



Inês da Assunção Inácio

Licenciada em Saúde Ambiental

**Fortificação de azeite com licopeno
extraído de bagaço de tomate**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e
Segurança Alimentar

Orientador: Professora Maria Margarida Boavida Pontes
Gonçalves



Setembro 2016

Direitos de cópia

Copyright © Inês da Assunção Inácio, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração, direta e indireta, de várias pessoas, às quais gostaria de demonstrar o meu profundo agradecimento e reconhecimento.

A minha orientadora, Professora Doutora Maria Margarida Gonçalves, pelo auxílio e apoio prestado ao longo do desenvolvimento desta dissertação, pelos ensinamentos, boa disposição e preocupação;

À professora Doutora Benilde Mendes, coordenadora do DCTB, pela sua simpatia e auxílio sempre presentes;

À Catarina Bouça pela amizade incondicional, carinho, paciência, por me ajudar a pensar com mais calma (e por tudo o resto que tu sabes) que foi crucial em diversos momentos deste percurso;

À Catarina Nobre pelo auxílio no trabalho laboratorial, paciência e disponibilidade em todos os momentos;

Ao Ricardo Correia por todo auxílio e boa disposição na etapa final da elaboração deste trabalho;

À Catarina Tavares e à Alexandra Pombeiro por todos os bons momentos passados, momentos de estudo e de diversão;

Ao David Silva, à Patrícia Gonçalves e à Ana Seco pelo companheirismo e boa disposição nos momentos mais críticos do trabalho laboratorial;

A todos os colegas do laboratório 367 (Ana Sofia Cruz, Andrei Longo, Octávio Alves, Noelia Romero e Marcelo Valenzuela) pelo companheirismo;

Aos meus tios, José e Maria Teresa, por me terem permitido “estadia” em sua casa durante toda esta aventura;

Ao meu irmão por todas as tropelias, boa disposição e apoio moral;

Ao meu namorado pela paciência infindável, apoio incondicional, compreensão e boa disposição em todos os momentos;

Por fim, às pessoas mais importantes, os meus pais, sem eles não teria sido possível alcançar este patamar, obrigada por me encorajarem em todos os momentos e acreditarem em mim.

O meu sincero agradecimento a todos!

Resumo

O licopeno é um carotenoide responsável pela tonalidade vermelha do tomate, fruto bastante presente na dieta mediterrânea. O consumo de licopeno tem sido recomendado, pelos seus efeitos nutracêuticos, que incluem a sua capacidade de combater o “stress” oxidativo e de reduzir o risco de alguns cânceres e doenças coronárias.

O azeite é o produto de excelência da dieta mediterrânea. Esta gordura vegetal apresenta teores elevados de ácidos gordos monoinsaturados e polifenóis, sendo também considerado um poderoso antioxidante.

Este trabalho teve como objetivo extrair licopeno a partir de tomate e de bagaço de tomate, testando diversas metodologias (tradicionais e não tradicionais), privilegiando a utilização de solventes pouco prejudiciais para o ambiente e para o Homem. Os extratos foram posteriormente incorporados em azeite virgem, fortificando-o.

A extração de carotenoides a refluxo (aquecimento da matriz com solvente), após redução do teor de água do bagaço de tomate por dispersão em acetona numa razão de 1:1, revelou-se, de entre as metodologias testadas, a mais eficaz. Considerou-se a acetona como o melhor solvente de extração, uma vez que o rendimento de extração obtido com este solvente (0,7 g/100 g de tomate) foi superior ao obtido com acetato de etilo (0,07 g/100 g de tomate).

No caso das metodologias tradicionais testadas, foi extração *Soxhlet* que apresentou melhores resultados. De um modo geral, métodos de extração de licopeno a quente mostraram-se mais eficientes do que os métodos de extração a frio.

