:3231-3236.
- Cañabate-Díaz, B.; Carretero, S.; Fernández-Gutiérrez, A.; Vega, A.; Frenich, A.; Vidal, J. M. 2007. Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chemistry*. 102:593-598.
- Carvalho, J.S.R. 2009. Encapsulamento de Óleo Essencial de *Origanum virens* L. em Matrices de Gelatina e Gelatina/Sacarose. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Pp 70.
- D'Annibale, A.; Crestini, C.; Vincigerra, V.; Sermani, G. 1998. The Biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-root fungus. *Journal of Biotechnology*. 61:209-218.
- de Jonge, J.; Amorij, J.P.; Hinrichs, W. L.; Wilschut, J.; Huckriede, A.; Frijlink, H. W. 2007. Inulin sugar glasses preserve the structural integrity and biological activity of influenza virosomes during freeze-drying and storage. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 32:466-471.
- de Leonardis, A.; Aretini, A.; Alfano, G.; Macciola, V.; Ranalli, G. 2008. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *European Food research and Technology*. 226:653-659.
- de Marco, E.; Savarese, M.; Paduano, A.; Sacchi, R. 2007. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*. 104:858-867.
- de Roos, K.B. 2006. Understanding and controlling the behaviour of aroma compounds in thermally processed foods. *Trends in food science & technology*. 17:236-243.
- de Roover, J.; Vandenbranden, K.; Van Laere, A.; Ende, W. 2000. Dought induces fructan. Synthesis and 1-SST in roots and leaves of chicory seedlings. *Planta*. 210:808-814.
- de Valle, J.; Aguilera, J. 1988. An improved equation for predicting the solubility of vegetable oils in supercritical CO₂. *Ind. Eng. Chem. Res.* 27:1551.
- de Vos, W.; Castenmiller, J.; Harmer, R.; Brummer, R. 2006. Nutridynamics - Studying the dynamics of food components in products and in the consumers. *Current Opinion in Biotechnology*. 17:217-225.
- Dean, R. 2009. Extraction Techniques in Analytical Sciences. Cornwall, Reino Unido. Wiley & Sons, Ltd. Pp. 197-207.

- Desai, G.K.H.; Park, H.J. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology*. 23:1361-1394.
- Desobry, S.; Debeaufort, F. 2011. Encapsulation of Flavors, Nutraceuticals and Antibacterials. In E. Baldwin, R. Hagenmaier, & J. Bai (eds.), *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Boca Raton. 2ª Edição CRC Press Taylor and Francis Group. pp. 333-372.
- Duarte, C.S.C. 2006. Encapsulamento de Aroma de Alho em Matriz de Amido. Utilização dos Encapsulados em Panificação. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia.
- Duarte, C., Beirão-da-Costa, S., Bourbon, A., Pinheiro, A., Serra, A., Moldão-Martins, M., Vicente, A, Duarte, C.M.M., Beirão-da-Costa, M.L. 2011. Encapsulation and delivery of carotenoids-rich extract from tomato pomace in a prebiotic matrix. ICEF. Greece.
- Espín, J.; Soler-Rivas, C.; Cantos, E.; Tomás-Barberán, A.; Wichers, H. 2001. Synthesis of the Antioxidant Hydroxytyrosol Using Tyrosinase as Biocatalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:1187-1193.
- Esquivel, M.M. (1994). Extracção supercrítica de Óleo de Bagaço de Azeitona. Tese de Doutoramento, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Fang, Z.; Bhandari, B. 2010. Encapsulation of Polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology*. 21:510-523.
- Federici, F.; Fava, F.; Kalogerakis, N.; Mantzavinos, D. 2009. Valorization of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters. *Journal Chem Technol Biotechnol*. 84:895-900.
- Fenice, M.; Sermanni, G.; Federici, F.; D'Annibale, A. 2003. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *Journal of Biotechnology*. 100:77-85.
- Fernández-Bolaños, J.; Felizón, B.; Brenes, M.; Guillén, R.; Heredia, A. 1998. Hydroxytyrosol and tyrosol as the main compounds found in the phenolic fraction of steam-exploded olive stones. *JAACS*. 75:1643-1649.
- Fitó, M.; Covas, M. 2007. Olive Oil and Oxidative Stress. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51:1215-1224.
- Franck, A., De Leenheer, L. 2002. Inulin, in Biopolymers, Steinbuchel, A., Ed., Wiley-VCH Weinheim, Germany, pp. 439-479.
- Frank, A., Bosscher. 2009. Inulin. In S. Cho, & P. Samuel (eds.), *Fiber Ingredients. Food Applications and Health Benefits*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. pp. 41-56.
- Frankel, E. N.; Meyer, A. S. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric*. 80:1925-1941.
- Freitas, M. 2007. Avaliação do potencial energético dos resíduos sólidos dos lagares do Alentejo. Mestrado em Olivicultura, Azeite e Azeitona de Mesa. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Ganhão, R. 2003. Remoção de Impurezas de Óleo Bagaço de Azeitona. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Ge, Y., Yan, H., Hui, B., Ni, Y., Wang, S., & Cai, T. 2002. Extraction of Natural Vitamin E from Wheat Germ by Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 685-689.

