

Obtenção de Extratos de Bagaço de Azeitona e Avaliação da sua Bioatividade

Julieta Gonçalves Diogo

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientadoras:

Professora Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente,
Professora Doutora Natália Maria Ferreira Rebelo de Melo Osório

Júri:

Presidente

Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor auxiliar do Instituto Superior de
Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais:

Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora associada com
agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa,
orientadora;

Doutora Carla Sofia Ramos Tecelão, Professora Adjunta da Escola Superior de
Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria.

Agradecimentos

Começo por agradecer à minha orientadora do Instituto Superior de Agronomia, Professora Doutora Suzana Ferreira-Dias, que me transmitiu valiosos conhecimentos, tanto para a escrita do relatório como para o meu futuro profissional. A sua disponibilidade muito contribuiu para que esta tenha sido uma experiência muito positiva.

Agradeço também à minha orientadora da Escola Superior de Tecnologia do Barreiro, Professora Doutora Natália Osório, que sempre esteve presente e me motivou, mostrando-se disponível para prestar qualquer esclarecimento e ajuda, ao longo deste projeto.

Agradeço à Professora Fátima Peres, da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, pelo fornecimento dos bagaços usados como matéria-prima neste projeto.

A minha gratidão a toda a equipa integrante dos laboratórios do ISA, que esteve sempre disponível para me ajudar.

Tenho de agradecer também à minha família, que me deu sempre todo o apoio necessário e que muito investiu no meu percurso académico, tendo sido uma peça fundamental para concluir esta etapa.

Grata ao Pedro, que me deu sempre tanta força, motivação e carinho ao longo desta reta final.

Por último, e de maneira nenhuma menos importante, agradeço aos meus amigos, que estiveram comigo ao longo deste caminho, nos altos e nos baixos.

O Instituto Superior de Agronomia tornou-se um local de que guardarei grandes memórias. Estou grata a todos os seus docentes e não-docentes que me ajudaram ao longo deste percurso.

Índice

<i>Agradecimentos</i>	<i>i</i>
<i>Índice de Figuras</i>	<i>iv</i>
<i>Índice de Tabelas</i>	<i>v</i>
<i>Lista de Siglas e Abreviaturas</i>	<i>vi</i>
<i>Resumo</i>	<i>vii</i>
<i>Palavras – Chave</i>	<i>vii</i>
<i>Abstract</i>	<i>viii</i>
<i>Keywords</i>	<i>viii</i>
1. Objetivos	1
2. Introdução (Enquadramento teórico)	1
2.1. Caracterização da Árvore e do Fruto	1
2.2. Azeite	2
2.2.1. Tecnologia do azeite	3
2.3. Caracterização do sector oleícola	6
2.3.1. Impacto ambiental dos subprodutos da indústria de extração de azeite	6
2.4. Bagaço de Azeitona	8
2.4.1. Atividade antioxidante	9
2.4.2. Atividade anti-inflamatória	11
2.4.3. Atividade antimicrobiana	13
2.5. Processo de extração de compostos bioativos	15
3. Material e Métodos	18
3.1. Recolha e preparação das amostras	18
3.2. Caracterização dos bagaços de azeitona	18
3.2.1. Teor de Humidade	18
3.2.2. Teor de cinza	19
3.2.3. Teor de extrativos pelo método de Soxhlet	19
3.2.4. Determinação do teor de lenhina	20
3.2.4.1. Lenhina de Klason	20

3.2.4.2.	<i>Lenhina solúvel</i>	21
3.3.	<i>Otimização das condições operacionais de extração</i>	21
3.4.	<i>Análise dos compostos bioativos</i>	24
3.4.1.	<i>Determinação do teor total de compostos fenólicos</i>	24
3.4.2.	<i>Quantificação da Capacidade Antioxidante</i>	25
3.4.2.1.	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)</i>	25
3.4.2.2.	<i>2,2-difenil-1-picri-hidrazilo (DPPH)</i>	26
3.5.	<i>Avaliação da bioatividade dos compostos produzidos</i>	27
3.5.1.	<i>Atividade antimicrobiana:</i>	27
3.5.2.	<i>Atividade anti-inflamatória:</i>	29
3.6.	<i>Tratamento estatístico dos resultados multivariados</i>	30
4.	<i>Tratamento e discussão de Resultados</i>	31
4.1.	<i>Caracterização química</i>	31
4.2.	<i>Otimização das condições operacionais</i>	32
4.3.	<i>Condições matriz fatorial selecionada (otimizada)</i>	37
4.4.	<i>Avaliação da bioatividade dos compostos produzidos</i>	39
4.4.1.	<i>Atividade anti-inflamatória</i>	39
4.4.2.	<i>Caracterização dos extratos com base na sua atividade antioxidante e anti-inflamatória</i> 40	
4.4.3.	<i>Atividade antimicrobiana</i>	44
5.	<i>Conclusões</i>	50
6.	<i>Perspetivas futuras</i>	51
	<i>Referências Bibliográficas</i>	52
	<i>Anexos</i>	65

Índice de Figuras

<i>Figura 1- Tipos de sistemas de extração de azeite.</i>	5
<i>Figura 2- Esquema ilustrativo do método de determinação da concentração bactericida mínima</i>	28
<i>Figura 3- Gráfico de superfície de resposta tridimensional: DPPH vs U.S vs ETOH%</i>	35
<i>Figura 4- Gráfico de superfície de resposta tridimensional: FRAP vs U.S vs ETOH%</i>	37
<i>Figura 5- Projeções das variáveis no plano definido pelas duas primeiras componentes principais (IX2)</i>	42
<i>Figura 6- Projeção das amostras no plano definido pelas duas primeiras componentes principais (IX2)</i>	43
<i>Figura 7- Dendrograma dos extratos obtido pela análise Cluster</i>	44
<i>Figura 8- Atividade antimicrobiana contra Salmonella typhimurium CIP 6062</i>	46
<i>Figura 9- Atividade antimicrobiana contra Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853</i>	46
<i>Figura 10- Atividade antimicrobiana contra Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>	46
<i>Figura 11- Atividade antimicrobiana contra Escherichia coli ATCC 25922</i>	46
<i>Figura 12- Atividade antimicrobiana contra Klebsiella pneumoniae ATCC 9997</i>	47
<i>Figura 13- CBM dos extratos contra Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853</i>	49
<i>Figura 14- CBM dos extratos contra Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>	49
<i>Figura 15- CBM dos extratos contra Salmonella typhimurium CIP 6062</i>	49
<i>Figura 16- CBM dos extratos contra Escherichia coli ATCC 25922</i>	49
<i>Figura 17- Controlos dos extratos e solvente etanol (Atividade antimicrobiana)</i>	65

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1- Matriz de otimização de extração bagaço UCASUSL</i>	22
<i>Tabela 2- Matriz com as condições de extração para todas as amostras</i>	23
<i>Tabela 3- Composição química média da matéria-prima</i>	31
<i>Tabela 4- Teor de fenóis totais e atividade antioxidante, avaliada pelos métodos DPPH e FRAP, das amostras de bagaço UCASUL sujeitos a diferentes condições de extração</i>	33
<i>Tabela 5- Efeitos lineares e interações dos fatores T, t, solvente e tempo de aplicação de U.S no teor de fenóis dos extratos de bagaço UCASUL</i>	34
<i>Tabela 6- Efeitos lineares e interações dos fatores T, t, solvente e tempo de aplicação de U.S nos valores de DPPH dos extratos de bagaço UCASUL</i>	35
<i>Tabela 7- Efeitos lineares e interações dos fatores T, t, solvente e tempo de aplicação de U.S nos valores de FRAP dos extratos de bagaço UCASUL</i>	36
<i>Tabela 8- Condições de extração do bagaço industrial e dos bagaços monovarietais e resultados TFT, DPPH e FRAP</i>	38
<i>Tabela 9- Resultados atividade anti-inflamatória dos extratos</i>	39
<i>Tabela 10- Matriz de correlação entre variáveis</i>	41
<i>Tabela 11- Valores próprios da matriz de correlação e estatísticas relacionadas (PCA-extratos)</i>	41
<i>Tabela 12- Resultados gerais da atividade antimicrobiana dos extratos</i>	45
<i>Tabela 13- Concentração Bactericida Mínima dos extratos</i>	48

Lista de Siglas e Abreviaturas

ATCC - American Type Culture Collection

CBO₅ - Carência Bioquímica De Oxigênio

CIP - Collection de l'Institut Pasteur

COI- Conselho Oleícola Internacional

CQO- Carência Química de Oxigênio

DPPH - 2,2-difenil-1-picri-hidrazilo

FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power

IM- Índice de maturação

INE - Instituto Nacional de Estatística

MAGs - Monoacilgliceróis

ONU- Organização das Nações Unidas

TAGs- Triacilgliceróis

TAPPI- Technical Association of the Pulp and Paper Industry

TFT- Teor Fenólicos Totais

U.S – Ultrassons

UCASUL - União de Cooperativas Agrícolas do Sul

UFC - Unidade Formadora de Colônia

λ – Comprimento de onda

Resumo

O presente trabalho tem como objetivo a obtenção de extratos ricos em compostos bioativos de valor acrescentado, a partir de bagaços de azeitona, subproduto usualmente não explorado e causador de poluição, utilizando processos não poluentes, segundo os princípios da economia circular.

Utilizaram-se dois bagaços de azeitona monovarietais (Galega e Cobrançosa) e um bagaço industrial proveniente de azeitonas de cultivares desconhecidos.

A extração dos compostos bioativos presentes nos bagaços de azeitona foi executada com auxílio da tecnologia de ultrassons e por solventes permitidos na indústria alimentar. As condições foram otimizadas de modo a maximizar as bioatividades dos extratos etanólicos e aquosos quanto à sua atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória.

Os resultados revelaram que as condições de extração que forneceram os melhores resultados em termos teor de capacidade antioxidante incluíram tratamentos de ultrassons (15min), extração com solvente etanol (100%) e mistura de solventes (água/etanol 50:50), um tempo de extração de 30 minutos e uma faixa de temperatura de 30-40 °C.

As amostras com maior capacidade antioxidante foram as amostras provenientes do bagaço de azeitona da cultivar Cobrançosa, com valores de DPPH entre 63,86 - 84,75 de %IC50 e 80,24 - 97,09 [trolox] mg/g amostra de FRAP, seguidos pelos extratos obtidos da cultivar Galega, e os extratos obtidos usando os bagaços industriais apresentaram os valores mais baixos.

Todos os extratos possuem propriedades anti-inflamatórias elevadas e os extratos obtidos com etanol apresentaram capacidade antimicrobiana contra bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O extrato obtido do bagaço de azeitona da cultivar Cobrançosa com etanol (C-ETOH) apresentou os melhores resultados de Concentração Bactericida Mínima (0,625 g bagaço/100 mL) para as diferentes bactérias analisadas, seguido pelo extrato obtido do bagaço de azeitona da cultivar Galega (G-ETOH), e o extrato obtido do bagaço industrial UCASUL (U-ETOH) apresentou a menor Concentração Bactericida Mínima (2,5 g bagaço/100 mL).

Palavras – Chave

Bagaço de azeitona, compostos bioativos, antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória.

Abstract

The present work aims to obtain added value extracts rich in bioactive compounds, from olive pomace, a by-product usually not exploited and causing pollution, using non-polluting processes, according to the principles of circular economy.

Two monocultivar olive pomaces (Galega and Cobrançosa) and an industrial pomace from olives of unknown cultivars were used.

The extraction of bioactive compounds present in olive pomace was carried out using ultrasound technology and solvents allowed in the food industry. The conditions were optimized in order to maximize the bioactivities of the ethanolic and aqueous extracts in terms of their antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities.

The results showed that the extraction conditions that provided the best results in terms of antioxidant capacity included ultrasound treatment (15min), extraction with ethanol solvent (100%) or with a solvent mixture (water/ethanol 50:50), an extraction time of 30 min and a temperature range of 30-40 °C.

The samples with the highest antioxidant capacity were those from the olive pomace of the Cobrançosa cultivar, with DPPH values between 63.86-84.75 of %IC50 and 80.24-97.09 [trolox] mg/g sample of FRAP, followed by the extracts obtained from the Galega cultivar, and the extracts obtained using industrial bagasse showed the lowest values.

All extracts have high anti-inflammatory properties and the extracts obtained with ethanol showed antimicrobial capacity against *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria.

The extract obtained from olive pomace of the Cobrançosa cultivar with ethanol (C-ETOH) showed the best results of Minimum Bactericidal Concentration (0.625 g pomace/100 mL) for the different bacteria analyzed, followed by the extract obtained from the olive pomace of the Galega cultivar (G-ETOH), while the extract obtained from UCASUL industrial pomace (U-ETOH) showed the lowest Minimum Bactericidal Concentration (1,25 g pomace/100 mL).

Keywords

Olive pomace, bioactive compounds, antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory.

1. Objetivos

A valorização de agro-resíduos e subprodutos, usualmente não explorados e causadores de poluição, transformando-os em produtos de elevado valor acrescentado, deve ser feita através de processos amigos do ambiente.

O presente trabalho tem como objetivo a obtenção de extratos ricos em compostos bioativos de valor acrescentado para as indústrias alimentar e farmacêutica, a partir de bagaços de azeitona, subproduto usualmente não explorado e causador de poluição, utilizando processos não poluentes, segundo os princípios da economia circular.

2. Introdução (Enquadramento teórico)

2.1. Caracterização da Árvore e do Fruto

A oliveira, *Olea europaea L.* que recebe o seu nome da palavra grega *elea*, é uma árvore perene pertencente à família *Oleaceae* e uma das árvores cultivadas mais antigas no mundo.

O seu cultivo expandiu-se por todo o globo, devido à produção de azeitonas e azeite. Estes produtos apresentam um valor económico significativo na atualidade, tendo por isso esta espécie sido plantada com sucesso em inúmeras áreas, onde anteriormente não havia conhecimento da sua existência.

No entanto, a região da bacia do Mediterrâneo é onde se encontra o maior número de oliveiras *Olea europaea L.*, a árvore mais distintiva da flora mediterrânea (Kostelenos, 2017). Esta pode ser encontrada em todos os países vizinhos do Mar Mediterrâneo e faz parte destas civilizações desde o seu início (Diez, 2014). Acredita-se que o cultivo da oliveira tenha chegado à Península Ibérica durante o segundo milénio a.C. (Aman *et al.* 2012).

A azeitona, o fruto da oliveira, é uma drupa, de forma oval constituída por duas partes principais: o pericarpo, que é constituído pelo epicarpo (pele) e pelo mesocarpo (polpa) e o endocarpo (caroço). O pericarpo representa cerca de 65 a 83% do peso total do fruto e contém cerca de 96-98% da quantidade total de óleo, e o endocarpo representa <3% do peso do fruto e os restantes 2-4% do óleo. O tamanho das drupas de azeitona é afetado por fatores genéticos e ambientais (García-Inza *et al.*, 2016; Kiritsakis *et al.*, 1998).

A altura da colheita do fruto é um dos fatores mais importantes associados à qualidade do azeite, uma vez que durante o processo de maturação os frutos sofrem diversas alterações,

nomeadamente a nível de peso, cor, teor de óleo, firmeza e facilidade de extração. Sofrem ainda processos metabólicos que influenciam a composição química dos frutos, influenciando diretamente as características sensoriais, a estabilidade oxidativa e o valor nutricional do azeite (Dag *et al.*, 2011).

O teor de azeite nos frutos aumenta à medida que aumenta o índice de maturação (IM), alcançando o seu máximo no momento que desaparecem os frutos verdes da árvore. A partir deste momento a quantidade total de azeite armazenado no fruto permanece constante, sendo fundamental a monitorização do teor azeite para que o rendimento não seja baixo (Zelege, 2012).

Os azeites resultantes de azeitonas em fase inicial de maturação apresentam maior teor de compostos bioativos, o que os torna de uma maneira geral de uma cor mais esverdeada, mais aromáticos, amargos e picantes (atributos positivos), com alto prazo de validade e preferidos sob o ponto de vista sensorial e funcional. Colheitas tardias têm maior rendimento de extração de azeite, no entanto existe degradação dos compostos fenólicos com o aumento do índice de maturação, o que resulta em azeites de menor qualidade, com sabor mais atenuado e menos complexo, e menor tempo de vida útil. O índice de maturação é afetado pelas condições climáticas e pelas características varietais (Mondragão-Rodrigues, 2021; García, 1996; Boskou, 2015).

A azeitona é valorizada comercialmente para a obtenção de azeite, para a produção de azeitona de mesa e outros subprodutos.

2.2. Azeite

Entende-se por azeite a gordura líquida à temperatura de 20 °C, diretamente obtida, e porventura refinada, do fruto da oliveira (*Olea europaea L.*). O azeite é obtido unicamente por processos físicos, em condições, nomeadamente térmicas, que não provocam alteração do azeite. Não é permitida a extração por solvente, nem a reesterificação ou mistura com óleos de outra natureza.

O azeite, um dos principais produtos alimentares da dieta mediterrânea e a principal fonte de gordura, é reconhecido pelas suas elevadas propriedades nutricionais e funcionais, atribuídas maioritariamente à presença de um alto teor de ácidos gordos polinsaturados e de compostos bioativos, que dão uma contribuição significativa, quantitativa e qualitativa para a ingestão diária de polifenóis na dieta mediterrânica tradicional (Miranda *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2017; Veneziani, 2017).

Os constituintes do azeite são principalmente triacilgliceróis (TAGs), cerca de 99% (têm pouca influência nas características organoléticas do azeite) e em segundo lugar ácidos gordos livres, monoacilgliceróis (MAGs) e diacilgliceróis (DAGs).

Os ácidos gordos presentes no azeite são o palmítico (C16:0, teor de 7,5-20%), palmitoleico (C16:1, teor de 0,3-3,5%), esteárico (C18:0, teor de 0,5-5%), oleico (C18:1, teor de 55-83%), e α -linoleico (C18:2, teor de 3,5-21%). Os ácidos mirístico (C14:0), ácido margárico (C17:0), linolénico (C18:3) e ácido araquídico (C20:0) são encontrados em pequenas quantidades (Jornal Oficial da União Europeia, 2022).

Os componentes menores, presentes na fração insaponificável, formados por reações secundárias constituem cerca de 1-2% da quantidade total dos constituintes, são estes nomeadamente hidrocarbonetos (como esqualeno e β -caroteno), fosfatídeos, esteróis (β -sitosterol, campesterol, 4-metilesteróis), tocoferóis (vitamina E), vitaminas lipossolúveis (vitaminas A, D, e K), polifenóis (responsáveis pelos atributos positivos picante e amargo no azeite com atividade antioxidante), pigmentos (clorofilas e feofitinas), voláteis (que conferem ao óleo o seu odor e contribuem para o sabor como atributos frutado e verde), bem como ceras (Paiva-Martins, 2017; Boskou, 2006; Kiritsakis, 1998; Regulamento UE nº 1308/2013). Os teores de ceras são geralmente baixos no azeite virgem ($C42 + C44 + C46 \leq 150$), mas estão presentes em grandes quantidades no óleo de bagaço de azeitona, extraído com solvente (Regulamento Delegado (UE) 2022/2104 Da Comissão de 29 de julho de 2022).

2.2.1. Tecnologia do azeite

O azeite pode ser extraído através de 3 tipos de sistemas de extração de azeite:

Sistema Clássico

O processo de extração clássico é o processo de extração mais antigo de processamento de azeitona para obtenção de azeite e é realizado de forma descontínua. A pasta de azeitona é colocada uniformemente entre os capachos de prensagem e aplica-se pressão para obter, por um lado, uma fração sólida (bagaço) com teores de humidade entre 25 e 30%, e por outro, a mistura de óleo e água, que é recolhida num tanque onde o óleo e a água separada por decantação (Gullón *et al.*, 2020).

As vantagens deste método incluem o uso de maquinaria simples, confiável e pouco investimento inicial, a baixa necessidade de energia e um bagaço resultante com baixo teor de água.