Os extratos e os azeites, fortificado e não fortificado, foram avaliados quanto ao seu teor de compostos fenólicos totais através da reação de Folin-Ciocalteu, quanto ao seu poder antioxidante de redução férrica, FRAP, e quanto à capacidade de sequestração do radical DPPH. Nos testes de Folin-Ciocalteu e FRAP o azeite fortificado apresentou valores superiores ao azeite sem fortificação, apesar de o mesmo não se ter verificado no teste de sequestração do radical DPPH.

Os subprodutos principais da extração do licopeno a partir de bagaço de tomate são fibra de tomate (2-3 g/100g de tomate) e uma solução aquosa rica em nutrientes (20 – 30 mL/100 g de tomate), ambos produtos com um potencial de valorização alimentar. A solução aquosa apresentou um teor razoável de fósforo total (136,49 mg/L) e de açúcares (5,32 g/100 cm³), sugerindo a sua utilização potencial como substrato de processos fermentativos.

Palavras-chave: Licopeno; Azeite; Fortificação; Extração com solvente; Atividade Antioxidante.

Abstract

Lycopene is a carotenoid responsible for the red color of tomato, a fruit that is very present in the Mediterranean diet. The consumption of lycopene has been recommended for its nutraceutical effects, which include its ability to combat oxidative stress and reduce the risk of some cancers and coronary diseases.

Olive oil is the product of excellence in the Mediterranean diet. This vegetable fat has high levels of monounsaturated fatty acids and polyphenols, and is also considered a powerful antioxidant.

This work aimed to extract lycopene from tomato and tomato bagasse, testing different methodologies (traditional and non-traditional), favoring the use of solvents that are not harmful to the environment and to humans. The extracts were later incorporated in virgin olive oil, fortifying it.

The extraction of carotenoids at reflux (heating of the matrix with solvent), after reduction of the water content of the tomato bagasse by dispersion in acetone in a ratio of 1: 1, proved to be the most effective among the tested methodologies. Acetone was considered the best extraction solvent, since the extraction yield obtained with this solvent (0.7 g / 100 g of tomato) was higher than that obtained with ethyl acetate (0.07 g / 100 g of tomato).

In the case of the traditional methodologies tested, it was Soxhlet extraction that presented better results. In general, hot lycopene extraction methods proved to be more efficient than cold extraction methods.

The lycopene extracts and the fortified and non-fortified olive oil, were evaluated for their total phenolic compounds content through the Folin-Ciocalteu reaction, in terms of their antioxidant ferric reducing power, FRAP, and the sequestering capacity of the DPPH radical. In the tests of Folin-Ciocalteu and FRAP, the fortified olive oil presented higher values than the same oil without fortification, although this was not verified in the DPPH radical sequestration test.

The main by-products of extracting lycopene from tomato bagasse are tomato fiber (2-3 g / 100g tomato) and a nutrient-rich aqueous solution (20-30 mL / 100 g tomato), both products with a potential of food valorization. The nutrient-rich aqueous solution had a reasonable content of total phosphorus (136.49 mg / L) and sugars (5.32 g / 100 cm³), suggesting its potential use as a substrate of fermentative processes.

Keywords: Lycopene; Olive oil; Fortification; Solvent extraction; Antioxidant capacity

Índice geral

Direitos de cópia.....	iii
Agradecimentos.....	v
Resumo	vii
Abstract.....	ix
Índice geral	xi
Índice de figuras	xv
Índice de tabelas	xvii
Lista de Abreviaturas.....	xix
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 Azeite: composição geral e processo de produção.....	1
1.2 Sistemas de extração de azeite.....	4
1.2.1 Sistema de extração descontínuo ou tradicional: por pressão	6
1.2.2 Sistema de extração de três fases.....	7
1.2.3 Sistema de extração de duas fases	8
1.3 Estatísticas de produção de azeite na Europa e no Mundo	9
1.4 Legislação relativa à produção de azeite	11
1.4.1 Decreto-Lei nº 76/2010, de 24 de junho de 2010.	11
1.4.2 Regulamento de Execução (EU) nº 1348/2013, da Comissão de 16 de dezembro de 2013.....	12
1.4.3 Regulamento (UE) nº 652/2014 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de maio de 2014	12
1.4.4 Regulamento (CE) nº 510/2006, de 20 de março de 2006.....	13
1.4.5 Decreto-Lei nº 113/2006, de 13 de junho de 2006	13
1.4.6 Decreto-Lei nº 560/99, de 18 de dezembro de 1999	13
1.5 Propriedades nutricionais e nutracêuticas do azeite	14
1.6 Composição química detalhada do azeite.....	15
1.6.1 Perfil de ácidos gordos.....	15
1.6.2 Perfil de componentes antioxidantes	16
1.7 Azeites Aromatizados	17
1.7.1 Utilização de carotenoides como aditivos de azeite	17