- Gouveia, J. 1995. Azeites Virgens do Alto Alentejo - Comportamento químico, tecnológico e sensorial. Dissertação apresentada para efeito de obtenção do grau de doutor. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Guinda, A. 2006. Use of solid residue from the olive industry. *Grasas Y Aceites*. 57:107-115.
- Gunstone, F. 2008. Oils and Fats in the Food Industry. Food Industry Briefing Series. John Wiley & Sons, Ltd. Publication.
- Harborne, J.B. 1982. Ecological Biochemistry, 2ª Edição. Academic Press. New York.
- Japón-Luján, R., Luque-Rodríguez, J., & Luque de Castro, M. 2006. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*. 1108:76-82.
- Karel, M.; Langer, R. 1988. Controlled release of food additives. In Risch, S.J.; Reineccius, G.A. (eds.), *Flavor encapsulation*. Washington DC. ACS Symposium Series 370. American Chemical Society. Cap. 18, pp. 177-191.
- King, W.; Turbiano, P.; Perry, P. 1976. *Food Product development*. 10:56-57.
- Kris-Ethertorn, P.; Hecke, K.; Bonanome, A.; Coval, S.; Binkoski, A.; Hilpert, K., et al. 2002. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *The American Journal of Medicine*. USA. 113:71s-88s.
- Kubo, A.; Lunde, C.; Kubo, I. 1995. Antimicrobial activity of the olive oil flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43:1629-1633.
- Lafka, T.; Lazou, A.; Sinanoglou, V.; Lazos, E. 2011. Phenolic and antioxidant potencial of olive oil mill wastes. *Food Chemistry*. 125:92-98.
- Le Tutour, B.; Guedon, D. 1992. Antioxidant activities of Olea Europaea leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry*. 31:1173-1178.
- Lesage-Meessen, L.; Navarro, D.; Maunier, S.; Sigoillot, J.-C.; Lorquin, J.; Delattre, M., et al. 2001. Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*. 75:501-507.
- Ling, W.; Jones, P. 1995. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Pergamon*. 57:195-206.
- Lopez, M.; Ramos-Cormenzana, A. 1996. Xanthan production from olive-mill wastewaters. *International biodeterioration & biodegradation*. 38:263-270.
- Lucas, A., Martinez de la Ossa, E., Rincón, J., Blanco, M., & Gracia, I. 2002. Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. *Journal of Supercritical Fluids*. 22:221-228.
- Madene, A.; Jacquot, M.; Scher, J.; Desobry, S. 2006. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International journal of food science and technology*. 41:1-21.
- Marinangeli, C.; Jones, P. 2010. The use of functional plant ingredients for the development of efficacious functional foods. In J. Smith, & E. Charter (eds.), *Functional Food Product Development*. John Wiley & Sons, Ltd., Publication. pp. 110-127.

- Matias, A. 2008. Desenvolvimento de Óleos Alimentares Funcionais, da Ciência à Aplicação - Dissertação apresentada para obtenção do grau de doutor em Engenharia Química pelo Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa. Oeiras.
- Miró-Casas, E.; Covas, M.; Farre, M.; Fitó, M.; Ortuño, J.; Weinbrenner, T., et al. 2003. Hydroxytyrosol Disposition in Humans. *Clinical Chemistry*. 49:945-952.
- Montedoro, G. F.; Garofolo, M.; Bertuccioli. 1986. Factors shaping the quality characteristics of an olive oil. *Industrie Alimentari*. 25:549-555.
- Morillo, J.; Antizar-Ladislaio, B.; Monteoliva-Sánchez, M.; Ramos-Cormenzana, A.; Russell, N. 2009. Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 82:25-39.
- Mukhopadhyay, M. 2000. Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide. Boca Raton: CRC Press.
- Nagy, B.; Simandi, B. 2008. Effects of particle size distribution, moisture content, and initial oil content on the supercritical fluid extraction of paprika. *Journal of Supercritical Fluids*. 46:293-298.
- Nobre, B.; Palavra, A.; Pessoa, F.; Mendes, R. 2009. Supercritical CO₂ Extraction of Trans-Lycopene from Portuguese Tomato industrial waste. *Food Chemistry*. 116:680-685.
- Obied, H.; Allen, M.; Bedgood, D.; Prenzler, P.; Robards K.; Stockmann, R. 2005. Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:823-837.
- Papadopoulos, G.; Boskou, D. 1991. Antioxidant Effect of Natural Phenols on olive oil. *JAOCS*. 68:669-671.
- Pegg, R.B.; Shahidi, F. 1999. Encapsulation and controlled release in food preservation. In Rahman, M.S., (ed), *Handbook of food preservation*. New York. Marcel Dekker. Cap. 21, pp. 611-656.
- Pereda, S.; Bottoni, B.; Esteban, A. 2007. Fundamentals of Supercritical Fluid Technology. In Martínez, J. L. (ed), *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*. Boca Raton. CRC Press. pp. 1-24.
- Petroni, A.; Blasevich, M.; Salami, M.; Papini, N.; Montedoro, G.; Galli, C. 1995. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis Research*. 78:151-160.
- Plumb, J.; Rhodes, M.; Lampi, A.; Buchgraber, M.; Kroon, P. 2011. Phytosterols in plant foods: Exploring contents, data distribution and aggregated values using an online bioactives database. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24:1024-1031.
- Pothakamury, U.R.; Barbosa-Cánovas, G.V. 1995. Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in food science & technology*. 6:397-406.
- Prior, R.; Wu, X.; Schaich, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:4290-4302.
- Proctor, A. Clark. P.K. 1993. Effects on lutein adsorption of adding polar solvents to silic acid or to soy oil/hexane miscells. *JAOCS*. 70:1003-1007.
- Ramirez-Tortosa, M.; Granados, S.; Quiles, J. 2006. Chemical Composition, Types and Characteristics of Olive Oil. In J. Quiles, M. Ramírez-Tortosa, & P. Yaqoob (eds.), *Olive Oil and Health*. Reino Unido: Cromwell Press. pp. 45-62.

Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão de 11 de Julho de 1991, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L248, 5 de Setembro de 1991.

Regulamento (CE) nº 796/2002 da Comissão de 6 de Maio de 2002, que altera o Regulamento (CEE) nº 2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados, e as notas complementares constantes do anexo do Regulamento (CEE) nº 2658/87 do Conselho relativo à nomenclatura pautal e estatística e à pauta aduaneira comum. *Jornal Oficial da União Europeia*, L128, 15 de Maio de 2002.

Reineccius, G.A. 1988. Spray-drying of food flavours. In Risch, S.J.; Reineccius, G.A. (eds.), *Flavor encapsulation*. Washington DC. *ACS Symposium Series 370*. American Chemical Society. Cap. 7, pp. 55-66.

Reineccius, G.A. 1995. Controlled release techniques in the food industry. In Risch, S.J.; Reineccius, G.A. (eds.), *Encapsulation and controlled release of food ingredients*. Washington DC. *ACS Symposium Series 590*. American Chemical Society. Cap. 2, pp. 8-25.

Ribeiro, C. M. M. 2007. Encapsulamento de aromas alimentares. Estudo da eficiência de diferentes matrizes e tecnologias de encapsulamento. Tese de Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de agronomia. Universidade Técnica de Lisboa.