As desvantagens do processo de pressão incluem um alto custo de mão de obra e a produção não é contínua. A linha de produção deve ser parada para limpeza e permitir o carregamento de novas matérias-primas antes de recomeçar e o processo de pressão que expõe a pasta de azeitona ao ar durante muito tempo aumenta o grau de oxidação do azeite, originando um produto com qualidade reduzida (Amirante *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, os lagares de azeite tradicionais foram substituídos por sistemas de extração contínuos que utilizam um decantador industrial para separar todas as diferentes fases por centrifugação, como é o exemplo dos sistemas de extração contínuos de 3 e 2 fases (Dermeche *et al.*, 2013).

Sistema Contínuo (3 fases)

O processo de centrifugação contínua de 3 fases foi introduzido durante a década de 1970, a fim de aumentar a capacidade de processamento e rendimento de extração do azeite (Vlyssides *et al.*, 2004).

O sistema de extração trifásico é realizado através de um decantador trifásico onde cada fase (sólidos insolúveis, fase oleosa e fase aquosa) é separada com base nas suas densidades, resultando na separação da pasta de azeitona em três fases: águas residuais (ou águas russas), bagaço e azeite (AbdEl-Hamied *et al.*, 2019)

A fase insolúvel (bagaço) é libertada e a fase oleosa necessita de uma centrifugação final. Tradicionalmente, grandes volumes de água são utilizados nesta etapa do processo para auxiliar na separação do azeite e gerar dois subprodutos. O primeiro subproduto líquido é conhecido como águas russas e o segundo subproduto é sólido, bagaço de azeitona, com teor de humidade entre 45 e 60% (Amirante *et al.*, 2010; Gullón *et al.*, 2020).

Este sistema apresenta algumas vantagens, nomeadamente maiores capacidades de processamento, rendimento de extração do azeite, e obtenção de bagaços secos e muito mais facilmente transportáveis e trabalháveis comparativamente aos obtidos através dos sistemas bifásicos (Amirante *et al.*, 2010).

Uma desvantagem deste processo é o aumento da quantidade de águas residuais que são produzidas devido ao aumento do consumo de água (1,25 a 1,75 vezes mais água do que a extração clássica), o que leva a que o sistema trifásico seja menos utilizado atualmente do que sistema bifásico, por ser mais ecologicamente correto (Vlyssides *et al.*, 2004).

Sistema Contínuo (2 fases)

No processo de duas fases, a pasta de azeitona é separada através de um decantador bifásico, resultando numa fase líquida (azeite) e numa fase semilíquida, composta por caroços, polpas e cascas de azeitona e água (bagaço de azeitona húmido).

O bagaço obtido por este sistema é uma pasta muito húmida e viscosa (50 – 70% humidade), de difícil tratamento posterior (secagem térmica e extração do subproduto oleoso com solventes), transporte e armazenamento o que resulta num menor valor comercial (Gullón, 2020; Ferreira-Dias, 2021). Contudo, o consumo de água e, posteriormente, a produção de águas residuais é menor em comparação com o sistema trifásico tradicional e os azeites obtidos pelos sistemas de 2 fases apresentam maiores teores de antioxidantes naturais (polifenóis), obtendo-se azeites mais estáveis durante o armazenamento (Ferreira-Dias, 2021; Di Giovacchino, 2001; Amirante *et al.*, 2010).

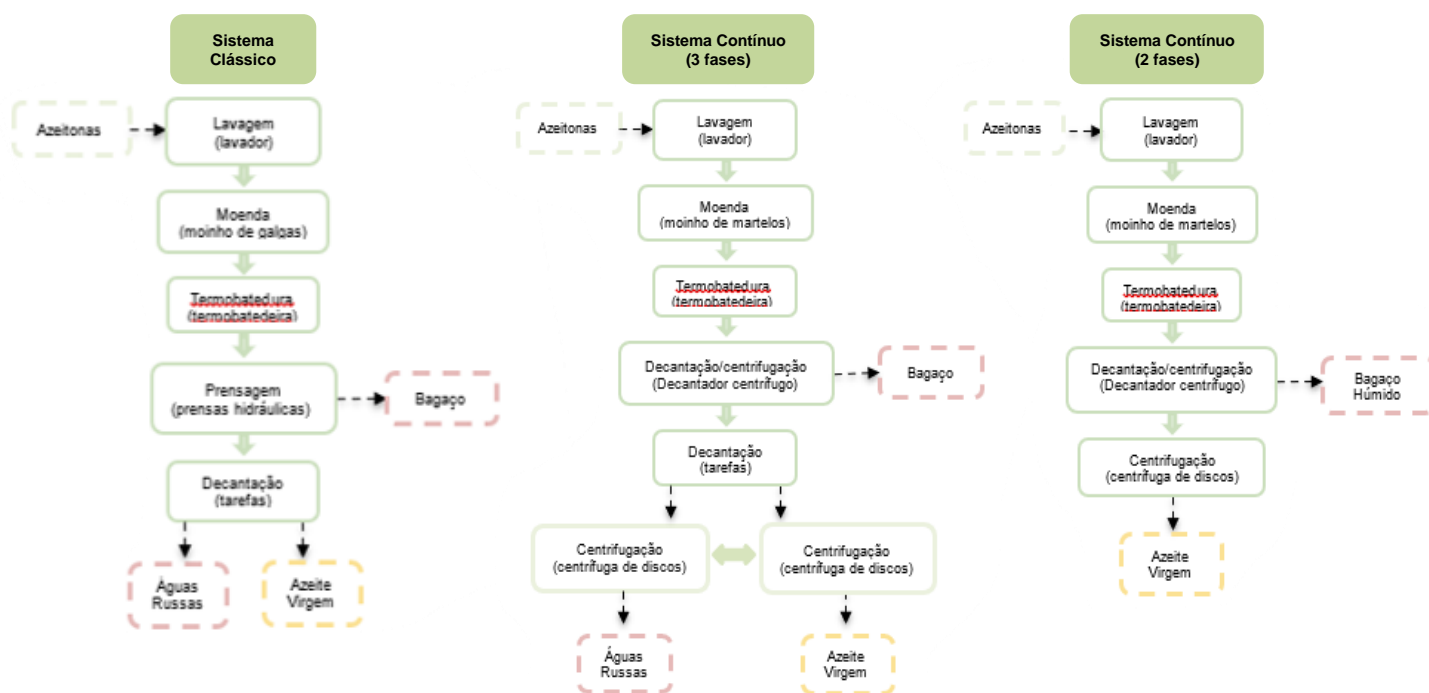


Figura 1- Tipos de sistemas de extração de azeite.

Adaptado de Ferreira-Dias (2021)

2.3. Caracterização do sector oleícola

De acordo com o Conselho Oleícola Internacional (2022), a produção de azeite triplicou nos últimos 60 anos, e apesar da queda de cerca 7,9% na produção de 2020/21 em relação à colheita de 2019/20 (3 266 500 t) a produção mundial está prevista em torno de 3 098 500t (+2.9%) para a colheita de 2021/2022. As importações e exportações são estimadas em mais de 1 milhão de toneladas.

A união Europeia é responsável por cerca de 63% da produção mundial de azeite, sendo a Espanha o maior produtor, representando cerca de 41% da produção mundial (Conselho Oleícola Internacional, 2022).

A região mediterrânea da Europa, em particular, tem uma história rica de produção de azeite de alta qualidade uma vez que o consumo de azeite e azeitonas é uma componente essencial da dieta mediterrânea. Tanto o clima temperado como a geografia proporcionam condições ideais para o cultivo de azeitonas, tornando o setor olivícola uma importante atividade agroindustrial para os países mediterrâneos contribuindo para o seu desenvolvimento económico (Uylaşer *et al.*, 2014; Jornal Oficial da União Europeia, 2023).

Portugal é atualmente o oitavo maior produtor de azeite em todo o mundo e o quarto maior produtor a nível Europeu (COI, 2022) sendo autossuficiente em azeite desde 2014. Segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE, 2022), está a caminho de atingir o recorde de 225 milhões de litros (230,000 mil toneladas) na campanha oleícola de 2021/22, consequência das excelentes condições agrometeorológicas ao longo da campanha e ao papel crescente dos olivais intensivos.

No entanto, apesar dos benefícios económicos e das propriedades funcionais além dos atributos nutricionais do azeite, o setor oleícola é também responsável por gerar grandes quantidades de subprodutos e resíduos ao longo do processo, que estão associados a problemas ambientais decorrentes.

2.3.1. Impacto ambiental dos subprodutos da indústria de extração de azeite

Atualmente é gerado anualmente um grande volume de resíduos. Um dos maiores desafios da indústria alimentar é a valorização de agro-recursos e redução de agro-resíduos e subprodutos usualmente não explorados e causadores de poluição, de modo a reduzir o seu impacto ambiental e económico, tal como o uso excessivo de recursos. Esta valorização

deve ser feita através de processos amigos do ambiente, transformando-os em produtos ou matérias-primas de elevado valor acrescentado (Ribeiro *et al.*, 2020).

De acordo com a Sociedade Portuguesa de Inovação (2020), as tendências para o setor agroalimentar português englobam produtos que contenham propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e promovam a saúde e bem-estar. É também evidente um aumento dos consumidores ambientalmente mais conscientes, que procuram mudar os seus hábitos alimentares e comportamentos para adotar uma nutrição e práticas sustentáveis o que leva a um aumento na procura de ingredientes e produtos funcionais naturais e sustentáveis (Portugal Foods, 2020).

De acordo com o mais recente relatório sobre o desperdício alimentar da Organização das Nações Unidas (ONU, 2021), estima-se que cerca de 931 milhões de toneladas de resíduos alimentares são gerados anualmente. Já em Portugal, os números apontam para o desperdício anual de aproximadamente 1 milhão de toneladas de alimentos, quase 274 mil quilos por dia (Baptista *et al.*, 2012).

O processamento de frutas e vegetais por si só gera um desperdício significativo, que chega a 25-30% do produto total. Os subprodutos mais comuns incluem bagaços, cascas, e sementes, que são ricos em compostos bioativos.

Estes subprodutos devem ser reaproveitados para produzir um produto de valor acrescentado, e sustentável (Kumar *et al.*, 2020), de acordo com os princípios de cascata de modo a criar valor acrescentado nas práticas de economia circular. O princípio de cascata maximiza a eficácia de recursos fomentando o uso sequencial e consecutivo hierarquizado de resíduos e subprodutos de modo a estender a disponibilidade total de biomassa dentro de um determinado sistema através de múltiplas fases de (re)uso de materiais criando produtos de valor acrescentado antes das operações de extração/recuperação de energia que devem ser realizadas como último passo e somente após esgotar os restantes recursos e extração de compostos valiosos (Campbell-Johnston *et al.*, 2020; Carus & Dammer, 2018).

Os subprodutos da indústria do azeite são geralmente direcionados para a extração do óleo residual por solvente orgânico (óleo de bagaço de azeitona), para a agricultura como fertilizantes, usados como fonte de energia nos lagares e como alimentação animal, e podem até ser despejados em rios, lagos ou mares próximos e armazenados/evaporados em lagoas com grandes efeitos poluentes (Gullón, *et al.* 2020; Servili, *et al.* 2015). No entanto, a gestão da grande quantidade desses subprodutos gerados num curto período de tempo devido à sazonalidade da produção de azeite, nomeadamente, entre os meses de outubro e dezembro, representa um desafio significativo para os produtores, havendo dificuldade em escoar atempadamente os subprodutos de acordo com o nível da produção (Gullón, *et al.* 2020).

Estima-se que por cada 1000 kg de azeite, são produzidos cerca de 9000 kg de subprodutos (Vlyssides *et al.*, 2004).

O bagaço de azeitona é o subproduto mais crítico da indústria do azeite pois, além de ser o fluxo de subprodutos mais abundante, tem efeitos prejudiciais ao meio ambiente devido à sua fitotoxicidade, às propriedades antimicrobianas, aos altos teores de CQO (carência química de oxigênio) e de CBO₅ (carência bioquímica de oxigênio) e aos baixos valores de pH, o que torna o subproduto difícil de tratar (Ferreira-Dias, 2021; Alcazar-Ruiz, 2021; Vlyssides *et al.*, 2004).

Este cenário indica que é necessário adotar abordagens de tratamento e opções de valorização em cascata para o material lenhocelulósico proveniente de lagares de azeitona, nomeadamente, através da recuperação de biorecursos valiosos como compostos bioativos com o auxílio de tecnologias verdes aliadas e preservando as suas propriedades funcionais, transformando um fluxo de subprodutos agroindustriais em produtos de alto valor para as indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética, permitindo alcançar uma cadeia produtiva sustentável, aumentar a rentabilidade da indústria do azeite e mover a economia de um modelo linear para um circular (Dermeche *et al.*, 2013; Cedola *et al.*, 2020, Gullón *et al.*, 2020).

2.4. Bagaço de Azeitona

O bagaço de azeitona representa 35-40% do peso total da azeitona processada, é formado por caroços, polpas e películas de azeitona e água (Chanioti & Tzia, 2018). A composição deste subproduto pode apresentar variações dependendo da cultivar da azeitona, condições de cultivo e dos sistemas de extração (Dermeche *et al.*, 2013).

Este subproduto da extração do azeite é rico em grandes quantidades de substâncias orgânicas, como fibras, açúcares, ácidos gordos voláteis, poliálcoois, pectinas e gordura, e em compostos bioativos. Estima-se, de facto, que durante a extração do azeite, apenas 2 a 3% dos compostos bioativos presentes no fruto são transferidos para o azeite, enquanto os 97 a 98% restantes convergem nos subprodutos resultantes do processo de extração mecânica do azeite (Servili, 2015; Madureira *et al.* 2020).

Os compostos bioativos englobam os compostos fenólicos, tocoferóis, esteróis e hidrocarbonetos (Difonzo *et al.*, 2020). Os compostos fenólicos, metabólitos secundários das plantas, constituem um amplo grupo de substâncias químicas, com diversas estruturas químicas e diferentes atividades biológicas, englobando mais de 8.000 compostos diferentes, no entanto, todos eles são claramente identificáveis pela presença de pelo menos um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxila. A fração fenólica consiste em diferentes

grupos: ácidos fenólicos, álcoois fenólicos, flavonóides e secoiridóides (Veneziani, 2017; Martínez-Valverde, *et al.* 2000).

Estes compostos, presentes em abundância em plantas, frutos, e outros produtos alimentares derivados destes, têm como função a defesa natural das plantas, apresentam um papel importante na organização da estrutura da parede celular, na avaliação organoléptica e valor nutricional da azeitona, na prevenção da oxidação da fração lipídica, e promovem a ligação entre diferentes polímeros (Moldão, 2021). Entre os compostos fenólicos presentes na azeitona, no azeite e nos subprodutos da azeitona, o hidroxitirosol é o principal em quantidade, mas também tem um teor significativo em oleuropeína, tirosol, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, verbascoside, ácido elenólico, catecol e rutina (Nunes *et al.* 2016; Ruiz-Moreno, *et al.* 2015).

Os compostos presentes no bagaço de azeitona, nomeadamente os compostos fenólicos, tem sido alvo de vários estudos devido à sua atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, e podem até contribuir para a prevenção de doenças crónicas, como doenças cardiovasculares e cancro (Miranda *et al.*, 2019; Soares, 2019; Frankel, 2013; Choi *et al.*, 2007).

2.4.1. Atividade antioxidante

No corpo humano, existe um equilíbrio entre a quantidade de radicais livres produzidos e antioxidantes, condição essencial para o funcionamento normal do organismo (Martínez-Valverde *et al.* 2000). Ainda assim, é necessário enriquecer a dieta com antioxidantes presentes nos alimentos para ajudar o organismo a reduzir os danos oxidativos e evitar o stress oxidativo, que é causado pelo excesso de radicais livres no organismo relativamente à capacidade da célula de efetuar uma resposta antioxidante eficaz.

O stress oxidativo, é causado por fatores endógenos, como espécies reativas de oxigénio (ROS), moléculas reativas e radicais livres intermediários essenciais no metabolismo oxidativo, e fatores exógenos, como tabagismo, radiação ionizante, poluição, solventes orgânicos, pesticidas, etc., que são capazes de atacar ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outras pequenas moléculas causando perda de estrutura e função (González-Palma *et al.* 2016; Cicerale *et al.* 2012; Cardinali *et al.* 2012).

Um antioxidante é uma substância que em baixas concentrações retarda ou previne a oxidação de um substrato (Martínez-Valverde *et al.* 2000). O bagaço de azeitona representa uma fonte de compostos antioxidantes (Sánchez de Medina, 2012).

Os compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes através de vários mecanismos químicos: transferência de átomos de hidrogénio, transferência de um único eletrão, capacidade de quelar metais de transição como ferro e cobre e inibindo a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Martínez-Valverde *et al.* 2000; Santos-Sánchez *et al.* 2019). No entanto, a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é fortemente reduzida quando o meio de reação consiste num solvente propenso à formação de ligações de hidrogénio com os compostos fenólicos (Santos-Sánchez *et al.* 2019).

A fortificação de óleos com compostos bioativos tem sido explorada para promover a sua estabilidade. A introdução de compostos fenólicos nos alimentos pode representar uma alternativa ambientalmente sustentável ao uso de antioxidantes sintéticos (Veneziani *et al.*, 2017).

O hidroxitirosol, composto fenólico presente no bagaço de azeitona, é referido como um poderoso antioxidante e alvo de diferentes estudos por apresentar papel ativo na prevenção de danos oxidativos em células vivas. Há estudos que relatam a sua capacidade de neutralizar a citotoxicidade induzida por radicais livres em células epiteliais intestinais humanas em cultura (células Caco-2) e o seu efeito protetor sobre as alterações oxidativas induzidas por peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em eritrócitos humanos (Manna *et al.* 1999).

O tirosol e a oleuropeína aglicona, são outros exemplos de compostos fenólicos com atividade antioxidante. O tirosol provou ser eficaz na inibição do dano muscular do stresse oxidativo desencadeado pelo exercício extenuante e a oleuropeína aglicona protege o LDL no plasma contra a oxidação, bem como aumenta o sistema de defesa antioxidante contra a aterosclerose (Madureira *et al.* 2021).

Elama *et al.* (2017) constataram que a oleuropeína pode ser usada para retardar a oxidação de produtos alimentares. Neste estudo concluiu-se que a oleuropeína pode ser utilizada como antioxidante natural em hambúrgueres congelados para substituir antioxidantes alimentares sintéticos, como o eritorbato de sódio. Foram obtidos resultados semelhantes tanto para a oleuropeína quanto para o eritorbato de sódio, constatando que uma concentração de 0,5% foi capaz de prolongar a vida útil dos hambúrgueres e dificultar a oxidação.

Outro composto promissor neste sentido e encontrado naturalmente em subprodutos da extração do azeite, é o verbascosido. Este demonstrou ter efeitos protetores antioxidantes nas membranas fosfolipídicas e modulação da atividade antioxidante plasmática in vivo. Os resultados relatados por Cardinali *et al.* (2012) indicam que no sistema celular, o verbascosido incorporado contrariou significativamente a citotoxicidade de ROS em células HT-29 (uma linha de células de cancro de cólon humano). Este composto é também um inibidor da

peroxidação lipídica com capacidade de proteger o LDL contra a oxidação catalisada pelo cobre. Os resultados suportam a hipótese de que o verbascosido, um potente biofenol antioxidante, pode ser considerado um composto promissor para o tratamento de doenças relacionadas com o stresse oxidativo.

Os tocoferóis, um grupo de compostos de interesse para a indústria alimentar devido à sua atividade antioxidante, são encontrados em concentrações substanciais no bagaço de azeitona (Ibáñez *et al.* 2000). A vitamina E é o termo genérico utilizado para um grupo de tocoferóis (α , β , γ , δ) e tocotrienóis (α , β , γ , δ). Destes o α -tocoferol é a forma biologicamente mais ativa da vitamina E, tendo um papel importante na prevenção da peroxidação lipídica e na eliminação de radicais peroxi lipídicos (Nunes *et al.* 2018).