1.7.2 Utilização de licopeno como aromatizante do azeite	19
1.7.3 Capacidade antioxidante do licopeno e mecanismo de ação.....	20
1.7.4 Efeitos preventivos do licopeno	22
1.8 Solventes permitidos na indústria alimentar	22
1.9 Processos de extração de licopeno – Revisão Bibliográfica	23
1.10 Objetivos e estrutura da dissertação	24
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	25
2.1 Preparação do extrato bruto de tomate - Valorização de frações de tomate.....	25
2.1.1 Preparação do bagaço de tomate.....	25
2.1.2 Método A – Transferência de licopeno para o azeite por emulsificação	25
2.1.3 Método B – Extração de licopeno a partir de tomate inteiro (Processo tradicional)...	26
2.1.4 Método C - Extração de licopeno a partir de bagaço de tomate	27
2.2 Metodologias Analíticas	29
2.2.1 Determinações aplicadas aos extratos preparados.....	29
2.2.2 Determinações aplicadas ao produto final e aos extratos de licopeno.....	30
2.2.3 Determinações aplicadas aos subprodutos resultantes da preparação do extrato de licopeno	33
Capítulo 3 - Resultados e Discussão	36
3.1 Transferência de licopeno de bagaço de tomate para azeite por emulsificação (Método A)	38
3.2 Extração de Licopeno a partir de tomate inteiro (Método artesanal)	39
3.3 Extração de Licopeno a partir de bagaço de tomate (Método industrial).....	44
3.4 Caracterização funcional dos extratos de licopeno	50
3.4.1 Atividade antioxidante	50
3.5 Fortificação do azeite com licopeno e caracterização funcional do azeite fortificado.....	50
3.5.1 Concentração de licopeno	51
3.5.2 Análise de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu	51
3.5.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP	52
3.5.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH.....	53
3.6 Valorização dos sub-produtos	54
3.6.1 Caracterização das soluções aquosas (água de vegetação) resultantes do tratamento do bagaço de tomate.....	54

3.6.2 Rendimento de fibra de tomate.....	55
3.6.3 Humidade do bagaço de tomate.....	55
Capítulo 4 – Conclusão e desenvolvimentos futuros.....	56
Referências Bibliográficas.....	57
Fontes Eletrónicas.....	66
Anexos.....	67

Índice de figuras

Capítulo 1

Figura 1.1- Esquema do processo de obtenção de azeite: através do sistema tradicional (a), sistema de 3 fases (b) e sistema de 2 fases (c) (Adaptado de Petrakis 2006; Clodoveo et al. 2014; Lozano 1996).....	4
Figura 1.2 - Colheita de azeitona realizada com recurso a varas e colheita de azeitona realizada mecanicamente (da esquerda para a direita) (García-González & Aparicio, 2011; Vidal & Vidal, 2011).....	5
Figura 1.3 - Limpeza (figura da esquerda) e lavagem (figura da direita) da azeitona (Olives 2000, 2016).....	6
Figura 1.4 - Evolução da produção mundial de azeite entre 2000 e 2015 (*dados provisórios) (Adaptado de COI, 2015 ⁽²⁾).....	9
Figura 1.5 - Evolução da produção de azeite na Europa entre 2000 e 2015 (*dados provisórios) (Adaptado de COI, 2015 ⁽³⁾).....	10
Figura 1.6 - Principais países produtores mundiais de azeite, entre 2000 e 2013 (Adaptado de FAOSTAT, 2015).....	11
Figura 1.7 - Estruturas químicas dos carotenoides mais abundantes no plasma humano (Arcscott & Tanumihardjo, 2010).	18
Figura 1.8 - Estrutura química do β -caroteno e identificação do anel β -ionona (Arcscott & Tanumihardjo, 2010).	19
Figura 1.9 - Formas isoméricas trans e cis do licopeno (Agarwal & Rao, 2000).	20