Ribeiro, M.A.; Esquível, M.M.; Bernardo-Gil, M.G. 2007. A extracção supercrítica e os antioxidantes naturais. *Ingenium – Dossier Comunicações*. II Série. Nº 98. pp141-143.

Risch, S.J. 1995. Encapsulation: overview of uses and techniques. In Risch, S.J.; Reineccius, G.A. (eds.), *Encapsulation and controlled release of food ingredients*. Washington DC. *ACS Symposium Series 590*. American Chemical Society. Cap. 1, pp. 1-7.

Roberfroid, M. 1993. Dietary fiber, inulin and oligofructose: A review comparing their physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 33, 103.

Rodriguez-Amaya, D. 2010. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids - A review. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23:726-740.

Rodriguez-Rodriguez, R.; Perona, J.; Herrera, M.; Ruiz-Gutierrez, V. 2006. Triterpenic compounds from “orujo” olive oil elicit vasorelaxation in aorta from spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:2096–2102.

Ronkart, S.; Deroanne, C.; Paquot, M.; Fougnes, C.; Blecker, C. 2010. Impact of the crystallisation pathway of inulin on its mono-hydrate to hemi-hydrate thermal transition. *Food Chemistry*. 119:317-322.

Ronkart, S.; Paquot, M.; Fougnes, C.; Deroanne, C.; Blecker, C. S. 2009. Effect of water uptake on amorphous inulin properties. *Food Hydrocolloids*. 23:922-927.

Sanguansri, L. e Augustin, M. A. 2010. Microencapsulation in functional food product development. In Smith, J. & Charter, E. (eds.), *Functional Food Product Development*. Blackwell Publishing Ltd. pp. 3-19.

Santos, A. N. 2005. Obtenção de corante natural de beterraba por microencapsulação em secador de spray. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. 12p.

- Schaffer, S.; Podstawa, M.; Visioli, F.; Bogani, P.; Müller, W.; Eckert, G. 2007. Hydroxytyrosol-Rich Olive Mill Wastewater Extract Protects Brain Cells in Vitro and ex Vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:5043-5049.
- Schieber, A.; Stintzing, F.; Carle, R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends in Food Science and Technology*. 12:401-413.
- Sensoz, S.; Demiral, I.; Gercel, H. F. 2006. Olive bagasse (*Olea europea L.*) pyrolysis. *Bioresource Technology*. 97:429-436.
- Servili, M.; Baldioli, M.; Selvaggini, R.; Macchioni, A.; Montedoro, G. 1999. Phenolic compounds of olive fruit: one and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of nüzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47:12-18.
- Shahidi, F. e Naczk, M. 2004. Phenolics in Food and Nutraceuticals. Boca Raton: CRC Press. 1-16; 132-238; 309-326p.
- Shi, J.; Mittal, G. ; Kim, E.; E Xue, S. J. 2007. Solubility of Carotenoids in Supercritical CO₂. *Food Reviews International*. 23:4:341-371.
- Soottitantawat, A. 2005. "Influence of emulsion size and powder morphology on the microencapsulation and stability of spray-dried flavors". Disponível em: www.bio.tottori-u.ac.jp/~kogaku/publication.htm. Acedido em: 27/11/2006.
- Tomás-Barberán, F.; Espin, J. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81:853-876.
- Tsimidou, M.; Papadopoulou, G.; Boskou, D. 1992. Determination of pheolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection. *Analytical Methods Section*. 44:53-60.
- Tuck, K.; Hayball, P. 2002. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13:636-644.
- Tuley, L. 1996. Update on controlled flavour release. *International food ingredients*. 3:14-18.
- Uccella, N. 2001. Olive biophenols: novel ethnic and technological approach, Review. *Trends in Food Science and Technology*. 11:328-339.
- Visioli, F.; Galli, C. 1994. Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sciences*. 55:1965-1971.
- Visioli, F.; Galli, C. 1998. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: New Findings. *Nutrition Reviews*. 56:142-147.
- Visioli, F.; Galli, C. 1998a. Olive Oil Phenols and Their Potential Effects on Human Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:4292-4296.
- Visioli, F.; Galli, C. 1999. Free Radical-Scavenging Actions of Olive Oil Phenolics. *Lipids*. 34, 315.
- Visioli, F.; Galli, C. 2002. Biological properties of olive oil phytochemicals. *Journal of Food Science and Nutrition*. 42:209-221.
- Visioli, F.; Bellosta, S.; Galli, C. 1998b. Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sciences*. 62:541-546.

Vitolo, S.; Petarca, L.; Bresci, B. 1999. Treatment of olive oil industry wastes. *Bioresource Technology*. 67:129-137.

Vlyssides, A.G.; Bouranis, D.; Loizides, M.; Karvouni, G. 1996. Study of a demonstration plant for the co-composting of olive oil processing wastewater and solid residue. *Bioresource Technology*. 56:187-193.

Vlyssides, A.G.; Loizides, M.; Karlis, P.K. 2004. Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *Journal of Cleaner Production*. 12:603-611.

Westing, L.L.; Reineccius, G.A.; Caporaso, F. 1988. Shelf-life of orange oil. Effects of encapsulation by spray-drying, extrusion, and molecular inclusion. In Risch, S.J.; Reineccius, G.A. (eds.), *Flavor encapsulation*. Washington DC. ACS Symposium Series 370. American Chemical Society. Cap. 12, pp. 110 -121.

Zarzuelo, A.; Duarte, J.; Jiménez, J.; González, M.; Utrilla, M. 1991. Vasodilator Effect of Olive Leaf. *Planta Medica*. 57:417-419.

www.casadoazeite.pt acedido a 24/10/2011

www.faostat.org acedido a 24/10/2011

www.ine.pt acedido a 24/10/2011

Anexos

ANEXO 1 - EXTRACÇÃO CONVENCIONAL

Os bagaços de azeitona foram sujeitos a uma extracção em aparelho de soxhlet, utilizando éter de petróleo como solvente orgânico.

Preparação do bagaço de azeitona para a extracção química:

1. Pesou-se **10 g** de bagaço de azeitona para placas de petri previamente forradas com folha de alumínio;
2. No fim do dia as placas foram colocadas na estufa a 100-105 °C (para retirar toda a humidade presente na amostra).