2.4.2. Atividade anti-inflamatória

A inflamação é uma resposta fisiológica inespecífica ao dano nos tecidos que é mediada pelo sistema imunológico. As respostas inflamatórias adequadas são de primordial importância para a defesa contra lesões de qualquer origem (EFSA, 2011). Embora muitas doenças crónicas sejam causadas por inflamação, os efeitos prejudiciais à saúde da inflamação podem ser prevenidos ou mitigados com a ingestão adequada de compostos que possuam atividade anti-inflamatória (Shen *et al.* 2020).

Pesquisas *in vivo* e *in vitro* sugerem concentrações significativas de compostos bioativos, podem atenuar as respostas inflamatórias no corpo humano (Cicerale, 2012).

O oleocantal é o composto fenólico anti-inflamatório mais relatado. As ações anti-inflamatórias do oleocantal descritas concluem que este composto possui potentes ações farmacológicas na atenuação de mediadores inflamatórios, como a síntese de óxido nítrico induzível (iNOS), que desempenha um papel na patogénese da doença degenerativa articular, com a capacidade de inibição das enzimas inflamatórias como a ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2), de maneira dose-dependente, mais eficaz que o ibuprofeno (anti-inflamatório não esteróide). Outros estudos sugerem que o oleocantal pode ser um potencial agente farmacológico no tratamento de doenças neurodegenerativas, uma vez que exhibe propriedades neuroprotetoras, além de atenuar marcadores de inflamação implicados na doença de Alzheimer.

O oleocantal também demonstrou possuir efeitos antiproliferativos em linhas humanas de cancro de mama e próstata, pois inibe a proliferação celular e a transformação celular induzida por tumor em células epidérmicas, promoveu a apoptose celular pela ativação da caspase-3 e poli adenosina difosfato ribose polimerase, fosforilação de p53 (Ser15) e induziu

a fragmentação do DNA em células derivadas de adenocarcinoma de cólon humano (Cicerale, 2012; Dening, 2016).

No entanto, outros compostos presentes nos subprodutos da extração do azeite apresentam propriedades anti-inflamatórias.

Foi relatado que o hidroxitirosol possui ações anti-inflamatórias significativas e atenua a expressão de citocinas pró-inflamatórias frequentemente observadas em doenças inflamatórias. No estudo realizado por Carito *et al.* (2015) a administração de uma mistura de polifenóis extraídos de bagaço de azeitona (*Olea europaea L.*), contendo principalmente hidroxitirosol, demonstrou ter um efeito sobre citocinas que desempenham papéis importantes em processos inflamatórios (como TNF- α e IL-10) reduzindo a inflamação aguda induzida por carragenina nas patas de murganhos, com efeitos promissores em outras moléculas pró-inflamatórias importantes. O hidroxitirosol demonstrou ainda ter efeitos anti-inflamatórios e antienvhecimento em fibroblastos dérmicos humanos (HDFs) danificados por UVA (Jeon & Cho, 2018).

Evidências *in vitro* recentes mostraram que o composto fenólico, oleuropeína aglicona inibe o fator de necrose tumoral alfa numa linhagem de monócitos que, juntamente com as moléculas que expressam, desempenham um papel significativo no desenvolvimento de doenças baseadas em inflamação (Cicerale, 2012).

A oleuropeína atenua os danos inflamatórios também na colite ulcerativa humana ao reduzir a expressão de COX-2 e IL-17. Esses resultados reforçam o potencial papel protetor desse fenol na modulação da resposta imune intestinal (Santangelo, 2017).

A luteolina-7 glucósido (LUT 7G), um flavonóide presente nas azeitonas e seus derivados como pasta, bagaço e águas residuais, parece ter um papel promissor neutralizando o efeito pró-inflamatório e proliferativo de IL-22 e IL-6, bloqueando a translocação nuclear de STAT3 ativado em queratinócitos humanos, e melhorando danos causados na pele.

A ingestão de extrato de bagaço de azeitona contendo ácido maslínico (MA), efetivamente previne e alivia a artrite em animais e humanos (Shimazu *et al.* 2018).

Palmieri *et al.* (2012) alegam que os bagaços de azeitona podem ser usados com sucesso como uma fonte barata de compostos fenólicos altamente valiosos para restaurar a função endotelial e neutralizar os principais aspectos da progressão da doença vascular, como mecanismos sensíveis à oxidação, inflamação, proteólise da matriz e angiogénese, podendo representar uma nova estratégia para a quimioprevenção da doença vascular humana associada à disfunção endotelial.

Katsinas *et al* (2021) demonstraram recentemente os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes de extratos de bagaço de azeitona em células epiteliais da córnea humana e conjuntival. Assim, uma aplicação de alto valor como potencial terapia de superfície ocular foi proposta para a valorização do subproduto.

2.4.3. Atividade antimicrobiana

As intoxicações transmitidas por alimentos são um problema de saúde pública generalizado e crescente em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Estima-se que 44% destas doenças sejam causadas por microrganismos patogênicos de origem alimentar.

Nesse contexto têm sido propostas várias substâncias de origem natural para substituir conservantes sintéticos e inibir o crescimento de bactérias patogênicas, alinhando-se com as tendências atuais do consumidor relativamente às preocupações com a saúde, com a consciência ambiental e a procura por produtos sem aditivos ou com ingredientes naturais (Guo *et al*, 2020; Nunes *et al*, 2021).

Os subprodutos da extração do azeite, nomeadamente folhas, caroços, bagaço de azeitona e águas russas, possuem elevada atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos patogênicos, o que foi associado à presença de compostos fenólicos (Caballero-Guerrero, 2022).

Os grupos hidroxilo (OH) dos compostos fenólicos interagem com a membrana celular das bactérias por ligações de hidrogénio causando a rutura da estrutura da membrana, que induz a perda de conteúdo celular, ou a deslocalização de eletrões, que resulta na despolarização das bactérias e pode levar à sua morte celular (Chibane *et al*. 2018; Santos-Sanches, 2019; Tripoli, 2005).

A atividade antimicrobiana do hidroxitirosol e da oleuropeína têm sido alvo vários estudos, por serem consideradas uma das principais classes de polifenóis contidos nos produtos de azeitona, destacando-se pelo seu potencial como conservante natural e contra bactérias responsáveis por infeções do trato respiratório e intestinal (Medina-Martínez, 2015; Bisignano, *et al*. 1999; Nunes *et al*. 2021).

No entanto, outros compostos fenólicos presentes nos bagaços de azeitona também demonstram a sua capacidade de inibir ou retardar a taxa de crescimento de uma variedade de microrganismos, como é o caso do ácido cafeico, ácido vanílico, ácido elenólico, ácido *p*-cumárico, ácido maslínico, ácido oleanólico e do catecol (Obied, 2005; Madureira, 2021; Tafesh, 2011; Chouaïb, 2015).

Num estudo realizado por Nunes *et al.* (2021), avaliou-se a atividade antimicrobiana de quatro ingredientes à base de bagaço de azeitona ricos em hidroxitirosol recolhidos em lagares de duas fases de duas principais regiões produtoras de azeite portuguesas (Trás-os-Montes e Alentejo) constituídos por uma mistura de cultivares de azeitona, a fim de avaliar o seu potencial para uso em produtos alimentícios. A atividade microbiana foi realizada utilizando as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva) e a levedura *Candida albicans* ATCC 10231, selecionadas como representantes dos principais tipos de contaminação alimentar e infeção humana. Os resultados para a atividade antimicrobiana dos extratos, mostram que os extratos apresentaram atividade antimicrobiana para *E. coli* e *S. aureus* mas não para *C. albicans*, sendo que o ingrediente funcional com maior teor de hidroxitirosol também apresentou a melhor concentração inibitória mínima contra as bactérias testadas.

Noutro estudo com o objetivo de extrair e purificar a oleuropeína das folhas de diferentes variedades de azeitona e determinar a atividade antioxidante e antimicrobiana utilizando as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), foi observado que os extratos brutos e a oleuropeína purificada têm potencial para prolongar o tempo de vida útil de produtos alimentícios devido às suas atividades antioxidantes e antimicrobianas (Topuz & Bayram, 2021).

Chouaïb *et al.* (2015) relataram a atividade antibacteriana de ácido oleanólico e ácido maslínico de bagaço de azeitona extraídos com o auxílio de ultrassons, contra cinco microrganismos, incluindo estirpes de referência compostas por bastonetes Gram-negativos, nomeadamente *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e cocos Gram positivos como *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). A atividade antibacteriana dos compostos extraídos foi observada para as bactérias usadas.

Ribeiro *et al.* (2020) fracionaram a fração líquida e polpa do bagaço de azeitona obtendo dois ingredientes em pó, um pó enriquecido com líquido (LOPP) e um pó enriquecido com polpa (POPP). Os microrganismos *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* sensível à metilina (MSSA), *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli* (ATCC 2599, ATCC 25923, ATCC 13076 e ATCC 25922, respectivamente), *Yersinia enterocolitica* (NCTC 10406), e *Listeria monocytogenes* (13562) foram utilizadas para avaliar a atividade antimicrobiana destes pós. Ambos os produtos foram capazes de inibir, em algum nível, todos os microrganismos testados, apoiando a potencial aplicação de pós de bagaço de azeitona não apenas como ingredientes funcionais, mas também como conservantes.

As atividades antimicrobianas do extrato de acetato de etila do bagaço de azeitona de duas fases da cultivar de azeitona tunisiana Chemlali, mostraram-se eficaz para culturas puras de bactérias autenticadas obtidas das coleções internacionais de cultura e da coleção laboratorial. Estirpes bacterianas padrão: *Pseudomonas aeruginosa* CIPA22, *Escherichia coli* ATCC 1053, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella enterica* CIP80.39, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia sp.* e *Pseudomonas savastanoa* e *Pseudomonas aeruginosa* (Yahyaoui *et al.* 2014).

Os resultados antimicrobianos dos compostos presentes no bagaço de azeitona permitem concluir que estes não se devem apenas ao teor de hidroxitirosol e oleuropeína, mas, muito provavelmente, a um efeito sinérgico entre todos os compostos fenólicos e outros compostos.

Embora um efeito bactericida tenha sido observado no bagaço de azeitona contra uma ampla gama de bactérias gram-positivas e gram-negativas, nenhum efeito foi observado em leveduras (Beuchat & Golden, 1989; Nunes *et al.*, 2021; Wahdan & Taha, 2018).

2.5. Processo de extração de compostos bioativos

A utilização de subprodutos agroindustriais em biorrefinarias é economicamente vantajoso, uma vez que permite a extração de diferentes compostos de alto valor de fontes naturais, através de tratamentos térmicos, que são uma alternativa com baixo risco ambiental (Soares, 2019).

Solventes “ecologicamente corretos”, ou sua combinação com água, têm sido utilizados para extrair compostos fenólicos de subprodutos e resíduos. O etanol é uma opção viável uma vez que é um solvente barato, pode ter origem biológica, reutilizável e não tóxico. De acordo com Lafka *et al.* (2011) o etanol foi selecionado como o solvente mais adequado para a extração de compostos fenólicos de subprodutos de lagar de azeite para a produção de extratos com alto teor de fenóis e alta atividade antioxidante. Contudo, no estudo realizado por Costa *et al.* (2014), foi evidenciado que os extratos resultantes de uma mistura hidroalcoólica (50% água: 50% etanol e a 50 °C ou 60 °C, durante 90 min) apresentaram os melhores resultados de recuperação de compostos bioativos e de atividade antioxidante, comprovando que quando solventes de diferentes polaridades são misturados, estes tendem a extrair um espectro mais amplo de compostos (Galanakis *et al.*, 2017).

A eficiência do processo de extração é afetada por vários fatores, sendo importante otimizar as condições do processo de modo a maximizar a recuperação máxima dos

compostos derivados da hemicelulose. A otimização das condições operacionais permite também uma exploração mais adequada e completa da matéria-prima, economizando tempo, mão-de-obra, e tornando o processo mais rentável e atrativo para ser implementado à escala industrial (Ballesteros, 2017).

Uma das variáveis independentes relevantes na extração sólido-líquido é o tempo, devido ao seu impacto na solubilidade dos compostos. Maior tempo de extração pode levar a um maior rendimento dos compostos extraídos; no entanto, o tempo excessivo de extração pode impactar negativamente o composto extraído, causando oxidação, epimerização e degradação dos metabólitos de interesse (Fadjare, 2021).

O aumento da temperatura nos processos de extração traduz-se num efeito positivo no rendimento de extração de compostos devido ao aumento da porosidade do material, maior solvatação e transferência de massa quando a temperatura de extração aumenta. Além disso, o aumento da temperatura também reduz a tensão superficial e a viscosidade nos extratos, aumentando a penetração na matriz e a taxa de extração de polifenóis (Gullón, 2017; Fadjare, 2021; Egüés, 2012; Sousa, 2008; Lama-Muñoz, 2014). Porém, Dzah *et al* (2020) afirmam que temperaturas de extração acima de 50 °C causam danos aos compostos bioativos e a sua degradação, visto que muitos compostos fenólicos são facilmente hidrolisados e oxidados a altas temperaturas, principalmente quando extraídos por longos períodos.

A extração por solvente convencional, como maceração, destilação e extração em Soxhlet, são técnicas comuns na recuperação de compostos de valor acrescentado. Contudo, a crescente preocupação relacionada com a qualidade e segurança alimentar e com os níveis residuais de solvente nos produtos obtidos, em paralelo com a termodegradação dos compostos de interesse derivada de altas temperaturas utilizadas neste processo e da longa duração dos processos, a utilização de grande quantidade de solvente de extração e o alto consumo de energia, levaram a que a indústria alimentar aumentasse a procura por outras tecnologias.

Os processos emergentes, essencialmente de natureza física, surgem como alternativa aos processos convencionais. É o caso dos ultrassons, micro-ondas, campos elétricos pulsados, altas pressões hidrostáticas e extração por fluidos supercríticos (Miranda *et al*, 2019; Duarte, 2011; Gullón *et al.*, 2020; Sirichan *et al* 2022).

A extração assistida por ultrassons tem sido apresentada como tecnologia sustentável para a eficiência de extração de compostos ativos de diferentes tipos de recursos. Esta tecnologia baseia-se na ruptura das membranas de células vegetais como resultado da formação de bolhas de cavitação geradas através de ondas ultrassom de alta

frequência aumentando o contacto dos compostos extraíveis com o solvente e levando a uma maior extração de composto (Babotă, *et al.* 2022). O uso de ultrassons oferece várias vantagens comparativamente com os métodos de extração tradicionais, incluindo tempos de extração mais curtos, menor necessidade de solvente e uso de baixas temperaturas que favorecem a extração de compostos termolábeis. Além disso, o equipamento é de fácil operação e relativamente barato em comparação com outras técnicas modernas de extração (Gullon *et al.*, 2020; Galanakis & Kotsiou, 2017).

O processo emergente de extração por ultrassons é fortemente influenciado por diversas variáveis operacionais, como temperatura, tempo, potência e frequência, entre outras; portanto, a otimização do processo é necessária de modo a obter altos rendimentos de extração, bem como para garantir a qualidade dos extratos (Sirichan *et al.*, 2022).

A extração de compostos bioativos de bagaço de azeitona recorrendo a essa tecnologia permite obter extratos com teor de compostos fenólicos totais mais elevados que por extração sólido-líquido convencional num período de tempo de extração muito menor (Nunes, 2018).

A combinação de ultrassons com outras técnicas de extração pode melhorar a recuperação dos compostos desejados. De acordo com Wang *et al.* (2017) os tratamentos hidrotérmicos assistidos por ultrassons originam resultados mais satisfatórios, em comparação com o tratamento usando apenas hidrólise enzimática ou apenas ultrassom, aumentando o rendimento de extração de polifenóis de bagaços de azeitona em cerca de 26% e 31%, respetivamente (Wang *et al.*, 2017).

3. Material e Métodos

3.1. Recolha e preparação das amostras

Foram utilizados os seguintes bagaços de azeitona húmidos resultantes da extração do azeite:

- Bagaço monovarietal de cultivar Galega, com índice de maturação (IM) 2.89, obtido da extração do azeite em equipamento de laboratório “Abencor”, na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco;
- Bagaço monovarietal de cultivar Cobrançosa, com índice de maturação (IM) 2.5, obtido da extração do azeite em equipamento de laboratório “Abencor”, na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco;
- Bagaço proveniente da unidade de extração de óleo de bagaço de azeitona da UCASUL– União de Cooperativas do Sul, CRL (Alvito, Beja, Portugal), que consiste numa mistura de diferentes bagaços de azeitona proveniente de diversas unidades de extração de azeite no Alentejo, de azeitonas de diferentes cultivares e índices de maturação. A maioria dos lagares da região utiliza o processo de duas fases para a extração de azeite.

Os bagaços foram liofilizados de forma a reduzir o seu elevado teor de humidade e preservar o teor de compostos bioativos. Posteriormente, foram separados por classes granulométricas num crivo vibratório “Retsch”, e recolhida a fração 40-60 mesh, em quantidades suficientes para serem utilizadas nas etapas seguintes.

3.2. Caracterização dos bagaços de azeitona

Para avaliar o potencial dos bagaços para tarefas subsequentes, realizou-se a caracterização química e estrutural dos diferentes bagaços. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado para cada amostra.

3.2.1. Teor de Humidade

O teor de humidade de cada amostra de bagaço de azeitona foi determinado gravimetricamente.

Foi pesado 1 g de amostra e colocado em estufa a 105 ° C durante 16 h, ou até massa constante, seguido de arrefecimento em exsiccador e pesagem.

O teor de humidade em base húmida foi determinado através da perda de massa da amostra inicial.

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{m_{\text{amostra}} - m_{\text{amostra seca}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (\text{Equação nº1})$$

3.2.2. Teor de cinza

O teor de cinza foi obtido seguindo o método TAPPI 15 os- 58.

Pesou-se 1 g de amostra, e colocou-se na estufa a 60 °C cerca de 12 h. De seguida colocaram-se as amostras na estufa a 100-105 °C, durante 2 horas e pesaram-se.

Findo esse tempo, colocaram-se as amostras na mufla a 450-500 °C de um dia para o outro, de modo a realizar a sua incineração, e pesaram-se.

O teor de cinza foi determinado através da equação 2:

$$\text{Cinza (\%)} = \frac{m_{\text{cinzas}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (\text{Equação nº2})$$

3.2.3. Teor de extrativos pelo método de Soxhlet

O teor de extrativos determinou-se com o auxílio de um sistema Soxhlet, efetuando extrações contínuas sucessivas com solventes de polaridade crescente (*n*-hexano, etanol e água), adaptado da TAPPI 204 cm-97.

Pesaram-se cerca de 2 g de cada amostra (da fração 40-60 mesh) para os cartuchos de extração e colocaram-se dentro do tubo de Soxhlet. As extrações foram realizadas com 170 mL de cada solvente, com tempos de extração de 6 horas para o *n*-hexano, e 16 horas cada para o etanol e a água.

Determinou-se o teor de extrativos através da determinação gravimétrica da perda de massa da amostra após a evaporação de cada solvente, em relação à massa seca inicial.

A percentagem de extrativos em cada solvente foi calculada e segundo a equação 3:

$$\text{Extrativos (\%)} = \frac{m_{\text{resíduo}}}{m_{\text{amostra seca}}} \times 100 \quad (\text{Equação nº3})$$

3.2.4. Determinação do teor de lenhina

Os teores de lenhina Klason e lenhina acido-solúvel foram determinados numa amostra livre de extrativos seguindo os métodos TAPPI 13 m - 54 e TAPPI Useful Method UM 250 -91, respetivamente, e expressos em percentagem das amostras originais.

O teor total de lenhina é a soma da lenhina Klason com os teores de lenhina solúvel em ácido.

3.2.4.1. Lenhina Klason

Tal como indicado na norma TAPPI 13 m – 54, secaram-se as amostras (previamente extratadas) numa estufa a 60 °C *overnight*, seguidas de 2 horas a 100 °C.