Capítulo 2

Figura 2.1 – Tomate triturado preparado para filtração inicial, por pano-cru.....	26
Figura 2.2 - Produtos (filtrado e resíduo de tomate) resultantes da segunda dispersão em acetona do resíduo de tomate em acetona.....	27
Figura 2.3 – Exemplo de extração Soxhlet de bagaço de tomate após vários ciclos de extração.	28
Figura 2.4 – Balão de vidro após extração a refluxo, contendo bagaço de tomate e solução bruta de licopeno.	29
Figura 2.5- Redução férrica do reagente FRAP pelos compostos antioxidantes (Huang et al.,2005)	31

Capítulo 3

Figura 3.1 - Amostra de azeite enriquecido diretamente com bagaço de tomate.	39
Figura 3.2 - Esquema ilustrativo das operações unitárias realizadas para o método B1.	41
Figura 3.3 – Esquema ilustrativo das operações unitárias realizadas para o método B2.	42
Figura 3.4- Esquema ilustrativo das operações unitárias realizadas para o método C1.....	44
Figura 3.5- Esquema ilustrativo das operações unitárias realizadas para o método C2.....	45
Figura 3.6 - Esquema ilustrativo das operações unitárias realizadas para o método C3.....	46
Figura 3.7 - Resultados obtidos para o teste de Folin-Ciocalteu do azeite sem fortificação e do azeite fortificado com extrato de licopeno.	51

Figura 3.8 - Resultados obtidos para o teste FRAP do azeite sem fortificação e do azeite fortificado com extrato de licopeno. 52

Figura 3.9 – Resultados obtidos para o teste DPPH do azeite sem fortificação e do azeite fortificado com extrato de licopeno. 53

Anexos

Figura A1.1 – Reta de calibração utilizada para o teste FRAP dos extratos de licopeno. 67

Figura A1.2 – Reta de calibração utilizada para o teste DPPH dos extratos de licopeno 67

Figura A1.3 - Reta de calibração utilizada para o teste Folin do azeite sem fortificação e do azeite fortificado com extrato de licopeno..... 68

Figura A1.4- Reta de calibração utilizada para o teste FRAP do azeite sem fortificação e do azeite fortificado com extrato de licopeno..... 68

Figura A1 5- Reta de calibração utilizada para o teste DPPH do azeite sem fortificação e do azeite fortificado com extrato de licopeno..... 69

Índice de tabelas

Capítulo 1

Tabela 1.1 - Valores de máximos permitidos de acidez livre, expressa em ácido oleico, para cada tipo de azeite (Adaptado de Regulamento (CE) nº1989/2003 de 6 de novembro de 2003)..... 1

Tabela 1.2 - Principais constituintes do azeite (macronutrientes, ácidos gordos e vitaminas) e respetivas quantidades presentes no alimento, por fração edível (Adaptado da Tabela de Composição de Alimentos do INSA 2015). 2

Tabela 1.3 - Composição (limites) em ácidos gordos do azeite virgem, determinados através de cromatografia gasosa (% total de ácidos gordos) (COI, 2003 in Boskou,2006; Codex Alimentarius, 2013)..... 3

Tabela 1.4 - Composição em ácidos gordos dos azeites virgem, determinada através de cromatografia gasosa % total de ácidos gordos) (Adaptado de Codex Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils, 2013)..... 16

Tabela 1.5 – Características gerais dos solventes orgânicos acetona e acetato de etilo (Smallwood, 1996)..... 23

Capítulo 3

Tabela 3.1 – Identificação dos métodos desenvolvidos e principais características..... 37