Metodologia de extracção química:

3. O bagaço de azeitona foi acondicionado na folha de alumínio, posteriormente furada (para que o solvente pudesse entrar em contacto com a amostra) e de seguida foi colocado num cartucho de filtro de papel da *whatman* de dimensões 28x100 mm e no topo do cartucho foi aplicado algodão.
4. O conjunto de extracção que envolveu um balão de fundo plano de 250 ml, um extractor soxhlet de 125 ml e um condensador foi montado.

O extractor soxhlet suportou o cartucho de filtro contendo o bagaço de azeitona e foi preenchido com esferas de vidro. O volume de solvente adicionado foi o suficiente para não comprometer a extracção, cerca de 200 ml de éter de petróleo para um soxhlet de 125 ml e um balão de fundo plano de 250 ml.

5. Durante 4 horas o solvente ficou em contacto com a matriz a saturar e passado esse tempo, o soxhlet foi conectado ao condensador e o conjunto de extracção foi montado numa tina com água mantida a $80 \pm 2^\circ\text{C}$ por uma cabeça termostaticada. A extracção terminou ao fim de 16 horas.

Recuperação do extracto etéreo:

6. Terminada a extracção, o solvente foi evaporado recorrendo a um rotavapor (*Rotavapor R-200, Heating bath B-490, Vacuum controller V-500 – Büchi*) e o balão de fundo plano contendo o extracto lipídico foi limpo com ácido clorídrico para eliminar resíduos de calcário e foi colocado em estufa (100-105°C) até se atingir peso constante e a massa de extracto foi determinada gravimetricamente em balança analítica. De cada bagaço de azeitona foram efectuadas quatro extracções químicas, que decorreram em simultâneo.

ANEXO 2 - DETERMINAÇÃO DOS POLIFENÓIS TOTAIS

A quantificação dos polifenóis totais foi determinada recorrendo ao método colorimétrico usando o reagente de Folin-Ciocalteu. Este método baseia-se na capacidade dos compostos fenólicos presentes na amostra reduzirem o reagente de folin-Ciocalteu em condições básicas (Matias, 2008).

Quadro I - Matrizes sujeitas à determinação dos Polifenóis Totais

Bagaço de Azeitona (Extracção Aquosa)	Extractos Supercríticos (Extracção por Metanol)
<ul style="list-style-type: none">• Bagaço Inicial <p>1ª Fase de Extracção Supercrítica</p> <ul style="list-style-type: none">• Bagaço dSC-CO₂ (condição A)• Bagaço dSC-CO₂ (condição B) <p>2ª Fase de Extracção Supercrítica</p> <ul style="list-style-type: none">• Bagaço c/ 10% Humidade• Bagaço c/ 15% Humidade• Bagaço c/ 20% Humidade• Bagaço c/ 40% Humidade	<p>2ª Fase de Extracção Supercrítica</p> <ul style="list-style-type: none">• Bagaço c/ 10% Humidade• Bagaço c/ 15% Humidade• Bagaço c/ 20% Humidade• Bagaço c/ 40% Humidade

1. Extracção aquosa do bagaço de azeitona antes e depois de extracção por CO₂ supercrítico

A extracção dos compostos fenólicos, no bagaço de azeitona, foi feita mediante o método interno (Almeida, 2009). Baseia-se numa extracção aquosa de razão matriz/solvente de 1:4. Todos os bagaços provenientes das diferentes condições de extracção por CO₂ supercrítico foram sujeitos à extracção aquosa realizada em placa de agitação durante 30 minutos e a 900 rpm. A separação dos sólidos foi efectuada por centrifugação durante 20 minutos a 4°C e a 9 000 rpm. Houve ainda a necessidade de se proceder a uma filtração sob vácuo usando um funil de *Büchner* para o efeito. Antes de se iniciar o ponto 4. uma diluição de 1:4 dos extractos (por se esperar uma concentração elevada de polifenóis devido ao tipo de matriz) foi realizada.

2. Extracção metanólica dos extractos supercríticos

Os extractos supercríticos resultantes dos quatro níveis de hidratação (10, 15, 20 e 40%) foram dissolvidos em metanol numa razão aproximada de 2:1 (m/v); à excepção do extracto supercrítico resultante do bagaço com 40% de humidade cuja razão foi de aproximadamente 1:1 (m/v) (por

limitação de amostra). A separação entre as fases alcoólica e lipídica foi estabelecida por centrifugação a 6 000 rpm durante 20 minutos e a 4 °C. Antes de se iniciar o ponto 4. uma diluição de 1:4 dos extractos foi realizada (por se esperar uma concentração elevada de polifenóis devido ao tipo de matriz).

3. *Extracção dos Compostos Bioactivos Encapsulados*

A extracção dos compostos bioactivos iniciou-se com a adição de 1 ml de DMSO em 250 mg de partículas encapsuladas durante uma hora e sob ligeira agitação. Este solvente garante a destruição das cápsulas libertando para o meio o extracto bioactivo. Findo o tempo, a determinação dos polifenóis inicia-se com o exposto no ponto 4.

4. Retirou-se 20 µL de extracto ao qual se adicionou 1580 µL de água destilada, seguido de 100 µL de reagente de Folin-Ciocalteu e 300 µL de uma solução saturada de Na₂CO₃. A solução é mantida numa estufa durante 30 minutos a 40 °C. Uma curva de calibração foi feita usando o ácido gálico como padrão numa gama de concentrações de 0 – 1000 mg/L. A absorvância é lida a 765 nm num espectrofotómetro (*Thermo Espectronic, Genesys10uv; U.S.A*).

Todos os ensaios descritos neste bloco foram feitos em duplicado, de forma independente e os resultados finais são expressos em equivalentes em ácido gálico (EAG)/L.

ANEXO 3 - ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE – MÉTODO DE ORAC

O ensaio consiste na adição de 25 μL de amostra (ou PBS – Branco), 150 μL de uma solução de fluoresceína diacetato (4×10^{-6} mM) e incuba-se a 37°C durante 10 minutos. Após incubação, adicionar 25 μL de AAPH (41,4 g/L) a cada um dos poços (suporte das amostras). A fluorescência da mistura reaccional é medida a cada 1 minuto, ao longo de 30 minutos à temperatura de 37°C ($\lambda_{\text{em}}=515$ nm, $\lambda_{\text{ex}}=493$ nm). Todas as soluções são preparadas em PBS (75 mM, pH 7.4).