Pesaram-se 350 mg de amostra para copos de precipitação e adicionaram-se 3 mL de H₂SO₄ a 72% (m/m). De seguida, estes foram colocados num banho termostaticado a 30 °C e deixaram-se reagir durante 1 hora, homogeneizando a mistura com uma vareta de vidro de 10 em 10 minutos.

Ao final desse tempo, diluiu-se a amostra com 84 mL de água destilada e verteu-se a mistura para frascos de vidro com tampa hermética que foram colocados numa autoclave, durante 1 hora. Retiraram-se os frascos da autoclave e arrefeceram-se em gelo. As misturas, depois de arrefecidas, foram filtradas com um cadinho de placa filtrante G-ETW-30 pré-pesado, lavando bem as amostras com água destilada. Guardou-se o filtrado de modo a posteriormente calcular o teor de lenhina solúvel.

Após a filtração, colocaram-se os cadinhos contendo a lenhina numa estufa a 60 °C *overnight*, seguido de duas horas a 100 °C, e depois de arrefecidos foram pesados.

A percentagem de lenhina de Klason foi calculada como a massa do subproduto sólido após secagem de acordo com as Equações 4 e 5.

$$\text{Lenhina Klason s/ correção (\%)} = \frac{m_{\text{resíduo}}}{m_{\text{amostra seca}}} \times 100 \quad (\text{Equação nº4})$$

$$\text{Lenhina Klason corrigida aos extrativos (\%)} = \frac{100 - \text{extrativos totais \%}}{100} \times \text{lenhina s/correção\%} \quad (\text{Equação nº5})$$

O valor final é a média dos três ensaios realizados a cada amostra.

3.2.4.2. Lenhina solúvel

A determinação da lenhina solúvel foi efetuada, medindo a absorvância do filtrado resultante da determinação da lenhina Klason em espectrofotómetro a 205 nm, de acordo com a norma Tappi UM 250 (1993).

Pipetaram-se 0,5 mL do filtrado para um tubo de ensaio e adicionou-se água destilada até perfazer 20 mL de volume. De seguida, realizou-se a leitura das absorvâncias num espectrofotómetro a 205 nm, contra água destilada.

Para a determinação da lenhina solúvel foi utilizada a Equação 6.

$$\text{Lenhina solúvel (\%)} = \frac{A_{205} \times \text{Volume inicial} \times \text{fator diluição}}{\epsilon \times m \text{ amostra seca}} \times 100 \quad (\text{Equação n}^\circ 6)$$

Em que: ϵ – Emissividade (g/L); A_{205} – Valor da absorvância a 205 nm.

O valor final é a média dos três ensaios realizados a cada amostra.

3.3. Otimização das condições operacionais de extração

Os compostos bioativos presentes nos bagaços de azeitona foram extraídos com o auxílio da tecnologia de ultrassons e solventes permitidos na indústria alimentar (etanol e água) utilizando tratamentos térmicos suaves.

De modo a otimizar as condições operacionais que levam à recuperação máxima de compostos bioativos, recorreu-se a um desenho experimental, que consiste num conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas utilizadas para explorar diversas condições operacionais, com o objetivo de diminuir custos (matérias-primas, processo, produto), obter produtos melhorados, diminuir a variabilidade dos produtos e aumentar a capacidade de produção.

O desenho experimental permite a variação sistemática de diferentes fatores simultaneamente e avaliar os efeitos e interações das múltiplas variáveis, evitando a repetição de ensaios e removendo variáveis externas (efeito ambiental, fator humano, equipamentos, etc) (Ferreira-Dias, 2021).

Para seleção das melhores condições de extração utilizou-se o bagaço obtido na UCASUL por ser um bagaço de origem industrial.

Os ensaios foram realizados seguindo uma matriz factorial em função de quatro variáveis independentes do processo: tempo de extração (30 a 90 min), temperatura (30 a 50 °C), tempo de sonda ultrassons (0-15 minutos), e solvente (água/ etanol), num total de 16 ensaios (tabela 1).

Realizaram-se dois ensaios complementares, um sem pré-tratamentos com US (PC1) e outro em que o bagaço foi submetido a tratamento por US durante 15 minutos. A extração, em ambos os ensaios, ocorreu a 40 °C durante 60 minutos, utilizando como solvente uma solução de etanol/água (1:1, v/v). A temperatura, o tempo de extração e a composição do solvente de extração correspondem às condições do ponto central da matriz.

Tabela 1- Matriz de otimização de extração bagaço UCASUSL

Ensaio nº	Temperatura (°C)	Tempo (min)	H2O (%)	EtOH (%)	Ultrassons (min)	Massa (g)
1	30	30	100	0	0	1,042
2	50	30	100	0	0	1,032
3	30	90	100	0	0	1,004
4	50	90	100	0	0	1,001
5	30	30	0	100	0	1,003
6	50	30	0	100	0	1,006
7	30	90	0	100	0	1,002
8	50	90	0	100	0	1,016
9	30	30	100	0	15	1,028
10	50	30	100	0	15	1,006
11	30	90	100	0	15	1,007
12	50	90	100	0	15	0,999
13	30	30	0	100	15	1,015
14	50	30	0	100	15	1,004
15	30	90	0	100	15	1,035
16	50	90	0	100	15	1,072
PC1	40	60	50	50	0	1,011
PC2	40	60	50	50	15	1,006

Para cada ensaio pesou-se 1g de amostra, e mediram-se 20 mL de solvente, correspondendo a uma razão de massa bagaço:solvente de 1:20 (m/v). O pré-tratamento por ultrassons foi realizado antes da extração propriamente dita. Para tal, a mistura bagaço/solvente foi colocada em tubos onde se introduziu a sonda de Ultrassons, durante 15 minutos com amplitude a 0,8 e 0,5 ciclo pulsado, e realizou-se um controlo de temperatura de modo a evitar o sobreaquecimento destas mesmo.

As amostras foram posteriormente colocadas em reatores de vidro de parede dupla com agitação magnética controlada e constante. O tempo de extração e temperatura, controlada por banho termostático, seguiu o desenho experimental descrito na tabela 1.

Após o término do tempo de extração, procedeu-se à separação da fase líquida e da fase sólida, por filtração num filtro Whatman nº4 e armazenou-se o filtrado em frascos devidamente identificados para posteriores análises.

Os efeitos das diferentes variáveis da matriz e as suas inter-relações foram estudados com recurso a métodos estatísticos de modo a identificar as condições ótimas de extração de compostos bioativos. Utilizou-se o programa *Statistica, Statsoft, USA*.

As condições selecionadas para a extração dos compostos bioativos das matérias-primas (bagaço de azeitona Cobrançosa, Galega e UCASUL) estão descritas na tabela nº 2.

Tabela 2- Matriz com as condições de extração para todas as amostras

Extratos	Temperatura (°C)	Tempo (min)	H2O (%)	EtOH (%)	Ultrassons (min)
U-EtOH	30	30	0	100	15
G-EtOH	30	30	0	100	15
C-EtOH	30	30	0	100	15
U-EtW-30	30	30	50	50	15
G-EtW-30	30	30	50	50	15
C-EtW-30	30	30	50	50	15
U-EtW-40	40	30	50	50	15
G-EtW-40	40	30	50	50	15
C-EtW-40	40	30	50	50	15

Legenda: (U-ETOH: bagaço UCASUL extraído com etanol a 30°C; U-ETW-30: bagaço UCASUL extraído com etanol e água a 30°C; U-ETW-40, : bagaço UCASUL extraído com etanol e água a 40°C; G-ETOH, bagaço Galega extraído com etanol a 30°C; G-ETW-30, bagaço Galega extraído com etanol e água a 30°C; G-ETW-40, bagaço Galega extraído com etanol e água a 40°C; C-ETOH, bagaço Cobrançosa extraído com etanol a 30°C; C-ETW-30, bagaço Cobrançosa extraído com etanol e água a 30°C; C-ETW-40, bagaço Cobrançosa extraído com etanol e água a 40°C).

Os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia descrita anteriormente e os tratamentos realizados em triplicado para cada amostra.

3.4. Análise dos compostos bioativos

O teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante foram determinados para todos os extratos aquosos, etanólicos e mistos obtidos pelos métodos de DPPH e FRAP.

3.4.1. Determinação do teor total de compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais (TFT) presentes nos extratos foi determinado de acordo com o método colorimétrico Folin-Ciocalteu, que é comumente usado para determinar e quantificar o teor total de compostos fenólicos.

O ensaio Folin-Ciocalteu baseia-se na redução do reagente Folin Ciocalteu por compostos fenólicos em condições de pH básico. O reagente contém complexos de ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico que são reduzidos quando em contato com fenóis, originando um cromóforo de coloração azul com absorção máxima em 765 nm. Essa intensidade de cor é proporcional ao número de grupos hidroxilo da molécula (Singleton e Rossi, 1965).

Realizou-se uma diluição prévia de 1:10 (mL de amostra/mL de água destilada) aos extratos. Pipetaram-se 100 µL de cada toma ao qual se adicionou 4 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1/10 (v/v)) e agitou-se no vortex. Após 5 minutos adicionaram-se 4 mL da solução de carbonato de sódio (7,5 % (m/v)), e agitou-se novamente no vortex. A solução foi levada a incubar durante 15 minutos a 45 °C num banho termostatizado.

No final dos 15 minutos, agitou-se no vortex novamente e mediu-se a absorvância das soluções a 765 nm, no espectrofotômetro (*Agilent Technologies; Cary Series UV-Vis Spectrophotometer*), utilizando água destilada como branco.

A curva de calibração foi feita utilizando ácido gálico como padrão numa gama de concentrações de 0 – 0,6 mg/mL

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado através da equação da reta resultante da curva padrão de ácido gálico:

$$Y = 0,7927 x + 0,0193 \quad (\text{Equação nº7})$$

$$R^2 = 0,9992$$

Onde Y corresponde aos valores de absorvância da concentração x de ácido gálico.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e ao abrigo da luz. Os resultados foram expressos em equivalentes em ácido gálico mg EAG/ g extrato.

3.4.2. Quantificação da Capacidade Antioxidante

Para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos utilizaram-se os métodos espectrofotométricos DPPH, e FRAP. Apesar de ambos os métodos serem utilizados para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos, estes são baseados em princípios diferentes, pelo que os resultados para a mesma amostra são diferentes.

Todos os passos de cada ensaio foram realizados ao máximo abrigo da luz e em triplicado (de modo a obter resultados mais fiáveis).

Em ambos os ensaios, foi previamente realizada uma diluição de 1:10 (mL de amostra / mL de água destilada) aos extratos.

3.4.2.1. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

Para a realização do ensaio FRAP seguiu-se o método colorimétrico descrito por Benzie e Strain (1996).

O ensaio FRAP avalia o poder antioxidante através da reação de redução do ião férrico Fe^{3+} (de cor amarelo-pálido) a Fe^{2+} na presença de antioxidantes, acompanhados pela formação de um complexo colorido azul com Fe^{2+} (absorção a 593 nm) (Benzie & Choi, 2014).

Começou-se por preparar o reagente FRAP, obtido a partir da mistura de solução TPTZ (10 mM), solução de Cloreto Férrico (20 mM) e solução Tampão Acetato (0,3 M; pH 3,6), na proporção de 1:1:10, respetivamente.

Pipetaram-se para tubos de ensaio 90 μ L da amostra, 270 μ L de água destilada aos quais se adicionaram 2,7 mL da solução FRAP. Agitaram-se os tubos de ensaio no Vortex e posteriormente os tubos foram colocados num banho termostaticado a 37 °C, durante 30 minutos, até a reação ocorrer.

Após o tempo de reação, leram-se as absorvâncias a 595 nm (*Agilent Technologies; Cary Series UV-Vis Spectrophotometer*), contra água destilada.

Para a determinação da curva padrão utilizaram-se concentrações conhecidas de Trolox de 0 μ M a 1000 μ M. A partir da leitura dos padrões, construiu-se a reta de calibração e determinou-se a capacidade antioxidante através interpolação com a seguinte equação da reta de regressão:

$$Y = 2,3195 x - 0,1214 \quad (\text{Equação nº8})$$

$$R^2 = 0,9765$$

Os resultados foram expressos em μ M equivalentes de Trolox por grama de extrato.

3.4.2.2. 2,2-difenil-1-picri-hidrazilo (DPPH)

A avaliação da capacidade antirradicalar dos extratos foi efetuada através do método do radical 2,2-difenil-1-picri-hidrazilo (DPPH), adaptado de Scherer & Godoy (2009).

O DPPH está entre os ensaios mais usados para avaliar a atividade antioxidante. DPPH é um radical livre estável aceitador de prótons, de cor roxa, e que quantifica a capacidade de uma substância antioxidante sequestrar radicais livres produzindo um decréscimo da absorvância a 515 nm de acordo com o poder antioxidante da amostra.

A solução DPPH é previamente preparada numa concentração de 60 µM.

Para cada tubo de ensaio pipetou-se 0,1 mL de extrato (previamente diluído) e 3,9 mL de solução DPPH 0,06 mM. Homogeneizou-se no vortex e colocou-se no escuro durante 40 minutos de modo a ocorrer a reação.

Após o período de incubação, a absorvância foi medida a 515 nm no espectrofotómetro (*Agilent Technologies; Cary Series UV-Vis Spectrophotometer*).

Foi realizada em simultâneo uma curva de calibração, seguindo os mesmos passos, mas substituindo os 0,1 mL de amostra por concentrações conhecidas de Trolox (de 0 µM a 1000 µM) permitindo determinar a reta de calibração Trolox e a sua respetiva equação:

$$Y = 0,0057 x - 0,0164 \quad (\text{Equação nº9})$$

$$R^2 = 0,9588$$

Onde Y é o valor da concentração de trolox que corresponde à percentagem de inibição x.

A taxa de inibição (IC%=%) foi calculada como se segue:

$$IC50\% = \frac{Abs0 - Abs1}{Abs0} \times 100 \quad (\text{Equação nº10})$$

Onde Abs0 corresponde à absorvância do branco com concentração 0 de trolox e Abs1 foi a absorvância na presença do composto em diferentes concentrações.

A atividade antioxidante foi expressa em mg equivalentes de Trolox / g de extrato e percentagem de inibição (IC50%), que é definida como a concentração do antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% (Cerretani *et al.*, 2010).

3.5. Avaliação da bioatividade dos compostos produzidos

Os extratos ricos em compostos bioativos sujeitos à avaliação da atividade microbiana e anti-inflamatória foram produzidos, sob condições previamente otimizadas (tabela 2), nas quantidades necessárias para estes ensaios.

3.5.1. Atividade antimicrobiana:

A atividade antimicrobiana dos extratos obtidos foi avaliada utilizando bactérias patogénicas: *Salmonella typhimurium*-CIP6062, *Staphylococcus aureus*-ATCC25923, *Escherichia coli*-ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa*-ATCC27853, *Klebsiella pneumonia*-ATCC9997, da coleção da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, como alvos.

As estirpes de bactérias foram cultivadas no meio estéril apropriado (Oxoid; Mueller Hinton ágar CM03379) por espalhamento de superfície com um swab estéril de uma colónia isolada e posteriormente, incubaram-se em 5 mL de meio (Oxoid; CM045 Mueller-Hinton), a 37 °C durante 24h.

Findo este tempo, realizou-se uma diluição no meio de 1:100 e incubou-se a 37°C (com agitação) até uma densidade ótica de 0,4-0,5 (*espectrofotómetro eppendorf biophotometer*). De seguida, diluiu-se novamente (1:100) e cultivou-se no meio estéril apropriado por espalhamento as diluições das diferentes bactérias.

Os extratos foram diluídos numa proporção 50/50 no meio correspondente e adicionaram-se um total de 20 µL da diluição numa placa com meio Mueller Hinton ágar. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h.

Um resultado positivo foi considerado quando a presença de uma zona de inibição de crescimento do microrganismo foi maior que a zona de inibição produzida apenas pelo solvente. Foram simultaneamente realizados controlos para cada extrato e solvente, de modo confirmar que não existem contaminações e a validar os resultados obtidos.

A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada pelo método de microdiluição aos extratos com resultado positivo utilizando placas estéreis *Microtiter™* de 96 Poços para cada bactéria.

Inocularam-se novamente as estripes microbianas a serem testadas no meio adequado até uma densidade ótica de 0,4-0,5 e realizaram-se duas diluições sucessivas de 1:10 até atingir a densidade celular de 10^4 - 10^5 ufc/mL (UFC: Unidade Formadora de Colónia).

Adicionaram-se 100 μ L de meio Mueller Hinton a cada poço da microplaca de 96 poços. Em seguida, pipetaram-se 100 μ L de extrato para o primeiro poço (coluna 1) e misturou-se (diluição 1:2). Transferiu-se 100 μ L da mistura do primeiro poço para o segundo poço homogeneizado. Novamente, 100 μ L da mistura foram transferidos do segundo poço para o terceiro poço e homogeneizados. Esta diluição em série foi continuada até o nono poço (diluição final 1:512). Por fim, 100 μ L foram removidos do nono poço e descartados.

Foram realizados controlos de extrato (coluna 10, 100 μ L de extrato/100 μ L de meio), da bactéria (coluna 11, 100 μ L de suspensão bacteriana/100 μ L de meio), e do meio (coluna 12, 200 μ L de meio).

Posteriormente, adicionaram-se 100 μ L de suspensão bacteriana a todos os poços (exceto a coluna de controle de esterilidade do meio e extrato) e incubaram-se as placas durante 24 horas a 37 $^{\circ}$ C.

Por fim, 20 μ L de cada poço foram inoculados em placas com meio (ágar Mueller Hinton), devidamente identificadas, a 37 $^{\circ}$ C por 24 h.

Determinou-se a concentração bactericida mínima dos extratos, identificando visualmente, a concentração mais baixa de diluição que inibe o crescimento bacteriano.

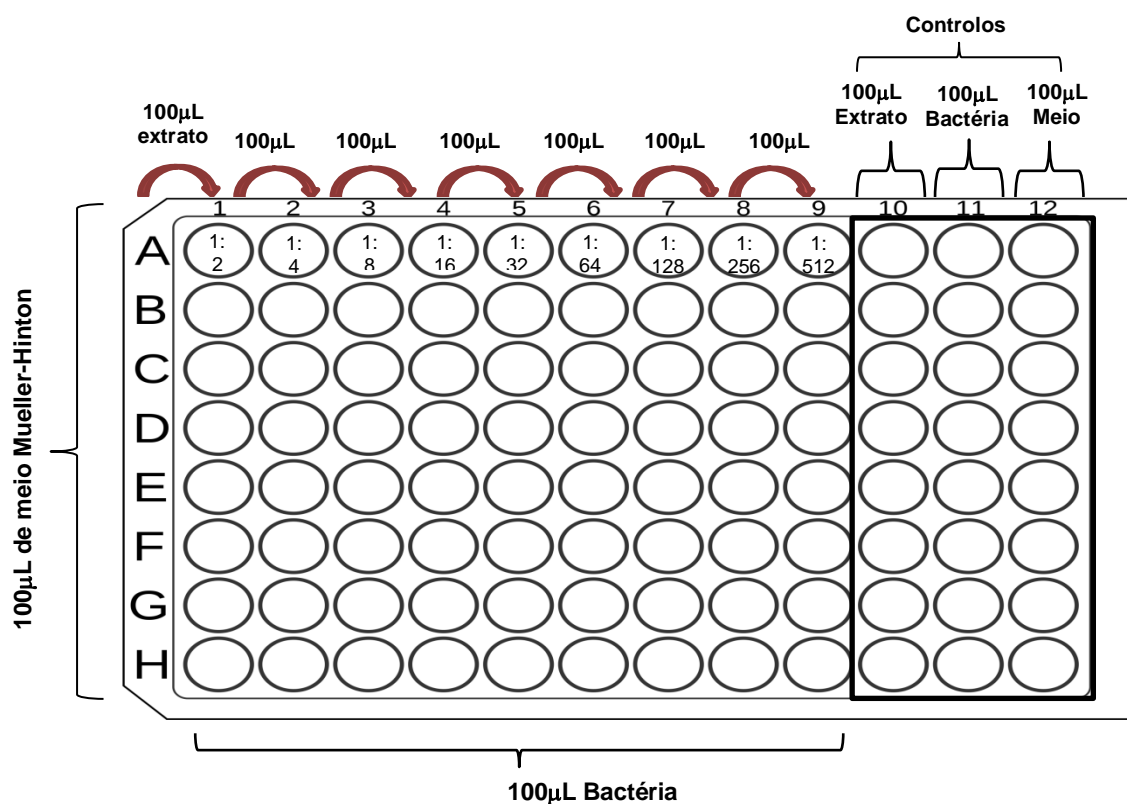


Figura 2- Esquema ilustrativo do método de determinação da concentração bactericida mínima

3.5.2. Atividade anti-inflamatória:

A desnaturação de proteínas é uma causa bem documentada de inflamação. A capacidade dos extratos de bagaço de azeitona de inibir a desnaturação de proteínas foi avaliada como mecanismo da atividade anti-inflamatória, através de dois métodos diferentes:

I. Método adaptado de Mizushima e Kobayaishi (1968)

A 500 µL de 1% de albumina sérica bovina adicionaram-se 100 µL dos diferentes extratos. O controlo realizou-se adicionando 100 µL do solvente utilizado (água e/ou etanol) nos extratos em vez das amostras. Manteve-se a mistura à temperatura ambiente por 10 minutos e de seguida aqueceu-se num banho termostaticado a 51 °C durante 20 minutos.