Tabela 3.2 – Produtos obtidos a partir de 100 g de tomate pelo método B1..... 41

Tabela 3.3 – Produtos obtidos a partir de 100 g de tomate, com o método B2..... 43

Tabela 3.4 - Produtos obtidos a partir de 100 g de tomate, com o método C1. 44

Tabela 3.5 - Produtos obtidos a partir de 100 g de tomate, com o método C2. 46

Tabela 3.6 - Produtos obtidos a partir de 100 g de tomate, com o método C3. 47

Tabela 3.7 – Resultados de rendimentos de extração de licopeno obtidos para as diferentes frações de tomate, em peso húmido e em pesos sem acetona, e respetivas concentrações de licopeno, considerando os métodos de extração de testados..... 48

Tabela 3.8 – Resultados de rendimentos de licopeno obtidos para as diferentes frações de licopeno, em peso húmido e em peso sem acetona, e respetivo rendimento de fibra de tomate em peso húmido e peso seco, considerando os métodos de extração testados 49

Tabela 3.9 – Resultados obtidos para os testes de atividade antioxidante (FRAP e DPPH) aplicados aos extratos de licopeno..... 50

Tabela 3.10 – Resultados obtidos para humidade, açúcares totais, fósforo total e azoto total do filtrado. 55

Tabela 3.11 – Resultados obtidos para os rendimentos de fibra de tomate..... 55

Tabela 3.12 – Resultados obtidos para os teores de humidade presentes no bagaço de tomate com e sem tratamento com acetona. 55

Lista de Abreviaturas

COI – Concelho Oleícola Internacional

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPPH • - Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila;

EAG – Equivalentes de ácido gálico;

ESF – Equivalentes de sulfato ferroso;

ET – Equivalentes de Trolox;

FRAP – Poder de redução férrica;

GC-MS – Cromatografia gasosa com espetrometria de massas;

GC-FID – Cromatografia gasosa com detetor de ionização de chamas;

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência;

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade;

MUFA – Ácidos gordos monoinsaturados;

PUFA – Ácidos gordos polinsaturados;

RNS – Espécies reativas de azoto;

ROS – Espécies reativas de oxigénio;

SFA – Ácidos gordos saturados;

SPE – Extração em fase sólida.

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Azeite: composição geral e processo de produção

O azeite é o óleo obtido exclusivamente a partir do fruto da oliveira (*Olea europaea L.*), que não tenha sofrido outros tratamentos além da lavagem, decantação, centrifugação e filtração, com exclusão dos óleos obtidos com recurso a solventes ou por processos de reesterificação, bem como de qualquer mistura com óleos de outra natureza (Regulamento (CE) nº1989/2003 do Conselho de 6 de novembro de 2003; ⁽¹⁾COI, 2015).

O azeite é constituído principalmente por triglicéridos e secundariamente por ácidos gordos livres e alguns constituintes não glicéridos (0,5-1,5%) (Simopoulos *et al.*, 2000). O azeite extra virgem tem uma acidez máxima permitida, em termos de ácido oleico, de 0,8g/100g. Noutros tipos de azeite (azeite virgem, azeite lampante, azeite refinado e azeite), a acidez livre pode variar entre 0,3g/100g e 1g/100g (tabela 1.1). Para além das características previstas para cada categoria, a acidez livre expressa em ácido oleico representa o principal fator diferenciador das várias categorias de azeite (Regulamento (CE) nº1989/2003 do Conselho de 6 de novembro de 2003).

Tabela 1.1 - Valores de máximos permitidos de acidez livre, expressa em ácido oleico, para cada tipo de azeite (Adaptado de Regulamento (CE) nº1989/2003 de 6 de novembro de 2003).