Selecionou-se o Trolox como composto fenólico padrão, pelo que, em cada ensaio, é necessário efectuar uma recta de calibração com soluções padrão de Trolox (0, 5, 10, 20, 40, 50 μM). Os resultados finais de ORAC são calculados através da regressão linear entre os valores de concentração de Trolox e a área abaixo da curva de fluorescência (AUC), sendo expressos em equivalentes de Trolox (Capacidade Antioxidante em Equivalentes de Trolox - μM CAET).

Preparação do Phosphate Buffer Saline

De seguida encontram-se as massas dos compostos necessários para preparar 1 litro de PBS (PBS – Phosphate Buffer Saline) (75 mM, pH 7.4).

Quadro II – Massas dos compostos necessários para preparar 1 litro de PBS (75mM, pH 7.4).

	Massa (g)
NaCl	8,0047
KH ₂ PO ₄	1,5305
Na ₂ HPO ₄	10,8118
KCl	0,2022

Solubilizar em água até quase perfazer o volume final de 1 litro, sob agitação. Ajustar o pH, caso necessário utilizando KH₂PO₄. Transferir para um balão e ajustar o volume.

ANEXO 4 - ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE – MÉTODO DE HORAC

O ensaio consiste na adição de 10 μL de amostra (ou PBS – Branco), 180 μL de uma solução de fluoresceína ($4 \times 10^{-6} \text{mM}$) e incuba-se a 37 °C durante 10 minutos e adiciona-se 5 μL de H_2O_2 (1,1 M). Após incubação, adicionar 5 μL de CoF_2 a cada um dos poços. A fluorescência da mistura reaccional é medida a cada 1 minuto, ao longo de 30 minutos à temperatura de 37°C ($\lambda_{\text{em}}=515 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}}=493 \text{ nm}$). Todas as soluções são preparadas em PBS (75 mM, pH 7.4).

Seleccionou-se o ácido cafeico como composto fenólico padrão, pelo que, em cada ensaio, é necessário efectuar uma recta de calibração com soluções padrão de ácido cafeico (0, 100, 200, 300, 400, 600 μM). Os resultados finais de HORAC são calculados através da regressão linear entre os valores de concentração de ácido cafeico a área abaixo da curva de fluorescência (AUC), sendo expressos em equivalentes de ácido cafeico (Capacidade Antioxidante em Equivalentes de Ácido Cafeico - μM CAEAC).

ANEXO 5 – QUANTIFICAÇÃO DA FRACÇÃO LIPÍDICA POR EXTRACÇÃO CONVENCIONAL (ÉTER-DE-PETRÓLEO) DOS DIFERENTES BAGAÇOS

Quadro III – Quantificação dos ácidos gordos

Ácidos Gordos		g ácidos gordos/100 g bagaço de azeitona (bs)				g ácidos gordos/g óleo			
		Arbosana		Arbequina	Koroneiki	Arbosana		Arbequina	Koroneiki
		Nº Carbonos	Nome vulgar			1ª Extracção	2ª Extracção		
C14:0	Ácido mirístico	0,002	0,002	0,003	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
C16:0	Ácido palmítico	1,721	1,199	1,437	0,941	0,137	0,132	0,127	0,113
C16:1	Ácido palmítoleico	0,133	0,098	0,146	0,074	0,011	0,011	0,013	0,009
C17:0	Ácido margárico	0,018	0,011	0,010	0,004	0,001	0,001	0,001	0,001
C17:1	Ácido margaroleico	0,030	0,021	0,019	0,008	0,002	0,002	0,002	0,001
C18:0	Ácido esteárico	0,266	0,183	0,198	0,190	0,021	0,020	0,017	0,023
C18:1	Ácido oleico	8,602	6,238	7,611	5,765	0,683	0,685	0,674	0,695
C18:2	Ácido linoleico	1,053	0,806	1,206	0,800	0,084	0,089	0,107	0,096
C18:3	Ácido linolénico	0,094	0,065	0,070	0,066	0,007	0,007	0,006	0,008
C20:0	Ácido araquídico	0,050	0,036	0,041	0,035	0,004	0,004	0,004	0,004
C20:1	Ácido gadoleico	0,031	0,024	0,034	0,023	0,002	0,003	0,003	0,003
C22:0	Ácido beénico	0,025	0,018	0,016	0,016	0,002	0,002	0,001	0,002
C24:0	Ácido lignocérico	0,010	0,007	0,008	0,006	0,001	0,001	0,001	0,001

Quadro IV – Quantificação dos esteróis

Esteróis	mg estero/100 g Bagaço (base seca)				mg estero/g óleo			
	Arbosana 1ª Extracção	Arbosana 2ª Extracção	Arbequina	Koroneiki	Arbosana 1ª Extracção	Arbosana 2ª Extracção	Arbequina	Koroneiki
Colesterol	0,318	0,21	0,265	0,232	0,025	0,023	0,023	0,028
Campesterol	2,125	1,485	1,741	1,528	0,169	0,163	0,154	0,184
Estigmasterol	1,005	0,607	0,594	0,350	0,080	0,067	0,053	0,042
beta -Sitosterol	53,62	36,804	44,23	35,817	4,257	4,037	3,918	4,320
Delta - 7 - Estigmastenol	0,052	0,048	0,079	0,08	0,004	0,005	0,007	0,010
Delta - 7 - Avestanol	0,123	0,094	0,109	0,096	0,010	0,010	0,010	0,012
Eritrodíol	19,53	12,12	8,00	7,90	1,550	1,329	0,708	0,952
Uvaol	3,84	2,59	0,96	0,74	0,305	0,284	0,085	0,089
Esteróis Totais (mg/Kg)	4552,87	4314,59	4178,44	4601,42				
Peso da amostra (g)	5,01	5,01	4,11	4,88				

ANEXO 6 - DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DAS AMOSTRAS DE BAGAÇO DE AZEITONA LIOFILIZADO APÓS MOENDA