Leram-se as absorvâncias a 660 nm.

A percentagem de inibição para desnaturação de proteínas calculou-se de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{Abs1 - Abs0}{Abs1} \times 100 \quad (\text{Equação n}^\circ 11)$$

Onde Abs0 é a absorvância do controlo e Abs1 é a absorvância da amostra.

II. Método adaptado de Chandra *et al.* (2012)

A 1000 µL de 1% de albumina sérica bovina adicionaram-se 200 µL dos diferentes extratos. O controlo realizou-se adicionando 200 µL do solvente utilizado nos extratos em vez das amostras.

Colocou-se a mistura numa estufa a 37 °C por 15 minutos e de seguida aqueceu-se num banho termostaticado a 70 °C durante 5 minutos.

Leram-se as absorvâncias a 660 nm.

A percentagem de inibição para desnaturação de proteínas calculou-se de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{Abs1 - Abs0}{Abs1} \times 100 \quad (\text{Equação n}^\circ 12)$$

Onde Abs0 é a absorvância do controlo e Abs1 é a absorvância da amostra.

3.6. Tratamento estatístico dos resultados multivariados

De modo a caracterizar as diferentes amostras, recorreu-se a técnicas de padrão de reconhecimento, como a Análise de componentes principais (Principal component analysis, PCA) e a classificação hierárquica (*Cluster Analysis, CA*), que permitem identificar o padrão seguido pelas amostras.

A análise de componentes principais (PCA) é uma técnica multivariada que analisa uma tabela de dados na qual as observações são descritas por diversas variáveis dependentes quantitativas intercorrelacionadas, permitindo extrair as informações importantes dos dados estatísticos e representá-los como um conjunto de novas variáveis ortogonais, chamadas de componentes principais, não correlacionados entre si e apresentando variância decrescente. A PCA permite exibir o padrão de similaridade entre as observações e variáveis, e reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados composto por um grande número de variáveis inter-relacionadas, mantendo o máximo possível da variação presente no conjunto de dados (Mishra *et al.*, 2017)

4. Tratamento e discussão de Resultados

4.1. Caracterização química

A composição físico-química média de cada bagaço de azeitona, apresenta-se na Tabela 3.

Tabela 3- Composição química média da matéria-prima

Resultados dos bagaços monovarietais obtidos por Freitas *et al.* (2022).

	Caracterização Química		
	Ucasul	Cobrançosa	Galega
Índice de Maturação (IM)	-	2,5	2,89
Humidade (%)	76,8 ± 0,765	55,71 ± 0.135	54.80 ± 0.135
Cinza	9,05 ± 0,184	3,62 ± 0.137	3,90 ± 0.02
Total Extrativos	51,03 ± 0,879	57,72 ± 2.33	70,61 ± 1.03
n-hexano	19,91 ± 0,618	24,18 ± 0.41	26,85 ± 0.41
Etanol	24,70 ± 0,616	21,44 ± 2.14	31,81 ± 1.71
Água	6,43 ± 0,481	12,10 ± 0.21	11,95 ± 1.27
Lenhina Total	11,49 ± 1,268	15,52 ± 1.12	10,37 ± 0.29
Lenhina Klason	10,27 ± 0,160	15,38 ± 1.13	10,19 ± 0.30
Lenhina Solúvel	1,22 ± 0,024	0,14 ± 0.004	0,17 ± 0.01

O alto teor de humidade para os diferentes bagaços, corresponde ao intervalo de valores 50 – 70%, descrito por Gullón *et al.* (2020) para bagaços resultantes da extração do azeite realizada por um sistema de duas fases. O bagaço UCASUL apresenta um teor de humidade bastante superior aos restantes bagaços (cerca de 20% de humidade a mais). Isto pode ser justificado pelo facto dos bagaços Cobrançosa e Galega terem sido obtidos num sistema de extração Abencor, que origina bagaços menos húmidos do que os sistemas contínuos de duas fases.

O teor de cinza dos bagaços monovarietais é semelhante. Já o bagaço UCASUL apresenta um valor mais elevado (9,05%).

Os teores de extrativos totais, que incluem compostos bioativos, apresentaram valores menores no bagaço industrial UCASUL (51,03%), seguido pelo Cobrançosa (57,72%), e o bagaço da cultivar Galega apresentou os valores mais elevados (70,61%).

Os extrativos obtidos com *n*-hexano são lípidos. Os valores dos bagaços monovarietais são superiores aos do bagaço industrial. Tal é explicado pelo baixo rendimento de extração do equipamento laboratorial, que origina grandes perdas de gorduras nos bagaços.

O total de extrativos em etanol e água foi de aproximadamente 31%, 33% e 44%, respectivamente. Os extrativos mais polares, removidos por etanol e água, constituem a maior parte dos extrativos totais correspondendo em média a cerca de 60% do teor de extrativos totais, e podem variar de acordo com a cultivar, índice de maturação (IM), e condições de armazenamento.

Os componentes estruturais de lenhina total, lenhina Klason e de lenhina solúvel dos bagaços correspondem a aproximadamente a 11,49 %, 10,27% e 1,22% para o bagaço UCASUL, a 15,52%, 15,38% e 0,14%, respectivamente, para o bagaço Cobrançosa e 10,37%, 10,19% e 0,17% para o bagaço Galega.

4.2. Otimização das condições operacionais

O teor de compostos fenólicos bem como a sua atividade antioxidante das amostras de bagaço da UCASUL submetidos às condições de extração da matriz fatorial (tabela 1), estão representados na tabela 4.

Tabela 4- Teor de fenóis totais e atividade antioxidante, avaliada pelos métodos DPPH e FRAP, das amostras de bagaço UCASUL sujeitos a diferentes condições de extração

Condições de extração						DPPH		FRAP	TFT
Amostra	T (°C)	t (min)	H2O (%)	EtOH (%)	U.S (min)	IC50%	[trolox] mg/g amostra	[trolox] mg/g amostra	mg GAE/g extrato
1	30	30	100	0	0	86,61	9,16	30,62	39,35
2	50	30	100	0	0	86,84	9,28	31,40	36,82
3	30	90	100	0	0	88,14	9,68	32,12	31,65
4	50	90	100	0	0	89,97	9,92	32,24	40,52
5	30	30	0	100	0	91,06	10,03	35,31	34,99
6	50	30	0	100	0	91,04	9,99	35,00	38,22
7	30	90	0	100	0	91,36	10,06	35,64	31,26
8	50	90	0	100	0	90,35	9,82	34,99	37,41
9	30	30	100	0	15	88,74	9,52	44,45	44,25
10	50	30	100	0	15	90,07	9,89	38,32	27,40
11	30	90	100	0	15	88,55	9,70	46,47	41,17
12	50	90	100	0	15	87,31	9,63	47,54	41,56
13	30	30	0	100	15	95,94	10,46	48,35	40,80
14	50	30	0	100	15	95,77	10,55	48,83	43,80
15	30	90	0	100	15	96,04	10,26	48,53	39,30
16	50	90	0	100	15	96,64	9,97	47,10	38,34
PC1	40	60	50	50	0	86,97	9,49	32,58	40,34
PC2	40	60	50	50	15	92,14	10,11	47,29	44,76

De modo estabelecer as condições de extração ideais para obter o máximo de teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante dos extratos, foi necessário avaliar como é que os diferentes fatores afetam os parâmetros resposta (TPC, FRAP, DPPH) e as eventuais inter-relações entre as variáveis de teste.

Neste sentido, realizou-se uma análise estatística do desenho fatorial, recorrendo ao software STATISTICA statsoft, USA, para realizar tabelas ANOVA, e à metodologia de Superfície de Resposta.

Teor de compostos Fenólicos Totais (TFT)

O teor de compostos fenólicos totais variou entre 27,40 (ensaio 10) e 44,76 (ensaio PC2) GAE/g extrato. O ensaio PC2 (EtOH:H₂O 50:50, tempo de extração 60 min, temperatura 40 °C, sonda ultrassons 15 min) mostrou os maiores teores de TPC enquanto o ensaio 10 (H₂O 100%, tempo de extração 30 min, temperatura 50 °C, sonda ultrassons 15 min) apresenta os menores teores de TFT.

A tabela 5 mostra os efeitos dos vários fatores considerados, bem como das suas interações e repetíveis níveis de significância (p).

Como é possível observar na tabela 5, nenhum dos fatores apresenta efeito significativo nos teores de fenóis totais das amostras de extrato.

Tabela 5- Efeitos lineares e interações dos fatores T, t, solvente e tempo de aplicação de U.S no teor de fenóis dos extratos de bagaço UCASUL

	Efeito	Std.Err.	t(5)	p	-95,00%	95,00%	Coeff.	Std.Err.	-95,00%	95,00%
					Cnf.Limt	Cnf.Limt	Coeff.	Coeff.	Cnf.Limt	Cnf.Limt
Mean/Interc.	37,928	1,115	34,029	0,000	35,063	40,793	37,928	1,115	35,063	40,793
(1)Temperatura	0,162	2,229	0,072	0,945	-5,569	5,892	0,081	1,115	-2,784	2,946
(2)Tempo (min)	-0,552	2,229	-0,247	0,814	-6,282	5,179	-0,276	1,115	-3,141	2,589
(3)EtOH (%)	0,172	2,229	0,077	0,941	-5,558	5,903	0,086	1,115	-2,779	2,951
(4)US (min)	3,301	2,229	1,481	0,199	-2,429	9,031	1,650	1,115	-1,215	4,515
1 by 2	3,452	2,229	1,549	0,182	-2,278	9,182	1,726	1,115	-1,139	4,591
1 by 3	2,691	2,229	1,207	0,281	-3,040	8,421	1,345	1,115	-1,520	4,210
1 by 4	-3,771	2,229	-1,692	0,151	-9,501	1,959	-1,886	1,115	-4,751	0,980
2 by 3	-2,322	2,229	-1,042	0,345	-8,052	3,408	-1,161	1,115	-4,026	1,704
2 by 4	1,584	2,229	0,710	0,509	-4,146	7,314	0,792	1,115	-2,073	3,657
3 by 4	1,789	2,229	0,803	0,459	-3,941	7,519	0,895	1,115	-1,970	3,760

DPPH

Os extratos de bagaço de azeitona obtidos no ensaio 14 (100% ETOH, tempo de extração 30 min, temperatura 50 °C, sonda ultrassons 15 min) apresentaram a melhor atividade sequestrante de radicais (DPPH), correspondente a 10,55 [trolox] mg/g amostra, e os valores obtidos no ensaio 1 (H2O 100%, tempo de extração 30 min, temperatura 30 °C e sem tempo de sonda ultrassons) a atividade mais fraca com 9,16 [trolox] mg/g amostra.

A tabela 6 apresenta os valores dos efeitos lineares dos diferentes fatores estudados, interações e respetivos níveis de significância, na atividade antioxidante avaliada pelo método DPPH.

Como é possível constatar na tabela 6, os valores de DPPH apresentam um aumento nos tratamentos realizados com o solvente etanol (a 96%) e quando se utilizou um pré-tratamento de U.S.

Tabela 6- Efeitos lineares e interações dos fatores T, t, solvente e tempo de aplicação de U.S nos valores de DPPH dos extratos de bagaço UCASUL

	Effect	Std.Err.	t(5)	p	-95,00%	95,00%	Coeff.	Std.Err.	-95,00%	95,00%
					Cnf.Limt	Cnf.Limt	Coeff.		Cnf.Limt	Cnf.Limt
Mean/Interc.	9,870	0,030	331,009	0,000	9,793	9,947	9,870	0,030	9,793	9,947
(1)Temperatura	0,022	0,060	0,365	0,730	-0,132	0,175	0,011	0,030	-0,066	0,088
(2)Tempo (min)	0,022	0,060	0,375	0,723	-0,131	0,176	0,011	0,030	-0,065	0,088
(3)EtOH (%)	0,545	0,060	9,134	0,000	0,391	0,698	0,272	0,030	0,196	0,349
(4)US (min)	0,254	0,060	4,268	0,008	0,101	0,408	0,127	0,030	0,051	0,204
1 by 2	-0,113	0,060	-1,891	0,117	-0,266	0,041	-0,056	0,030	-0,133	0,020
1 by 3	-0,141	0,060	-2,369	0,064	-0,295	0,012	-0,071	0,030	-0,147	0,006
1 by 4	0,003	0,060	0,042	0,968	-0,151	0,156	0,001	0,030	-0,075	0,078
2 by 3	-0,249	0,060	-4,167	0,009	-0,402	-0,095	-0,124	0,030	-0,201	-0,048
2 by 4	-0,233	0,060	-3,908	0,011	-0,386	-0,080	-0,117	0,030	-0,193	-0,040
3 by 4	0,081	0,060	1,361	0,232	-0,072	0,234	0,041	0,030	-0,036	0,117

São também significativas e negativas, as interações Temperatura x Etanol (1x3), tempo x Etanol (2x3) e tempo x Ultrassons (2 x 4). Isto significa que o aumento simultâneo de ambos os factores leva a uma diminuição da atividade antioxidante avaliado pelo DPPH.

Estas observações são provavelmente consequência de tratamentos que se mostram agressivos e degradam os compostos responsáveis pela atividade antioxidante.

A figura 3 apresenta a superfície de resposta ajustada aos valores de DPPH em função do solvente utilizado e do tempo de ultrassons.

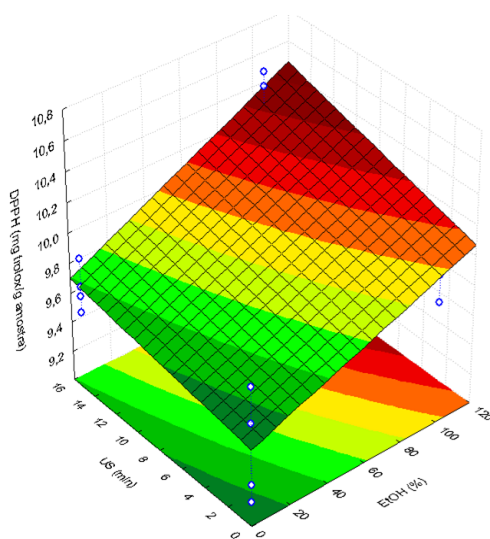


Figura 3- Gráfico de superfície de resposta tridimensional: DPPH vs U.S vs ETOH%

Verifica-se que os valores mais elevados de DPPH se obtiveram quando se utilizou etanol (a 96%) como solvente de extração e 15 minutos de pré-tratamento com U.S. O mesmo comportamento foi observado com a atividade expressa em IC50%.

FRAP

No geral, todos os extratos apresentaram elevada atividade antioxidante. Os valores de FRAP variaram entre 30,61 e 48,82 [trolox] mg/g amostra. O valor mais alto, ensaio 14, está associado às seguintes condições: ETOH 100%, tempo de extração 30 min, temperatura 50 °C e sonda ultrassons 15 minutos. O ensaio 1 apresenta os valores menores, e foi obtida nas condições: H₂O 100%, tempo de extração 30 min, temperatura 30 °C e sem pré-tratamento com contacto com sonda de ultrassons.

Os valores obtidos para a atividade antioxidante avaliada pelo método FRAP, e pelo DPPH, apresentam um aumento nos tratamentos com a utilização do solvente etanol (tabela 7).

Tabela 7- Efeitos lineares e interações dos fatores T, t, solvente e tempo de aplicação de U.S nos valores de FRAP dos extratos de bagaço UCASUL

	Effect	Std.Err.	t(5)	p	-95,00%	95,00%	Coeff.	Std.Err.	-95,00%	95,00%
					Cnf.Limt	Cnf.Limt	Coeff.	Cnf.Limt	Cnf.Limt	Cnf.Limt
Mean/Interc.	39,805	0,528	75,375	0,000	38,448	41,163	39,805	0,528	38,448	41,163
(1)Temperature	-0,760	1,056	-0,719	0,504	-3,475	1,955	-0,380	0,528	-1,737	0,978
(2)Time (min)	1,543	1,056	1,461	0,204	-1,172	4,258	0,771	0,528	-0,586	2,129
(3)EtOH (%)	3,825	1,056	3,622	0,015	1,110	6,540	1,913	0,528	0,555	3,270
(4)US (min)	12,788	1,056	12,107	0,000	10,073	15,503	6,394	0,528	5,036	7,751
1 by 2	0,539	1,056	0,510	0,632	-2,176	3,254	0,270	0,528	-1,088	1,627
1 by 3	0,280	1,056	0,265	0,802	-2,435	2,995	0,140	0,528	-1,218	1,497
1 by 4	-0,743	1,056	-0,703	0,513	-3,458	1,972	-0,371	0,528	-1,729	0,986
2 by 3	-1,853	1,056	-1,754	0,140	-4,568	0,862	-0,926	0,528	-2,284	0,431
2 by 4	0,878	1,056	0,832	0,444	-1,837	3,593	0,439	0,528	-0,918	1,797
3 by 4	0,183	1,056	0,174	0,869	-2,532	2,898	0,092	0,528	-1,266	1,449

No caso da atividade antioxidante avaliada pelo método FRAP, o pré-tratamento de 15 minutos com U.S e o uso de etanol como solvente apresentam efeito positivo, à semelhança do observado para a atividade medida pelo método DPPH (figura 4).

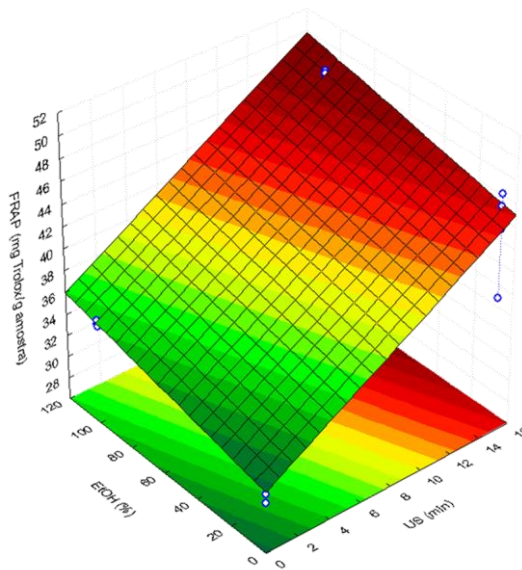


Figura 4- Gráfico de superfície de resposta tridimensional: FRAP vs U.S vs ETOH%

4.3. Condições matriz fatorial selecionada (otimizada)

Os métodos de delineamento multivariados provaram ser ferramentas úteis para selecionar as condições operacionais mais adequadas (temperatura, tempo, solvente, ultrassons) para atingir a extração máxima de compostos bioativos de bagaços de azeitona.

Os valores de atividade antioxidante mais altos foram obtidos nas condições com tratamentos de ultrassons (15min), com solvente etanol (100%) e mistura de solventes (água/etanol 50:50), correspondendo ao ensaio PC2. Sendo estas as condições escolhidas para a obtenção dos extratos a serem analisados.

As variáveis de temperatura e de tempo de reação utilizadas nos tratamentos com valores mais elevados ($T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t=90\text{ minutos}$) provaram ser degradativos para os compostos responsáveis pela atividade antioxidante.

Consequentemente, um tempo de extração menor (30 minutos) e uma faixa de temperatura de $30\text{-}40\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram selecionados para a extração, correspondendo também a um menor consumo de energia. Assim, o bagaço industrial e os bagaços monovarietais de Galega e Cobrançosa foram sujeitos a diferentes extrações, durante 30 minutos, após 15 minutos de U.S (tabela 8)

Para cada amostra o ensaio foi realizado a triplicar.

Os resultados para os diferentes ensaios de TFT, DPPH e FRAP estão representados na tabela 8.

Tabela 8- Condições de extração do bagaço industrial e dos bagaços monovarietais e resultados TFT, DPPH e FRAP

Extratos	T (°C)	t (min)	H2O (%)	EtOH (%)	U.S (min)	DPPH		FRAP	TFT
						%IC50	[trolox] mg/g amostra	[trolox] mg/g amostra	mg GAE/g extrato
U-EtOH	30	30	0	100	15	33,58 ± 2,272	33,79 ± 2,336	34,76 ± 2,213	36,89 ± 0,235
G-EtOH	30	30	0	100	15	41,78 ± 5,160	41,93 ± 4,144	53,59 ± 6,362	51,11 ± 1,252
C-EtOH	30	30	0	100	15	63,86 ± 3,258	68,69 ± 3,444	80,24 ± 4,684	70,27 ± 1,607
U-EtW-30	30	30	50	50	15	50,65 ± 2,391	53,76 ± 2,895	31,49 ± 0,350	43,27 ± 1,335
G-EtW-30	30	30	50	50	15	64,26 ± 1,821	67,11 ± 3,240	63,92 ± 3,977	71,50 ± 1,545
C-EtW-30	30	30	50	50	15	84,75 ± 0,978	89,25 ± 2,273	89,55 ± 5,755	71,58 ± 2,962
U-EtW-40	40	30	50	50	15	59,65 ± 0,326	63,60 ± 0,477	34,74 ± 2,711	48,78 ± 3,662
G-EtW-40	40	30	50	50	15	63,55 ± 3,099	66,19 ± 0,664	78,27 ± 3,938	56,96 ± 1,007
C-EtW-40	40	30	50	50	15	84,59 ± 2,788	89,78 ± 2,335	97,09 ± 5,065	65,43 ± 7,120

Legenda: U-ETOH, UCASUL (100% ETOH, 30°C); U-ETW-30, UCASUL (50 ETOH/ 50 H2O, 30°C); U-ETW-40, UCASUL (50 ETOH/ 50 H2O, 40°C); G-ETOH, Galega (100% ETOH, 30°C); G-ETW-30, Galega (50 ETOH/ 50 H2O, 30°C); G-ETW-40, Galega (50 ETOH/ 50 H2O, 40°C); C-ETOH, Cobraçosa (100% ETOH, 30°C); C-ETW-30, Cobraçosa (50 ETOH/ 50 H2O, 30°C); C-ETW-40, Cobraçosa (50 ETOH/ 50 H2O, 40°C).

Como é possível observar, diferentes tratamentos e cultivares de azeitona resultam em diferentes respostas. Em geral, os extratos de bagaços monovarietais apresentaram teores mais elevados de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante.

As amostras com maior teor de antioxidante foram as amostras C-Etw-40 (cultivar Cobraçosa, solvente etanol/águas 50:50, 40 °C) e C-Etw-30 (cultivar Cobraçosa, solvente etanol/água 50:50, 30 °C), seguidos pela C-EtOH, G-EtW-30, G-etW-40.

Os extratos obtidos usando os bagaços provenientes da UCASUL apresentaram os menores valores.

Estes valores seriam esperados, uma vez que esta é uma matéria-prima industrial que consiste numa mistura de diferentes bagaços de azeitona provenientes de diversas unidades

de extração de azeite, que estão em contacto direto com o ar, durante longos períodos, resultando na oxidação destes mesmos.

4.4. Avaliação da bioatividade dos compostos produzidos

Tendo em conta que os resultados das repetições efetuadas para cada amostra em diferentes condições de extração não apresentam diferenças significativas em nenhum dos diferentes ensaios realizados (TFT; FRAP; DPPH), selecionou-se apenas um extrato representativo das diferentes condições de extração, de modo a realizar os ensaios de avaliação da bioatividade dos compostos produzidos.

4.4.1. Atividade anti-inflamatória

Alterações nas moléculas de proteínas, como a desnaturação e conseqüentemente a perda da sua função biológica, estão envolvidas na iniciação e progressão do processo inflamatório. Este efeito de anti-desnaturação pode ser, portanto, um bom alvo na busca de efeitos anti-inflamatórios (Grabowska *et al.* 2018).

Os resultados dos ensaios da atividade anti-inflamatória de ambos os métodos elaborados de desnaturação de proteínas estão representados na tabela 9.

Tabela 9- Resultados atividade anti-inflamatória dos extratos

Extrato	Solvente	Método I		Método II	
		Abs Média	% Inibição	Abs Média	% Inibição
U-ETOH	Etanol	0,841	97,11	0,847	98,54
G-ETOH	Etanol	0,821	97,04	0,781	98,42
C-ETOH	Etanol	0,728	96,66	0,544	97,73
U-ETW-30	Etanol/H2O (50:50)	0,708	98,73	0,834	97,60
G-ETW-30	Etanol/H2O (50:50)	0,164	94,51	0,159	87,45
C-ETW-30	Etanol/H2O (50:50)	0,106	91,48	0,261	92,35
U-ETW-40	Etanol/H2O (50:50)	0,694	98,70	0,835	97,61
G-ETW-40	Etanol/H2O (50:50)	0,816	98,90	0,820	97,56
C-ETW-40	Etanol/H2O (50:50)	0,662	98,64	0,802	97,51

Método adaptado de Mizushima e Kobayaishi 1968 (I); Método adaptado de Chandra *et al.* 2012 (II).

Legenda: U-ETOH, UCASUL (100% ETOH, 30°C); U-ETW-30, UCASUL (50 ETOH/ 50 H₂O, 30°C); U-ETW-40, UCASUL (50 ETOH/ 50 H₂O, 40°C); G-ETOH, Galega (100% ETOH, 30°C); G-ETW-30, Galega (50 ETOH/ 50 H₂O, 30°C) ; G-ETW-40, Galega (50 ETOH/ 50 H₂O, 40°C); C-ETOH, Cobrançosa (100% ETOH, 30°C); C-ETW-30, Cobrançosa (50 ETOH/ 50 H₂O, 30°C); C-ETW-40, Cobrançosa (50 ETOH/ 50 H₂O, 40°C).

Os valores de percentagens de inibição da desnaturação de proteínas variam de 91,48 - 98,90 % para o método I (Mizushima e Kobayaishi, 1968) e de 87,44 - 98,54% para o método II (Chandra *et al.* 2012).

As percentagens de inibição máxima obtidas pelo método I são provenientes dos extratos resultantes de uma mistura hidroalcoólica (50% água: 50% etanol) nomeadamente, G-ETW-40, U-ETW-40e U-ETW-30). Já com o método II os extratos que apresentaram uma percentagem de inibição mais elevada foram os extratos etanólicos (U-ETOH, G-ETOH, C-ETOH).

De acordo com Mizushima e Kobayaishi (1968), quatro medicamentos com atividade anti-inflamatória reconhecida estabilizaram proteínas séricas contra a coagulação por calor, atingindo a percentagem média de inibição nos valores de: 81% para o ácido salicílico (0.18 mg/mL), 72% para a Fenilbutazona (0,12 mg/mL), 43% no ácido flufenâmico (0,03 mg/mL), e 59% para o lbufenac (0,04 mg/mL). A aspirina, um medicamento anti-inflamatório padrão, provocou uma inibição da desnaturação de proteínas máxima de 81% na concentração de 100 µg/mL, em relação ao controlo (Rajesh *et al.* 2019).

No presente estudo, os resultados indicam que os extratos obtidos possuem propriedades anti-inflamatórias consideráveis com os métodos selecionados, sendo eficazes na inibição da desnaturação da albumina induzida pelo calor. Essas propriedades advêm presumivelmente da presença de altos teores de compostos bioativos. No entanto, o estudo da caracterização do perfil fenólico das amostras obtidas é necessário de modo a encontrar os componentes e mecanismos de ação presentes nos extratos de bagaços de azeitona relacionados com as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

4.4.2. Caracterização dos extratos com base na sua atividade antioxidante e anti-inflamatória

De modo a caracterizar os diferentes extratos obtidos a partir dos três bagaços estudados e avaliar eventuais relações entre eles e quais os parâmetros mais importantes na sua caracterização, os resultados relativos ao teor em compostos fenólicos, atividade

antioxidante (FRAP e DPPH) e anti-inflamatória foram sujeitos a uma análise em componentes principais.

A correlação entre as diferentes variáveis resposta está presente na seguinte tabela (tabela 10). Tendo em conta que o RSA% está fortemente correlacionado com o DPPH ([trolox] mg/g amostra), uma vez que estes valores se obtêm a partir do mesmo método, considerou-se apenas o valor dos resultados em [trolox].

Tabela 10- Matriz de correlação entre variáveis

	DPPH	FRAP	TPC	%Inhib-I	% Inhib-II
DPPH	1	0,81	0,80	-0,34	-0,38
FRAP	0,81	1	0,84	-0,35	-0,25
TPC	0,80	0,84	1	-0,57	-0,62
%Inhib-I	-0,34	-0,35	-0,57	1	0,71
% Inhib-II	-0,38	-0,25	-0,62	0,71	1

O teor em compostos fenólicos está altamente correlacionado com as atividades antioxidantes DPPH e FRAP mas negativamente (e numa correlação mais baixa) com a atividade anti-inflamatória, o que parece demonstrar que não são apenas os compostos fenólicos responsáveis pela atividade anti-inflamatória nos extratos.

Os dois métodos de determinação da % de inibição estão altamente correlacionados entre si.

Através da PCA, os 5 eixos do hiperespaço definido pelas 5 variáveis iniciais podem ser reduzidos a dois (componentes principais) porque apenas os dois primeiros apresentam valores próprios maiores do que 1 e por isso são significativos (tabela 11).

Tabela 11- Valores próprios da matriz de correlação e estatísticas relacionadas (PCA-extratos)

	Valores próprios	Variância Total %	Valor próprio cumulativo	Cumulativo %
1	3,30	66,07	3,30	66,07
2	1,11	22,27	4,42	88,34
3	0,33	6,66	4,75	95,00
4	0,18	3,69	4,93	98,68
5	0,07	1,32	5,00	100,00

O primeiro eixo explica cerca de 66% da variância da informação e o segundo cerca de 22%. Ou seja, o plano projetado (1x2) explica cerca de 88,34% da informação da matriz inicial.

As projeções das variáveis e amostras originais no plano definido pelos dois primeiros componentes principais (fatores 1 e 2) está representada na figura 5.

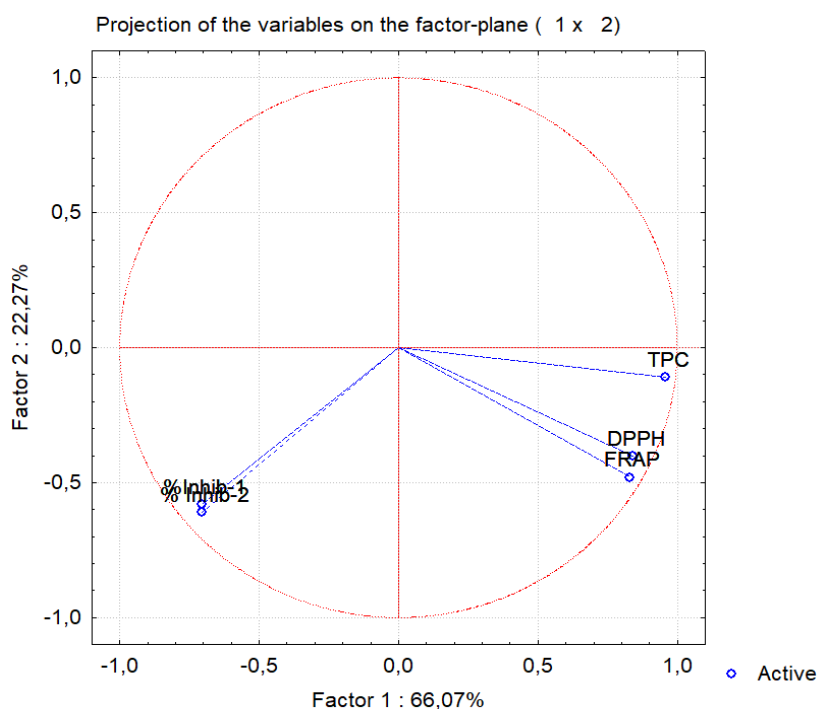


Figura 5- Projeções das variáveis no plano definido pelas duas primeiras componentes principais (1X2)

Como é possível observar mais uma vez, o método de inibição I e II estão altamente correlacionados. No entanto não mostram qualquer relação com o TFT e atividades antioxidante, o que leva a crer que os compostos responsáveis por estas atividades sejam diferentes. Ao longo do primeiro eixo (fator 1), os teores de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante avaliada por ambos os métodos aumentam no sentido positivo. A atividade anti-inflamatória aumenta no sentido negativo do eixo.

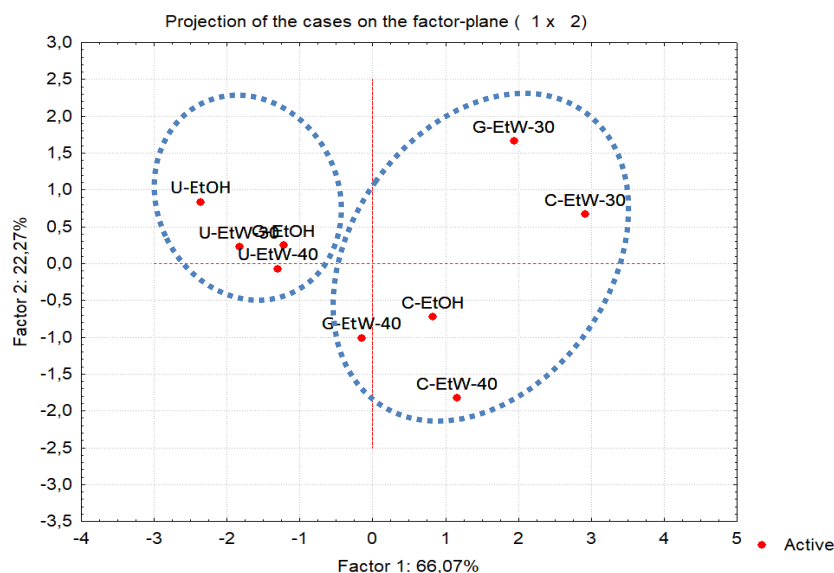


Figura 6- Projeção das amostras no plano definido pelas duas primeiras componentes principais (1X2)

Legenda: U-ETOH, UCASUL (100% ETOH, 30°C); U-ETW-30, UCASUL (50 ETOH/ 50 H₂O, 30°C); U-ETW-40, UCASUL (50 ETOH/ 50 H₂O, 40°C); G-ETOH, Galega (100% ETOH, 30°C); G-ETW-30, Galega (50 ETOH/ 50 H₂O, 30°C) ; G-ETW-40, Galega (50 ETOH/ 50 H₂O, 40°C); C-ETOH, Cobrançosa (100% ETOH, 30°C); C-ETW-30, Cobrançosa (50 ETOH/ 50 H₂O, 30°C); C-ETW-40, Cobrançosa (50 ETOH/ 50 H₂O, 40°C).

A figura 6 apresenta a projeção das amostras no plano 1x2.

Os extratos que apresentam valores maiores de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante são os extratos da Cultivar Cobrançosa (C-ETOH, C-ETW-30, C-ETW-40) juntamente com os extratos G-ETW-30 e G-ETW-40.

As amostras da cultivar UCASUL (U-ETOH, U-ETW-30, U-ETW-40) e G-ETOH, representam um grupo distinto localizado no 4º quadrante: são amostras mais pobres em componentes fenólicos, com menor atividade antioxidante, mas com maior atividade anti-inflamatória.

A classificação hierárquica aglomerativa permitiu avaliar a existência de possíveis grupos de amostras sugeridas pelo PCA. A aglomeração a efetuar numa dada etapa é a fusão dos dois subgrupos (classes) considerados mais “semelhantes”. A forma usual de representar graficamente as sucessivas fusões de subgrupos num método de classificação hierárquico é através dum dendrograma, numa representação em forma de árvore, como na figura 7.

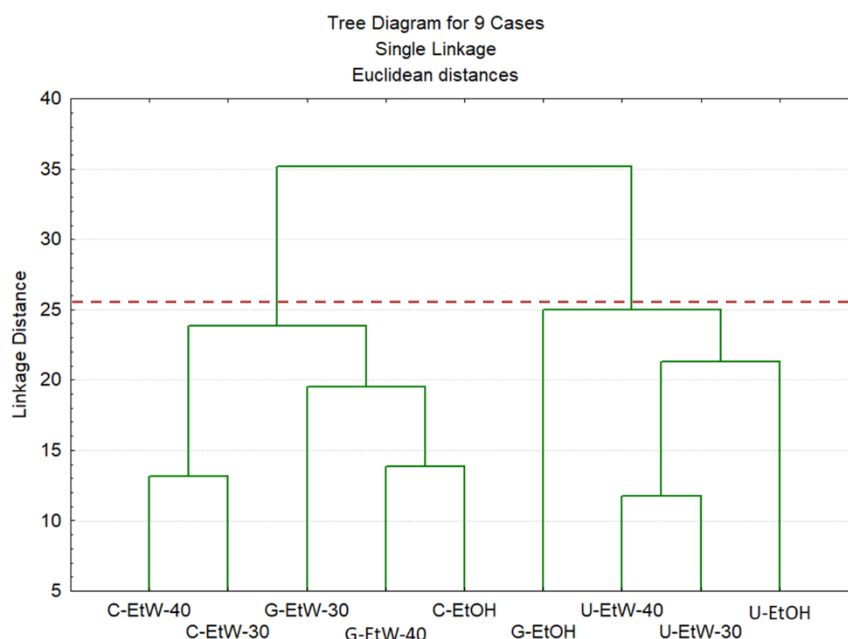


Figura 7- Dendrograma dos extratos obtido pela análise Cluster

Legenda: U-ETOH, UCASUL (100% ETOH, 30°C); U-ETW-30, UCASUL (50 ETOH/ 50 H₂O, 30°C); U-ETW-40, UCASUL (50 ETOH/ 50 H₂O, 40°C); G-ETOH, Galega (100% ETOH, 30°C); G-ETW-30, Galega (50 ETOH/ 50 H₂O, 30°C) ; G-ETW-40, Galega (50 ETOH/ 50 H₂O, 40°C); C-ETOH, Cobrançosa (100% ETOH, 30°C); C-ETW-30, Cobrançosa (50 ETOH/ 50 H₂O, 30°C); C-ETW-40, Cobrançosa (50 ETOH/ 50 H₂O, 40°C).

Um corte no dendrograma ao nível de cerca 25 de distância de ligação permite agrupar os extratos em dois grupos (Grupo 1: U-ETOH, U-ETW-30, U-ETW-40 e G-ETOH; Grupo 2: C-ETOH, G-ETW-40, G-ETW-30, C-ETW-30 e C-ETW-40). Estes grupos coincidem com os grupos sugeridos pelo PCA e identificados na figura 8.