Quadro V – Distribuição da fracção mássica por tamanho médio de partícula

Crivos	Fracção Retida(g)	Fracção Mássica (%)	% cumulativa	Incremento	D_{p_i} (mm)	\overline{DP}_i (mm)	x_i	$\frac{x_i}{\overline{DP}_i}$	$\frac{x_i}{\overline{DP}_i^3}$	$\overline{D}_s = \frac{1}{\sum_{i=1}^n (x_i / D_{p_i})}$	$\overline{D}_v = \left[\frac{1}{\sum_{i=1}^n \frac{x_i}{\overline{DP}_i^3}} \right]^{1/3}$	$\overline{D}_w = \frac{\sum_{i=1}^n x_i \cdot \overline{DP}_i^4}{\sum_{i=1}^n x_i \cdot \overline{DP}_i^3}$
D5 2 mm	0,5	0,3	0,3	[2-1[2	2	0,0028	0,0014	0,0003			
D4 1 mm	34,6	19,2	19,4	[1-0,5[1	1,5	0,1917	0,1278	0,0568	0,3276	0,2541	0,5836
D3 0,5 mm	24,2	13,4	32,9	[0,5-0,355[0,5	0,75	0,1341	0,1788	0,3178	mm	mm	mm
D2 0,355 mm	46,3	25,7	58,5	[0,355-0,032[0,355	0,4275	0,2565	0,6000	3,2832			
D1 0,032 mm	74,9	41,5	100,0	[0,032-Colector[0,032	0,1935	0,4150	2,1445	57,2746			
D0 Colector	0	0,0	100,0	Colector	–	0	0	0	0			

Sendo que:

\overline{D}_S – Diâmetro médio volume-superfície

\overline{D}_V – Diâmetro volumétrico médio

\overline{D}_M – Diâmetro médio mássico

ANEXO 7 – CONDIÇÕES DE EXTRACÇÃO POR CO₂ SUPERCRÍTICO (A e B) ESTERÓIS

Quadro VI – Quantificação dos Esteróis - Condição A de Extracção Supercrítica

Esteróis	mg esterol/100 g Bagaço (base seca)		mg esterol/g oleo		EQ (16H)
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 1 (30 min)	Ponto 2 (60 min)	
Colesterol	0,073	0,071	0,014	0,014	0,025
Campesterol	0,752	0,736	0,147	0,151	0,169
Estigmasterol	0,318	0,297	0,062	0,062	0,080
β-Sitosterol	21,166	20,453	4,148	4,201	4,257
Δ-7-Estigmastenol	0,026	0,020	0,005	0,004	0,004
Δ-7-Avestanol	0,041	0,063	0,008	0,013	0,010
Eritrodiol	3,88	5,93	0,760	1,218	1,550
Uvaol	0,59	0,86	0,116	0,177	0,305
Esteróis Totais (mg/Kg)	4402,72	4463,32			4552,87
Peso da amostra (g)	1,02	1,04			5,01

Quadro VII - Quantificação dos Esteróis - Condição B de Extracção Supercrítica

Esteróis	mg esterol/100 g Bagaço (base seca)		mg esterol/g oleo		EQ (16H)
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 1 (Pré-tratamento+30 min)	Ponto 2 (60 min)	
Colesterol	0,062	0,056	0,020	0,009	0,025
Campesterol	0,352	1,069	0,111	0,166	0,169
Estigmasterol	0,158	0,452	0,050	0,050	0,080
β-Sitosterol	10,047	28,838	3,185	4,491	4,257
Δ-7-Estigmastenol	0,021	0,043	0,007	0,007	0,004
Δ-7-Avestanol	0,023	0,068	0,007	0,011	0,010
Eritrodiol	1,85	5,73	0,586	0,892	1,550
Uvaol	0,32	0,83	0,101	0,130	0,305
Esteróis Totais (mg/Kg)	3400,68	4768,28			4552,87
Peso da amostra (g)	0,63	1,81			5,01

ANEXO 8 – INFLUÊNCIA DO TEOR DE HUMIDADE NA EXTRACÇÃO SUPERCRÍTICA POR CO₂ - ESTERÓIS

Quadro VIII - Quantificação dos Esteróis

Esteróis	mg esterol/100 g Bagaço (base seca)				EQ
	10% H	15% H	20% H	40% H	
Colesterol	0,124	0,124	0,137	0,120	0,318
Campesterol	1,669	1,905	2,001	1,261	2,125
Estigmasterol	0,738	0,855	0,911	0,574	1,005
β-Sitosterol	42,716	49,727	52,540	32,387	53,62
Δ-7-Estigmastenol	0,089	0,065	0,076	0,041	0,052
Δ-7-Avestanol	0,038	0,042	0,068	0,044	0,123
Eritrodiol	12,63	14,24	15,90	11,79	19,53
Uvaol	2,00	2,34	1,93	1,79	3,84
Esteróis Totais (mg/Kg)	4576,13	4411,39	4356,00	4455,02	4552,87
Peso da amostra (g)	1,51	1,52	1,54	1,44	5,01

Quadro IX - Quantificação dos Esteróis

Esteróis	mg esterol/g oleo				EQ (16H)
	10 % H	15% H	20%	40%	
Colesterol	0,012	0,010	0,011	0,015	0,025
Campesterol	0,168	0,159	0,156	0,163	0,169
Estigmasterol	0,074	0,074	0,071	0,074	0,080
β-Sitosterol	4,295	4,148	4,094	4,178	4,257
Δ-7-Estigmastenol	0,009	0,005	0,006	0,005	0,004
Δ-7-Avestanol	0,004	0,004	0,005	0,006	0,010
Eritrodiol	1,270	1,188	1,239	1,521	1,550
Uvaol	0,201	0,195	0,150	0,231	0,305

ANEXO 9 – CONDIÇÕES DE EXTRACÇÃO POR CO₂ SUPERCRÍTICO – ÁCIDOS GORDOS

Quadro X – Quantificação dos Ácidos Gordos – Condição A

Massa Extracto (2,1503
Massa Bagaço (g 42,1367
Conversão Lipídica (g ácido ç 0,956
Área Total [µV.s] 14857582,43