4.4.3. Atividade antimicrobiana

Em geral, quanto à presença de uma zona de inibição de crescimento do microrganismo, os extratos de bagaço de azeitona apresentaram diferentes resultados em relação às bactérias estudadas (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*, *E. coli*) em diferentes níveis, conforme apresentado na Tabela 12.

Tabela 12- Resultados gerais da atividade antimicrobiana dos extratos

Extratos Bagaço Azeitona											
Microrganismo	Estirpe	Tipo	U-	G-	C-	U-	G-	C-	U-	G-	C-
			ETOH	ETOH	ETOH	ETW-30	ETW-30	ETW-30	ETW-40	ETW-30	ETW-40
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Gram positiva	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Gram negativa	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Gram negativa	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 9997	Gram negativa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	CIP 6062	Gram negativa	+	+	+	-	-	-	-	-	-

(+), Positivo; (-), negativo.

Legenda: U-ETOH, UCASUL (100% ETOH, 30°C); U-ETW-30, UCASUL (50 ETOH/ 50 H₂O, 30°C); U-ETW-40, UCASUL (50 ETOH/ 50 H₂O, 40°C); G-ETOH, Galega (100% ETOH, 30°C); G-ETW-30, Galega (50 ETOH/ 50 H₂O, 30°C); G-ETW-40, Galega (50 ETOH/ 50 H₂O, 40°C); C-ETOH, Cobrançosa (100% ETOH, 30°C); C-ETW-30, Cobrançosa (50 ETOH/ 50 H₂O, 30°C); C-ETW-40, Cobrançosa (50 ETOH/ 50 H₂O, 40°C).

Os extratos obtidos com o solvente etanol foram os únicos a apresentar resultados visíveis relativamente à sua capacidade antimicrobiana (diluição 1:2). Os extratos etanólicos apresentaram atividade antimicrobiana relativamente às bactérias *E. coli*, *S. aureus* (excepto C-ETOH), *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*.

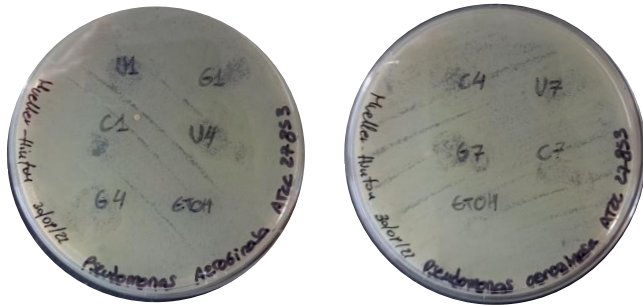


Figura 9- Atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

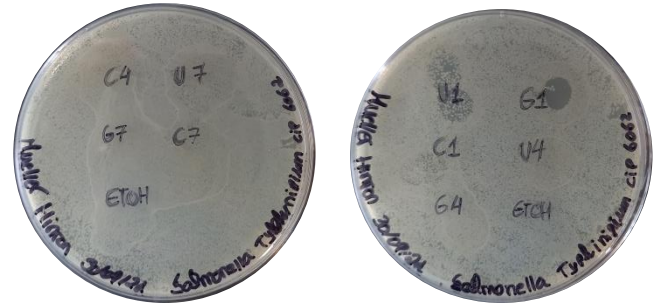


Figura 8- Atividade antimicrobiana contra *Salmonella typhimurium* CIP 6062



Figura 11- Atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Figura 10- Atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* ATCC 25922

Legenda: U1: U-ETOH (UCASUL, 100% ETOH, 30°C); U4: U-ETW-30 (UCASUL, 50 ETOH/ 50 H2O, 30°C); U7: U-ETW-40 (UCASUL, 50 ETOH/ 50 H2O, 40°C); G1: G-ETOH (Galega, 100% ETOH, 30°C); G4: G-ETW-30 (Galega, 50 ETOH/ 50 H2O, 30°C); G7: G-ETW-40 (Galega, 50 ETOH/ 50 H2O, 40°C); C1: C-ETOH (Cobrançosa, 100% ETOH, 30°C); C4: C-ETW-30 (Cobrançosa, 50 ETOH/ 50 H2O, 30°C); C7: C-ETW-40 (Cobrançosa, 50 ETOH/ 50 H2O, 40°C).

A estrutura e composição da parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas são diferentes, o que pode explicar a variação de suscetibilidade em relação aos extratos vegetais. Estruturalmente, as paredes das bactérias Gram-negativas, são mais diferenciadas e complexas do que as gram-positivas, contendo o componente lipopolissacarídeo que os torna mais resistentes a agentes antibacterianos. As bactérias gram-positivas têm uma parede homogênea que não contém fosfolípidios, o que as torna mais sensíveis a vários extratos vegetais (Nunes *et al*, 2021).

No entanto, apenas os extratos U-ETOH (UCASUL, 100% ETOH, 30 °C) e G-ETOH (Galega, 100% ETOH, 30 °C) mostraram efeito antimicrobiano para a bactéria gram-positiva *S. aureus*.

Para os extratos resultantes da extração com solventes de diferente polaridade (etanol/ água 50:50) não foi possível observar resultados visíveis de inibição de crescimento dos microrganismos.

Nenhum extrato apresentou qualquer efeito antimicrobiano contra a bactéria gram negativa *Klebsiella pneumoniae* (figura 14).



Figura 12- Atividade antimicrobiana contra *Klebsiella pneumoniae* ATCC 9997

Legenda: U1: U-ETOH (UCASUL, 100% ETOH, 30°C); U4: U-ETW-30 (UCASUL, 50 ETOH/ 50 H₂O, 30°C); U7: U-ETW-40 (UCASUL, 50 ETOH/ 50 H₂O, 40°C); G1: G-ETOH (Galega, 100% ETOH, 30°C); G4: G-ETW-30 (Galega, 50 ETOH/ 50 H₂O, 30°C); G7: G-ETW-40 (Galega, 50 ETOH/ 50 H₂O, 40°C); C1: C-ETOH (Cobrançosa, 100% ETOH, 30°C); C4: C-ETW-30 (Cobrançosa, 50 ETOH/ 50 H₂O, 30°C); C7: C-ETW-40 (Cobrançosa, 50 ETOH/ 50 H₂O, 40°C).

Foi ainda possível confirmar através dos controlos realizados, que nenhum dos extratos ou solvente continha alguma contaminação.

Para os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana nos métodos descritos anteriormente, foram testados relativamente à sua Concentração Bactericida Mínima (CBM), pela metodologia de microdiluição em placa de 96 poços.

Os resultados representados na tabela 13 resultam da observação visual da concentração mais baixa de diluição que iniba o crescimento bacteriano (figuras 15, 16, 17 e 18).

Tabela 13- Concentração Bactericida Mínima dos extratos

Concentração Bactericida Mínima (g bagaço/100 mL)				
Extratos	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
U-ETOH	1,25	2,5	1,25	2,5
G-ETOH	1,25	1,25	0,625	1,25
C-ETOH	-	0,625	0,625	0,625

U-ETOH, UCASUL (100% ETOH, 30°C); G-ETOH, Galega (100% ETOH, 30°C); C-ETOH, Cobrançosa (100% ETOH, 30°C)

O extrato C-ETOH apresenta os melhores resultados de Concentração Bactericida Mínima (0,625 g bagaço/100 mL) para as diferentes bactérias analisadas. Simultaneamente este extrato é também o que apresenta os valores mais elevados relativamente ao teor de fenólicos totais e atividade antioxidante (FRAP, DPPH).

No caso de *S. aureus*, a concentração bactericida mínima do extrato U-ETOH contra *S. aureus* apresenta um valor igual à obtida por G-ETOH contra a mesma bactéria (1,25 g bagaço/100 mL).

O U-ETOH, que apresentou a menor quantidade de fenóis totais (37 mg GAE/g extrato), e atividade antioxidante (%IC50= 36,11; [trolox] mg/g amostra= 32,41 (FRAP) também apresentou menor resultado de CBM para as bactérias *E. coli* (2,5 g bagaço/100 mL), *Salmonella typhimurium* (2,5 g bagaço/100 mL) e *Pseudomonas aeruginosa* (1,25 g bagaço/100 mL).

O extrato G-ETOH apresentou valores de diluição baixos eficazes contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (0,625 g bagaço/100 mL).



Figura 13- CBM dos extratos contra *Pseudomonas aeruginosa*
ATCC 27853

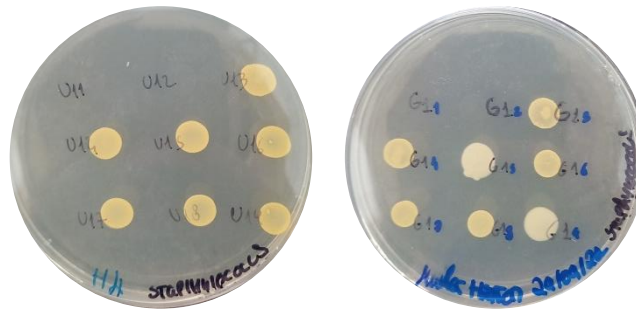


Figura 14- CBM dos extratos contra *Staphylococcus aureus*
ATCC 25923

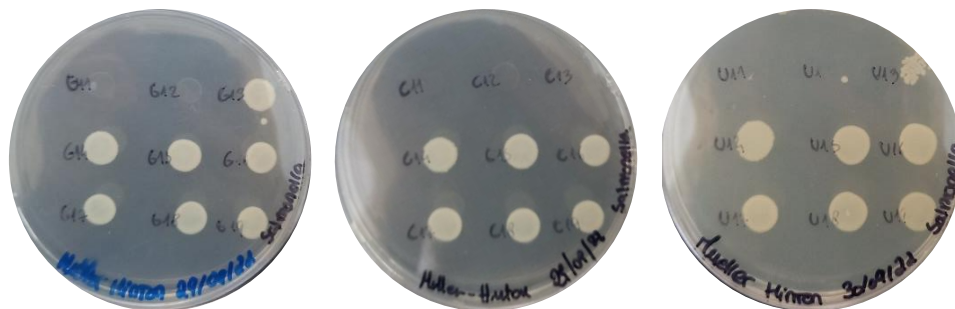


Figura 15- CBM dos extratos contra *Salmonella typhimurium*
CIP 6062

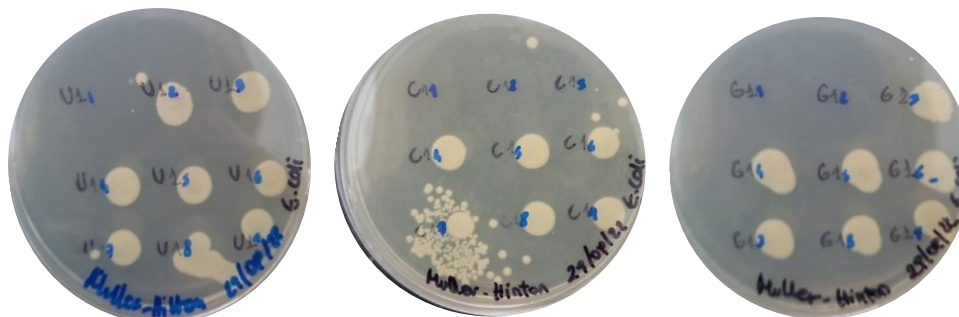


Figura 16- CBM dos extratos contra *Escherichia coli*
ATCC 25922

Legenda: U1: U-ETOH (UCASUL, 100% ETOH, 30°C); G1: G-ETOH (Galega, 100% ETOH, 30°C); C1: C-ETOH (Cobrançosa, 100% ETOH, 30°C).

5. Conclusões

Neste trabalho, foi demonstrado a capacidade de extração do bagaço de azeitona usando solventes de amigos do ambiente, como água e etanol, para obter extratos ricos em compostos bioativos. Os pré-tratamentos com a aplicação de ultrassons demonstraram aumentar a eficiência da recuperação de compostos de valor acrescentado. Os extratos produzidos apresentaram atividade antioxidante e anti-inflamatória, podendo ser de interesse para aplicação nas áreas alimentícia, cosmética e farmacêutica.

As condições de extração que forneceram os melhores resultados em termos de capacidade antioxidante incluíram tratamentos de ultrassons (15min) seguidos de extração com etanol (100%) ou mistura de solventes (água/ etanol 50:50), um tempo de extração de 30 minutos e uma faixa de temperatura de 30-40 °C.

As amostras com maior teor de fenóis e maior atividade antioxidante foram as amostras C-Etw-40 (cultivar Cobrançosa, solvente etanol/águas 50:50) e C-Etw-30 (cultivar Cobrançosa, solvente etanol/águas 50:50), seguidos pela C-EtOH, G-EtW-30, G-etW-40 e os extratos obtidos usando os bagaços provenientes da UCASUL apresentaram os valores mais baixos.

Todos os extratos obtidos possuem propriedades anti-inflamatórias importantes, sendo eficazes na inibição da desnaturação da albumina induzida pelo calor.

Os extratos obtidos com o solvente etanol foram os únicos a apresentar resultados visíveis relativamente à sua capacidade antimicrobiana contra bactérias *E. coli*, *S. aureus* (excepto C-ETOH), *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O extrato C-ETOH apresenta os melhores resultados de Concentração Bactericida Mínima (0,625 g bagaço/100 mL) para as diferentes bactérias analisadas, seguido pelo extrato G-ETOH, e o extrato U-ETOH apresentou a menor Concentração Bactericida Mínima.

6. Perspetivas futuras

Após a realização deste trabalho, seria interessante realizar estudos adicionais usando diferentes combinações de temperatura, tempo de extração, razão líquido-sólido, e outras tecnologias emergentes podem ser úteis para melhorar os resultados da extração.

Será muito importante caracterizar o perfil fenólico das amostras obtidas e tentar relacioná-lo com as suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias.

O estudo de outras propriedades funcionais que são relatadas (pré-biótica, anticancerígena, etc) e a sua correlação com a presença de diversos compostos bioativos presentes no bagaço de azeitona, será do maior interesse para se poder selecionar extratos em função da sua composição e utilização.

O desenvolvimento de novos produtos, de elevado valor acrescentado, a partir do bagaço de azeitona, deve ser explorado como fonte de compostos bioativos a serem utilizados na indústria alimentar (produção de alimentos funcionais), nutracêutica, cosmética e/ou farmacêutica.

Referências Bibliográficas

- Abd El-Hamied W.A.; Girgis A.Y., and Magda H. A. (2019). Effect of extraction systems on the quality of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 4(27), 2167–2176.
- Abdi, H., & Williams, L. J. (2010). Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(4), 433–459.
- Alcazar-Ruiz, A., Garcia-Carpintero, R., Dorado, F., & Sanchez- Silva, L. (2021). Valorization of olive oil industry subproducts: ash and olive pomace fast pyrolysis. *Food and Bioproducts Processing*, 125, 37–45.
- Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2019). Natural antioxidants of plant origin. *Advances in Food and Nutrition Research*.
- Amirante, P., Clodoveo, M. L., Leone, A., Tamborrino, A., & Patel, V. B. (2010). Influence of Different Centrifugal Extraction Systems on Antioxidant Content and Stability of Virgin Olive Oil. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, 85–93.
- Arnan, X., López, B. C., Martínez-Vilalta, J., Estorach, M., & Poyatos, R. (2012). The age of monumental olive trees (*Olea europaea*) in northeastern Spain. *Dendrochronologia*, 30(1), 11–14.
- Babotă, M., Frumuzachi, O., Gâvan, A., Lacoviță, C., Pinela, J., Barros, L., Ferreira, I., Zhang, L., Lucini, L., Rocchetti, G., Tanase, C., Crișan, G., Mocan, A. (2022) Optimized ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Thymus comosus* Heuff. ex Griseb. et Schenk (wild thyme) and their bioactive potential. *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 84,105954.
- Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2017). Optimization of autohydrolysis conditions to extract antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Journal of Food Engineering*, 199, 1–8.
- Bechir Baccouri, Wissem Zarrouk, Dhouha Krichene, Issam Nouairi, Nabil Ben Youssef, Douja Daoud and Mokhtar Zarrouk (2007). Influence of Fruit Ripening and Crop Yield on Chemical Properties of Virgin Olive Oils from Seven Selected Oleasters (*Olea europea* L.). *Journal of Agronomy*, 6: 388-396
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 70–76.

- Beuchat, R., & Golden, A., (1989) Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology* 43, 134–142.
- Bisignano, G., Tomaino, A., Cascio, R. L., Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. (1999). On the In-vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(8), 971–974.
- Boskou, D. (2015). Olive Fruit, Table Olives, and Olive Oil Bioactive Constituents. *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*, 1–30.
- Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M., (2006). Olive Oil Composition. *Laboratory of Food Chemistry and Technology, School of Chemistry*
- Boskou, Dimitrios. (2006). Characteristics of the Olive Tree and Olive Fruit. 13-19.
- Caballero-Guerrero, B., Garrido-Fernández, A., Feroso, F., Rodríguez-Gutierrez, G., Fernández-Prior, M., Reinhard, C., Nyström, N., Benítez-Cabello, A., Arroyo-López, F. (2022). Antimicrobial effects of treated olive mill waste on foodborne pathogens, *LWT*, Volume 164, 113628, 0023-6438.
- Campbell-Johnston, K., Vermeulen, W. J. V., Reike, D., & Bullo, S. (2020). The circular economy and cascading: towards a framework. *Resources, Conservation & Recycling: X*, 100038.
- Cardinali, A., Pati, S., Minervini, F., D'Antuono, I., Linsalata, V., & Lattanzio, V. (2012). Verbascoside, Isoverbascoside, and Their Derivatives Recovered from Olive Mill Wastewater as Possible Food Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(7), 1822–1829.
- Carito, V., Ciafrè, S., Tarani, L., Ceccanti, M., Natella, F., Iannitelli, A., Tirassa, P., Chaldakov, G. N., Ceccanti, M., Boccardo, C., & Fiore, M. (2015). TNF- α and IL-10 modulation induced by polyphenols extracted by olive pomace in a mouse model of paw inflammation. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 51(4), 382–386.
- Carus, M., & Dammer, L. (2018). The Circular Bioeconomy—Concepts, Opportunities, and Limitations. *Industrial Biotechnology*, 14(2), 83–91.
- Carvalho, F., Duarte, L., Gírio, F. (2008). Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research*. Vol. 67: 849-864.
- Cedola, A., Cardinali, A., D'Antuono, I., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2020). Cereal foods fortified with by-products from the olive oil industry. *Food Bioscience*, 33, 100490.

- Cerretani, L., & Bendini, A. (2010). Rapid Assays to Evaluate the Antioxidant Capacity of Phenols in Virgin Olive Oil. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, 625–635.
- Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P., & Bhattacharya, S. (2012). Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), S178–S180.
- Chanioti, S., & Tzia, C. (2018). Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48, 228–239.
- Chibane, L. B., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., & Oulahal, N. (2018). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Choi, M. S., Lee, S. H., Cho, H. S., Cho, H. S., Kim, Y., Yun, Y. P., *et al.* (2007). Inhibitory effect of obovatol on nitric oxide production and activation of NF- κ B/MAP kinases in lipopolysaccharide treated RAW 264.7 cells. *European Journal of Pharmacology*, 556, 181–189.
- Chouaïb, K., Hichri, F., Nguir, A., Daami-Remadi, M., Elie, N., Touboul, D., Hamza, M. A. (2015). Semi-synthesis of new antimicrobial esters from the natural oleanolic and maslinic acids. *Food Chemistry*, 183, 8–17.
- Cicerale, S., Lucas, L., & Keast, R. (2012). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 129–135.
- Conselho Oleícola Internacional (2022). The world of olive oil. Disponível em: <https://www.internationaloliveoil.org/the-world-of-olive-oil/> Acesso em 15/03/2022
- Costa, A. S. G., Alves, R. C., Vinha, A. F., Barreira, S. V. P., Nunes, M. A., Cunha, L. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2014). Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Industrial Crops and Products*, 53, 350–357.
- Dag, A.; Kerem, Z.; Yogev, N.; Zipori, I.; Lavee, S.; Ben-David, E. (2011) Influence of time of harvest and maturity index on olive oil yield and quality. *Scientia Horticulturae*, 127, 358–366.

Decreto-Lei n.º 343/88, de 28 de Setembro, Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, disponível em : <https://dre.pt/dre/detalhe/decreto-lei/343-1988-355502> . Acesso em 3 de Julho de 2022.

Dening, J., “Powerful Anti-Inflammatory Benefits of Olive Oil”. *Olive Oil Times*, 2016. Disponível em: <https://www.oliveoiltimes.com/health-news/powerful-anti-inflammatory-benefits-of-olive-oil/50581> . Acesso a 1/10/22.

Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48(10), 1532–1552.

Di Giovacchino, L., Costantini, N., Serraiocco, A., Surricchio, G., Basti , C. (2001) Natural antioxidants and volatile compounds of virgin olive oils obtained by two or three-phases centrifugal decanters.

Diez, C. M., Trujillo, I., Martínez-Urdiroz, N., Barranco, D., Rallo, L., Marfil, P., & Gaut, B. S. (2014). Olive domestication and diversification in the Mediterranean Basin. *New Phytologist*, 206(1), 436–447.

Difonzo, G., Troilo, M., Squeo, G., Pasqualone, A., & Caponio, F. (2020). Functional Compounds From Olive Pomace to Obtain High-Added Value Foods - A Review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.

Duarte, C.- Extração e Encapsulamento de Compostos Bioativos do Bagaço de Azeitona. Lisboa: Universidade de Lisboa- Instituto Superior de Agronomia, 2011. 113 p. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar.

Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., & Ma, H. (2020). The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 100547.

Egüés, I., Sanchez, C., Mondragon, I., & Labidi, J. (2012). Antioxidant activity of phenolic compounds obtained by autohydrolysis of corn residues. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 164–171.

Elama, C., Tarawa, M., Al-Rimawi, F.(2017). Oleuropein from Olive Leaf Extract as Natural Antioxidant of Frozen Hamburger. *Journal of Food Science and Engineering*, 7 (8).

European Food Safety Authority (EFSA) (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood

HDL-cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), “anti-inflammatory properties” (ID 1882), “contributes to the upper respiratory tract health” (ID 3468), “can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract” (3779), and “contributes to body defences against external agents” (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9(4), 2033.

Ewing-Chow, D., (2020). Fruit And Vegetable Spoilage Is A Hidden Contributor To Underdevelopment. *Forbes*

Fadjare T., Owusu, N. and Badu M. (2021), Optimization of extraction conditions for polyphenols from the stem bark of *Funtumia elastica* (Funtum) utilizing response surface methodology. *AAS Open Res*, 4:46

Ferreira-Dias, S. (2021) Azeite: extração. 96 diapositivos. Apresentação efetuada no âmbito da U.C. Tecnologia de Óleos e Gorduras. Acessível no Instituto Superior de Agronomia, Lisboa

Ferreira-Dias, S. (2021) Experimental Methodology, 68 diapositivos. Apresentação efetuada no âmbito do Mestrado em Viticultura e Enologia. Acessível no Instituto Superior de Agronomia, Lisboa

Frankel, E., Bakhouché, A., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Literature Review on Production Process To Obtain Extra Virgin Olive Oil Enriched in Bioactive Compounds. Potential Use of Byproducts as Alternative Sources of Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(22), 5179–5188.

Freitas, L.; Simões, R.; Miranda, I.; Peres, F.; Ferreira-Dias, S. (2022). Optimization of Autohydrolysis of Olive Pomaces to Obtain Bioactive Oligosaccharides: The Effect of Cultivar and Fruit Ripening. *Catalysts*. 12, 788.

Galanakis, C. M., & Kotsiou, K. (2017). Recovery of bioactive compounds from olive mill waste. *Olive Mill Waste*, 205–229.

García, J. M., Seller, S., & Pérez-Camino, M. C. (1996). Influence of Fruit Ripening on Olive Oil Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11), 3516–3520

García-Inza GP, Castro DN, Hall AJ, Rousseaux MC (2016) Opposite oleic acid responses to temperature in oils from the seed and mesocarp of the olive fruit. *Eur J Agron* 76:138–147

- García-Salinas S., Elizondo-Castillo H., Arruebo M., Mendoza G., Irusta S. (2018) Evaluation of the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Different Components of Natural Origin Present in Essential Oils. *Molecules*, 23, 1399, 1-18
- González-Palma, I., Escalona-Buendía, H. B., Ponce-Alquicira, E., Téllez-Téllez, M., Gupta, V. K., Díaz-Godínez, G., & Soriano-Santos, J. (2016). Evaluation of the Antioxidant Activity of Aqueous and Methanol Extracts of *Pleurotus ostreatus* in Different Growth Stages. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Grabowska, K., Wróbel, D., Żmudzki, P., & Podolak, I. (2018). Anti-inflammatory activity of saponins from roots of *Impatiens parviflora* DC. *Natural Product Research*, 1–5.
- Gullón, B., Eibes, G., Moreira, M. T., Dávila, I., Labidi, J., & Gullón, P. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained from the refining of autohydrolysis liquors of vine shoots. *Industrial Crops and Products*, 107, 105–113.
- Gullón, P., Gullón, B., Astray, G., Carpena, M., Fraga-Corral, M., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Valorization of by-products from olive oil industry and added-value applications for innovative functional foods. *Food Research International*, 137, 109683.
- Guo, L., Gong, S., Wang, Y., Sun, Q., Duo, K., & Fei, P. (2020). Antibacterial activity of olive oil polyphenol extract against *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*: Possible Mechanisms. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(6), 396-403.
- Guo, Z., Jia, X., Zheng, Z., Lu, X., Zheng, Y., Zheng, B., & Xiao, J. (2017). Chemical composition and nutritional function of olive (*Olea europaea* L.): a review. *Phytochemistry Reviews*.
- Ibáñez, E., Palacios, J., Señoráns, F. J., Santa-María, G., Tabera, J., & Reglero, G. (2000). Isolation and separation of tocopherols from olive by-products with supercritical fluids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(2), 187–190.
- Instituto Nacional de Estatística (2022). Produção recorde de azeite na campanha de 2021 contrasta com cenário de seca e de aumento do preço dos meios de produção na agricultura. Disponível em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_destaques&DESTAQUESdest_boui=526212030&DESTAQUESmodo=2 . Acesso em 02/08/2022.
- Jeon, S., & Choi, M. (2018). Anti-inflammatory and anti-aging effects of hydroxytyrosol on human dermal fibroblasts (HDFs). *Biomedical Dermatology*, 2(1).

- Jiang, F., & Dusting, G. J. (2003). Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: Potential role of their antiinflammatory effects. *Current Vascular Pharmacology*, 1, 135–156.
- Jornal Oficial da União Europeia (UE), *Azeite*. Disponível em: <https://europa.eu/more-than-food-uae/discover/olive-oil>. Acesso em 5 de janeiro de 2023.
- Jornal Oficial da União Europeia, Regulamento Delegado (UE) 2022/2104 Da Comissão de 29 de julho de 2022, que complementa o Regulamento (UE) nº 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho no respeitante às normas de comercialização do azeite e que revoga o Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão e o Regulamento de Execução (UE) n.º 29/2012 da Comissão
- Junaid, K., Ejaz, H., Younas, S., Alanazi, A., Yasmeen, H., & Rehman, A. (2022). Detection of *Klebsiella pneumoniae* antibiotic-resistant genes: An impending source of multidrug resistance dissemination through raw food. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(5), 3347-3353.
- Kalidas N.R., Saminathan M., Ismail I.S., Abas F., Maity P., Islam S.S., Manshoor N., Shaari K. (2017) Structural characterization and evaluation of prebiotic activity of oil palm kernel cake mannanoligosaccharides. *Food Chemistry* 234, 348–355.
- Katsinas, N., Rodríguez-Rojo, S., & Enríquez-de-Salamanca, A. (2021). *Olive Pomace Phenolic Compounds and Extracts Can Inhibit Inflammatory- and Oxidative-Related Diseases of Human Ocular Surface Epithelium*. *Antioxidants*, 10(7), 1150.
- Kaur R., Uppal S.K., Sharma P. (2019) Production of Xylooligosaccharides from Sugarcane Bagasse and Evaluation of Their Prebiotic Potency In Vitro. *Waste and Biomass Valorization* 10:2627–2635
- Kiritsakis, A., & Markakis, P. (1988). Olive Oil: A Review. *Advances in Food Research*, 453–482.
- Kostelenos, G., & Kiritsakis, A. (2017). Olive Tree History and Evolution. *Olives and Olive Oil as Functional Foods*, 1–12.
- Kumar, H., Bhardwaj, K., Sharma, R., Nepovimova, E., Kuča, K., Dhanjal, D. S., Verma, R., Bhardwaj, P., Sharma, S., & Kumar, D. (2020). Fruit and Vegetable Peels: Utilization of High Value Horticultural Waste in Novel Industrial Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(12), 2812.
- Lafka, T. I.; Lazou, A. E.; Sinanoglou, V. J.; Lazos, E. S. Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chem.* 2011, 125, 92–98

- Lama-Muñoz, A., Romero-García, J. M., Cara, C., Moya, M., & Castro, E. (2014). Low energy-demanding recovery of antioxidants and sugars from olive stones as preliminary steps in the biorefinery context. *Industrial Crops and Products*, 60, 30–38.
- Madureira, J., Dias, M. I., Pinela, J., Calhela, R. C., Barros, L., Santos-Buelga, C., Verde, S. C. (2020). The use of gamma radiation for extractability improvement of bioactive compounds in olive oil wastes. *Science of The Total Environment*, 138706.
- Madureira, J., Margaça, F. M. A., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R., Cabo Verde, S., & Barros, L. (2021). Applications of bioactive compounds extracted from olive industry wastes: A review. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 21, 453– 476.
- Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Montedoro, G., & Zappia, V. (1999). Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 10(3), 159–165.
- Martínez-Valverde, I., Periago M., Ros G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*.;50(1):5-18
- Medina-Martínez, M. S., Truchado, P., Castro-Ibáñez, I., & Allende, A. (2015). Antimicrobial activity of hydroxytyrosol: a current controversy. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(4), 801–810.
- Miranda, I., Simões, R., Medeiros, B., Nampoothiri, M., Sukumaran, R. K., Rajan, D., Ferreira-Dias, S. (2019). Valorization of lignocellulosic residues from the olive oil industry by production of lignin, glucose and functional sugars. *Bioresource Technology*, 121936.
- Mishra, S. P., Sarkar, U., Taraphder, S., Datta, S., Swain, D., Saikhom, R., & Laishram, M. (2017). Multivariate statistical data analysis-principal component analysis (PCA). *International Journal of Livestock Research*, 7(5), 60-78.
- Mizushima, .Y, Kobayashi, M. (1968). Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 20(3), 169-173.
- Moldão, M., Produtos vegetais fermentados. Projeção visual. (2021). 39 diapositivos. Apresentação efetuada no âmbito da disciplina de Tecnologia de produtos Hortofrutícolas. Acessível no Instituto Superior De Agronomia, Lisboa, Portugal.
- Mondragão-Rodrigues, F., (2021). *Determinação do momento ótimo para a colheita da azeitona*. Disponível em :

<https://www.acos.pt/files/202109131435161764apresentacao-francisco-mondragao-rodrigues.pdf> . Acesso a 23 de junho de 2022.

Mota, D.A., Rajan, D., Heinzl, G.C., Osório, N.M., Gominho, J., Krause, L.C., Soares, C.M.F., Nampoothiri, M., Sukumaran, R.K., Ferreira-Dias, S. (2020), Production of low-calorie structured lipids from spent coffee grounds or olive pomace crude oils catalyzed by immobilized lipase in magnetic nanoparticles, *Bioresource Technology*.

Neves, C. (2020) *Portugal lança movimento Unidos Contra o Desperdício*. Disponível em: <https://www.dn.pt/pais/portugal-lanca-movimento-unidos-contra-o-desperdicio-12770554.html> . Acesso em 26 Nov. 2021

Nunes, M. A., Costa, A. S. G., Bessada, S., Santos, J., Puga, H., Alves, R. C., Oliveira, M. B. P. P. (2018). Olive pomace as a valuable source of bioactive compounds: A study regarding its lipid- and water-soluble components. *Science of The Total Environment*, 644, 229–236.

Nunes, M. A., Palmeira, J. D., Melo, D., Machado, S., Lobo, J. C., Costa, A., Alves, R. C., Ferreira, H., & Oliveira, M. (2021). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of a New Olive Pomace Functional Ingredient. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(9), 913

Nunes, M. A., Palmeira, J. D., Melo, D., Machado, S., Lobo, J. C., Costa, A. S. G., ... & Oliveira, M. B. P. P. (2021). Chemical composition and antimicrobial activity of a new olive pomace functional ingredient. *Pharmaceuticals*, 14(9), 913.

Nunes, M. A., Pimentel, F. B., Costa, A. S. G., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 35, 139–148.

Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K., & Stockmann, R. (2005). Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 823–837.

Organização das Nações Unidas (ONU), *Stop Food Loss and waste, for the people, for the planet*. Disponível em: <https://www.un.org/en/observances/end-food-waste-day> . Acesso em 26 junho de 2022

- Oueslati F.S., Ksouri R., Falleh H., Pichette A., Abdelly C., Legault J. (2012) Phenolic content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Suaeda fruticosa*. *Food Chemistry* 132, 943–947
- Paiva-Martins, F., & Kiritsakis, A. (2017). *Olive fruit and olive oil composition and their functional compounds. Olives and Olive Oil as Functional Foods*, 81–115.
- Palmieri, D., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Ferrari, N., Spinella, G., Pane, B., Palombo, D. (2012). Effects of polyphenol extract from olive pomace on anoxia-induced endothelial dysfunction. *Microvascular Research*, 83(3), 281–289.
- Rajesh A, Doss A, Tresina Ps, & Mohan Vr. (2019). Anti-Inflammatory Activity Of Methanol Extract Of *Nieburhia Apetala* (Roth) Dunn – In Vitro Models. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 278–281.
- Regulamento (UE) nº 1308/2013 Do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de dezembro de 2013 que estabelece uma organização comum dos mercados dos produtos agrícolas e que revoga os Regulamentos (CEE) n.º 922/72, (CEE) n.º 234/79, (CE) n.º 103797/2001, (CE) n.º 1234/2007 do Conselho. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:347:0671:0854:pt:PDF>
Acesso a:
- Ribeiro TB, Oliveira AL, Costa C, Nunes J, Vicente AA, Pintado M. (2020). Total and Sustainable Valorisation of Olive Pomace Using a Fractionation Approach. *Applied Sciences*. 6785.
- Ribeiro, T. B., Oliveira, A., Coelho, M., Veiga, M., Costa, E. M., Silva, S., Pintado, M. (2020). Are olive pomace powders a safe source of bioactives and nutrients? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(5), 1963–1978.
- RTP notícias, *Portugal deve ter "produção recorde" de azeite na campanha de 2021/2022*. https://www.rtp.pt/noticias/economia/portugal-deve-ter-producao-recorde-de-azeite-na-campanha-de-20212022_n1350935 . Acesso em 24 de Junho de 2022.
- Ruiz-Moreno, M. J., Raposo, R., Moreno-Rojas, J. M., Zafrilla, P., Cayuela, J. M., Mulero, J. Cantos-Villar, E. (2015). Efficacy of olive oil mill extract in replacing sulfur dioxide in wine model. *LWT - Food Science and Technology*, 61(1), 117–123.
- Sánchez de Medina, V., Priego-Capote, F., & Luque de Castro, M. D. (2012). Characterization of refined edible oils enriched with phenolic extracts from olive leaves and pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5866- 5873.

- Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., De Sanctis, P., Giovannini, C., D'Archivio, M., & Masella, R. (2017). Anti-inflammatory Activity of Extra Virgin Olive Oil Polyphenols: Which Role in the Prevention and Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases? *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 18(1).
- Santos-Sánchez, F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. In (Ed.), *Antioxidants*. IntechOpen.
- Sarip, H., Sohrab Hossain, M., Azemi M. N., M., and Allaf, K. (2016). A review of the thermal pretreatment of lignocellulosic biomass towards glucose production: Autohydrolysis with DIC technology, *BioRes*. 11(4), 10625-10653.
- Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112(3), 654–658.
- Servili, M., Esposto, S., Taticchi, A., Urbani, S., Di Maio, I., Veneziani, G., & Selvaggini, R. (2015). *New approaches to virgin olive oil quality, technology, and by-products valorization*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(11), 1882–1892.
- Shen, P., Wang, W., Xu, S., Du, Z., Wang, W., Yu, B.-Y., & Zhang, J. (2020). Biotransformation of erythrodiol for new food supplements with anti-inflammatory properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Shimazu, K., Fukumitsu, S., Ishijima, T., Toyoda, T., Nakai, Y., Abe, K., ... Hino, A. (2018). The Anti-Arthritis Effect of Olive-Derived Maslinic Acid in mice is Due to its Promotion of Tissue Formation and its Anti-Inflammatory Effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 1800543.
- Sirichan T., Kijpatanasilp, I., Asadatorn, N., Assatarakul K., (2022) Optimization of ultrasound extraction of functional compound from makiang seed by response surface methodology and antimicrobial activity of optimized extract with its application in orange juice, *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 83,105916.
- Soares, B.,- Pré-Tratamentos Aquosos do Bagaço e Caroço de Azeitona Para Obtenção de Compostos de Valor Acrescentado. Lisboa: Universidade de Lisboa- Instituto Superior de Agronomia, 2019. 59p. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar.
- Sousa, A., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Bento, A., & Pereira, J. A. (2008). Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives “alcaparras.” *LWT - Food Science and Technology*, 41(4), 739–745.

- Tafesh, A., Najami, N., Jadoun, J., Halahlh, F., Riepl, H., & Azaizeh, H. (2011). Synergistic Antibacterial Effects of Polyphenolic Compounds from Olive Mill Wastewater. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1–9.
- Topuz, S., & Bayram, M. (2021). Oleuropein extraction from leaves of three olive varieties (*Olea europaea* L.): Antioxidant and antimicrobial properties of purified oleuropein and oleuropein extracts. *Journal of Food Processing and Preservation*.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity, and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18(01), 98.
- United Nations Environment Programme (2021). *Food Waste Index Report 2021*. Nairobi.
- Uylaşer, V., & Yildiz, G. (2014). The Historical Development and Nutritional Importance of Olive and Olive Oil Constituted an Important Part of the Mediterranean Diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(8), 1092–1101.
- Veneziani, G., Novelli, E., Esposto, S., Taticchi, A., & Servili, M. (2017). Applications of recovered bioactive compounds in food products. *Olive Mill Waste*, 231–253.
- Vlyssides, A. ., Loizides, M., & Karlis, P. (2004). Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products. *Journal of Cleaner Production*, 12(6), 603–611.
- Wahdan, M. & Taha, F. (2018) In Vitro Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Activities of Olive (*Olea europaea* L.) Pomace. *Journal of Agriculture, Chemistry and Biotechnology*. Mansoura Univ. Vol. 9 (3): 77 – 83.
- Wang, Z., Wang, C., Zhang, C., & Li, W. (2017). Ultrasound-assisted enzyme catalyzed hydrolysis of olive waste and recovery of antioxidant phenolic compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 44, 224–234.
- Yahyaoui, A., Rigane, G., Mnif, S., Ben Salem, R. (2014) Recovery of High Yield Flavonoids Rich Extract from Two-Phase Chemlali Olive Pomace, *Journal of Food Studies*, 2166-1073, Vol 3, No.1.
- Zelege, K., Mailer, R., Eberbach, P., & Wünsche, J. (2012). Oil content and fruit quality of nine olive (*Olea europaea* L.) varieties affected by irrigation and harvest times. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 40(4), 241–252.

Zhong, Y., & Shahidi, F. (2015). Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. *Journal of Functional Foods. Handbook of Antioxidants for Food Preservation*, 287–333.

Anexos



Figura 17- Controlos dos extratos e solvente etanol (Atividade antimicrobiana)