Massa Extracto 2,0513
Massa Bagaço 42,1367
Área Total [µV.s] 16124356,97

Massa Extracto (0,648
Massa Bagaço (g 42,1367
Área Total [µV.s] 9716456,39

Massa Extracto (0,2522
Massa Bagaço (g 42,1367
Área Total [µV.s] 7864174,24

Ácidos Gordos		PONTO 1 - 30 MIN				PONTO 2 - 60 MIN				PONTO 3 - 60 MIN				PONTO 4 - 60 MIN			
Nº Carbonos	Nome vulgar	Resultados (%)	g ácido gordo/ 100 g óleo	g ácido gordo/ g extracto	g ácido gordo/100 g bagaço (bs)	Resultados (%)	g ácido gordo/ 100g óleo	g ácido gordo/ g extração	g ácido gordo/100 g bagaço (bs)	Resultados (%)	g ácido gordo/ 100 g óleo	g ácido gordo/ g extração	g ácido gordo/100 g bagaço (bs)	Resultados (%)	g ácido gordo/ 100 g óleo	g ácido gordo/ g extração	g ácido gordo/100 g bagaço (bs)
C14:0	Ácido mirístico	0,03	0,0268	0,000576549	0,0014	0,02	0,022341	0,0005	0,00109	0,0310	0,029662	0,000192	0,00046	0,0754	0,07208	0,00018	0,000431
C16:0	Ácido palmítico	13,71	13,1052	0,2818	0,6688	13,0438	12,469862	0,2558	0,60706	12,44	11,888898	0,077040	0,18283	12,82	12,25482	0,03091	0,073349
C16:1	Ácido palmítico	1,13	1,07789	0,0232	0,0550	1,01	0,966380	0,0198	0,04705	0,87	0,834261	0,005406	0,01283	0,91	0,86901	0,00219	0,005201
C17:0	Ácido margárico	0,13	0,12344	0,0027	0,0063	0,13	0,126434	0,0026	0,00616	0,13	0,123175	0,000798	0,00189	0,12	0,11946	0,00030	0,000715
C17:1	Ácido margaroleico	0,25	0,23504	0,0051	0,0120	0,26	0,244155	0,0050	0,01189	0,22	0,207122	0,001342	0,00319	0,20	0,18990	0,00048	0,001137
C18:0	Ácido esteárico	1,98	1,89632	0,0408	0,0968	2,17	2,073005	0,0425	0,10092	2,42	2,315689	0,015006	0,03561	2,29	2,19319	0,00553	0,013127
C18:1	Ácido oleico	72,02	68,84914	1,4805	3,5135	72,623	69,427367	1,4242	3,37986	72,83	69,629668	0,451200	1,07080	72,87	69,66025	0,17568	0,416936
C18:2	Ácido linoleico	9,10	8,70110	0,1871	0,4440	8,93	8,538695	0,1752	0,41568	9,01	8,615371	0,055828	0,13249	8,73	8,34802	0,02105	0,049965
C18:3	Ácido linolénico	0,88	0,83918	0,0180	0,0428	0,84	0,804534	0,0165	0,03917	0,80	0,765516	0,004961	0,01177	0,80			
															0,76118	0,00192	0,004556
C20:0	Ácido araquídico	0,35	0,33454	0,0072	0,0171	0,42	0,406186	0,0083	0,01977	0,51	0,490667	0,003180	0,00755	0,52	0,49351	0,00124	0,002954
C20:1	Ácido gadoleico	0,23	0,22287	0,0048	0,0114	0,27	0,261777	0,0054	0,01274	0,32	0,309823	0,002008	0,00476	0,25	0,24249	0,00061	0,001451
C22:0	Ácido beárico	0,15	0,14237	0,0031	0,0073	0,20	0,191167	0,0039	0,00931	0,29	0,277654	0,001799	0,00427	0,29	0,27312	0,00069	0,001635
C24:0	Ácido lignocárico	0,05	0,04611	0,0010	0,0024	0,07	0,068098	0,0014	0,00332	0,12	0,112495	0,000729	0,00173	0,13	0,12297	0,00031	0,000736
		100,00				100,00	95,600000	1,9610	4,65	100,00				100,00			
	Isómeros Transoleicos	0,04				0,01				0,08				0,02			
	Isómeros Translinoleicos+ Translinolénicos	0,04				0,02				0,01				0,01			

Quadro XI – Quantificação dos Ácidos Gordos – Condição B

Massa Extracto (1,4039
Massa Bagaço (g 44,5005
Conversão Lipídica (g ácido gord 0,956
Área Total [μV.s] 11379876,63

Massa Extracto (2,8576
Massa Bagaço (g 44,5005
Área Total [μV.s] 16355321,76

Massa Extracto (0,9756
Massa Bagaço (g 44,5005
Área Total [μV.s] 18550072,51

Massa Extracto (0,4188
Massa Bagaço (g 44,5005
Área Total [μV.s] 19997655,24

Ácidos Gordos		PONTO 1 - 1H Incubação + 30 MIN				PONTO 2 - 60 MIN				PONTO 3 - 60 MIN				PONTO 4 - 60 MIN			
Nº Carbonos	Nome vulgar	Resultados (%)	g ácido gordo/ 100 g óleo	g ácido gordo/ g extracto	g ácido gordo/100 g	Resultados (%)	g ácido gordo/ 100g óleo	g ácido gordo/ g extração	g ácido gordo/100 g	Resultados (%)	g ácido gordo/ 100 g óleo	g ácido gordo/ g	g ácido gordo/100 g	Resultados (%)	g ácido gordo/ 100 g	g ácido gordo/ g	g ácido gordo/100 g
C14:0	Ácido mirístico	0,03	0,0263	0,0004	0,0008	0,02	0,020945	0,0006	0,00135	0,0226	0,021604	0,000211	0,00047	0,0289	0,02766	0,00012	0,000260
C16:0	Ácido palmítico	13,18	12,5994	0,1769	0,3975	13,6300	13,030302	0,3724	0,83674	11,72	11,202022	0,109287	0,24559	12,16	11,62304	0,04868	0,109386
C16:1	Ácido palmítico	1,11	1,06534	0,0150	0,0336	1,09	1,041308	0,0298	0,06687	0,80	0,768930	0,007502	0,01686	0,87	0,83270	0,00349	0,007837
C17:0	Ácido margárico	0,19	0,17753	0,0025	0,0056	0,13	0,123838	0,0035	0,00795	0,13	0,123737	0,001207	0,00271	0,13	0,12348	0,00052	0,001162
C17:1	Ácido margaroleico	0,24	0,22651	0,0032	0,0071	0,24	0,234152	0,0067	0,01504	0,21	0,204712	0,001997	0,00449	0,22	0,21073	0,00088	0,001983
C18:0	Ácido esteárico	1,87	1,78303	0,0250	0,0563	2,03	1,941702	0,0555	0,12469	2,48	2,368212	0,023104	0,05192	2,45	2,34204	0,00981	0,022041
C18:1	Ácido oleico	72,61	69,41172	0,9745	2,1898	72,198	69,021064	1,9723	4,43219	74,00	70,746862	0,690206	1,55101	73,40	70,17077	0,29388	0,660386
C18:2	Ácido linoleico	9,22	8,81118	0,1237	0,2780	9,02	8,626142	0,2465	0,55393	8,49	8,118181	0,079201	0,17798	8,66	8,27567	0,03466	0,077883
C18:3	Ácido linolénico	0,86	0,82225	0,0115	0,0259	0,84	0,798794	0,0228	0,05129	0,77	0,731672	0,007138	0,01604	0,80	0,76621	0,00321	0,007211
C20:0	Ácido araquídico	0,32	0,30653	0,0043	0,0097	0,35	0,338618	0,0097	0,02174	0,59	0,564727	0,005509	0,01238	0,55	0,53033	0,00222	0,004991
C20:1	Ácido gadoleico	0,22	0,20984	0,0029	0,0066	0,23	0,215988	0,0062	0,01387	0,32	0,307927	0,003004	0,00675	0,33	0,31267	0,00131	0,002943
C22:0	Ácido beénico	0,13	0,12149	0,0017	0,0038	0,17	0,160397	0,0046	0,01030	0,32	0,306459	0,002990	0,00672	0,29	0,27769	0,00116	0,002613
C24:0	Ácido lignocérico	0,04	0,03880	0,0005	0,0012	0,05	0,046749	0,0013	0,00300	0,13	0,120063	0,001171	0,00263	0,10	0,09899	0,00041	0,000932
		100,00		0,000000	0,0000	100,00	95,600000	2,7319	6,14	99,98				100,0			
	Isómeros Transoleicos	0,17				0,01				0,02				0,03			
	Isómeros Translinoleicos+Translinolénicos	0,04				0,02				0,02				0,02			

ANEXO 10 – INFLUÊNCIA DO TEOR DE HUMIDADE NA EXTRACÇÃO POR CO₂ SUPERCRÍTICO – ÁCIDOS GORDOS

Quadro XII – Quantificação dos Ácidos Gordos

Massa Extracto (g)	3,942
Massa Bagaço (g BS)	39,6342
Conversão Lipídica	0,956
Área Total [μ V.s]	14906180,90

Massa Extracto (g)	4,7671
Massa Bagaço (g BS)	39,7667
Área T total [μ V.s]	17228439,11

Massa Extracto (g)	6,2703
Massa Bagaço (g BS)	48,9000
Área T total [μ V.s]	14114103,23

Ácidos Gordos		PONTO 10% - 1H Incubação + 210 MIN				PONTO 15% - 1H Incubação + 210 MIN				PONTO 20% - 1H Incubação + 210 MIN			
Nº Carbonos	Nome vulgar	Resultados (%)	g ácido gordo/ 100 g óleo	g ácido gordo/ g extracto	g ácido gordo/100 g bagaço (bs)	Resultados (%)	g ácido gordo/ 100 g óleo	g ácido gordo/ g extracto	g ácido gordo/100 g bagaço (bs)	Resultados (%)	g ácido gordo/ 100 g óleo	g ácido gordo/ g extracto	g ácido gordo/100 g bagaço (bs)
C14:0	Ácido mirístico	0,86	9,6517	13511,2619	610,6426	1,09	12,2679	17173,6255	776,1635	0,77	8,6083	12050,5993	544,6279
C16:0	Ácido palmítico	624,07	6999,1564	9797962,2893	442819,7344	714,81	8016,9068	11222688,1914	507210,3421	599,40	6722,4539	9410612,5717	425313,4312
C16:1	Ácido palmíticoico	49,02	549,80924	769665,6431	34785,1038	54,85	615,19204	861193,5541	38921,7155	46,51	521,68240	730291,5124	33005,5867
C17:0	Ácido margárico	6,07	68,10584	95339,8357	4308,8919	7,04	78,96869	110546,4949	4996,1582	5,90	66,22418	92705,7415	4189,8438
C17:1	Ácido margaroleico	11,22	125,78450	176082,9068	7958,0819	13,01	145,94294	204302,2583	9233,4578	10,58	118,70397	166171,0226	7510,1134
C18:0	Ácido esteárico	100,00	1121,53690	1570014,3850	70956,9329	116,86	1310,60696	1834689,3275	82918,9393	95,94	1075,99096	1506255,6436	68075,3512
C18:1	Ácido oleico	3317,95	37211,98339	52092222,00373	2354312,3796	3839,70	43063,67521	60283874,3013	2724534,7980	3143,82	35259,13927	49358479,2621	2230760,6451
C18:2	Ácido linoleico	399,69	4482,64737	6275157,6472	283606,2806	459,13	5149,32181	7208420,2559	325785,1632	368,34	4131,05378	5782969,6540	261361,8027
C18:3	Ácido linolénico	37,41	419,54604	587313,1067	26543,6655	43,54	488,31563	683582,1166	30894,5516	33,10	371,19243	519623,9614	23484,4489
C20:0	Ácido araquídico	18,49	207,33852	290248,5501	13117,8078	22,48	252,17039	353007,6873	15954,2123	18,13	203,32043	284623,7157	12863,5929
C20:1	Ácido gadoleico	12,89	144,60856	202434,2905	9149,0349	16,93	189,90889	265849,1959	12015,0769	12,00	134,55205	188356,3977	8512,7833
C22:0	Ácido beénico	8,83	98,99456	138580,2727	6263,1471	11,25	126,19718	176660,6074	7984,1911	8,18	91,71541	128390,3420	5802,6124
C24:0	Ácido lignocérico	2,97	33,29222	46605,0317	2106,3183	3,74	41,95855	58736,8407	2654,6165	2,92	32,69901	45774,6143	2068,7876
		4589,46				5304,46				4345,58			
	Isómeros Transoleicos	1,29				0,02				0,03			
	Isómeros Translinoleicos+Translinolénicos	2,69				0,03				0,02			