Designação	Acidez Livre (expressa em ácido oleico)
Azeite virgem extra	≤ 0,8g/100g
Azeite Virgem	Azeite virgem ≤ 2g/100g
	Azeite lampante > 2g/100g*
Azeite Refinado	≤ 0,3g/100g
Azeite – composto por azeite refinado e azeite virgem	≤ 1g/100g
Óleo de Bagaço de Azeitona Bruto	**
Óleo de Bagaço de Azeitona Refinado	≤ 0,3g/100g
Óleo de Bagaço de Azeitona	≤ 1g/100g

*e/ou estando as outras características conformes as previstas para esta categoria.

** Óleo obtido de bagaço de azeitona por tratamento com solventes ou por processos físicos, ou óleo correspondente, com exceção de certas características específicas, a um azeite lampante, com exclusão dos óleos obtidos por processos de reesterificação e qualquer mistura com óleos de outra natureza.

Os principais constituintes do azeite podem dividir-se em duas frações: a fração saponificável (maioritária) e fração insaponificável (minoritária). A fração saponificável representa 98%-99% da composição total do azeite e a fração insaponificável representa apenas 1%-2%, embora a sua contribuição seja extremamente importante do ponto de vista biológico. A fração saponificável é constituída principalmente por triglicéridos e, em menores quantidades por ácidos gordos livres e outros

compostos glicéricos. A fração insaponificável engloba compostos fenólicos (polifenóis e tocoferóis), esqualeno, esteróis, pigmentos (clorofilas e carotenoides) e metais (Gomez-Gonzalez *et al.*, 2011; Velasco & Dobarganes, 2002; Boskou, 2006; El Riachy *et al.*, 2011) .

Existem diferentes cultivares de *Olea europaea*, cada um com características físicas e bioquímicas específicas, fornecendo azeite com composições típicas. Para além disso, durante o amadurecimento da azeitona ocorrem processos metabólicos que irão traduzir-se em variações no perfil de alguns componentes, como polifenóis, tocoferóis, pigmentos, bem como ácidos gordos e esteróis (Matos *et al.*, 2007). A concentração dos diferentes componentes do azeite é influenciada fortemente pelo cultivar, tipo de solo, clima, irrigação do terreno, grau de maturação da azeitona e processo de extração (García-González *et al.*, 2008; Morelló *et al.*, 2004).

A fração lipídica representa cerca de 99,9% da composição total do azeite. Os ácidos gordos, constituintes dos triglicéridos, mais abundantes no azeite são os monoinsaturados (MUFA), precedidos dos ácidos gordos saturados (SFA) e dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) (tabela 1.2) (INSA, 2015). As características e o valor nutricional do azeite são fortemente influenciadas pelas diferentes proporções de ácidos gordos presentes (Mailer, 2006).

A composição do azeite em ácidos gordos pode variar de acordo com a zona de produção (Diraman & Dibeklioglu, 2014), latitude, clima, variedade e estágio de maturação da fruta (Gomez-Gonzalez *et al.*, 2011; Boskou, 2006). Os cultivares de azeitona de maior importância utilizados em Portugal são a Galega, a Carrasquenha, a Cordovil, a Cobrançosa e a Verdeal (Casa do Azeite, 2016).

A vitamina E presente no azeite é composta maioritariamente por tocoferol, sendo o α -tocoferol (tabela 1.2) o constituinte que detém a maior fração. Os níveis desta vitamina no azeite podem variar de acordo com o cultivar e com fatores tecnológicos (Boskou *et al.*, 2006; Servili *et al.*, 2009).

Tabela 1.2 - Principais constituintes do azeite (macronutrientes, ácidos gordos e vitaminas) e respetivas quantidades presentes no alimento, por fração edível (Adaptado da Tabela de Composição de Alimentos do INSA 2015).

Composição do azeite		Por 100g
Macronutrientes	Gordura total (g)	99,9
	Proteína (g)	0,1
	Ácidos gordos saturados (g)	14,4
	Ácidos gordos monoinsaturados (g)	78,6
Ácidos gordos	Ácidos gordos polinsaturados (g)	6,9
	Ácido linoleico (g)	6,2
	Vitaminas	α -tocoferol (mg)

Por forma a garantir a qualidade do produto, o *Codex Alimentarius*, na sua edição mais recente e o COI estabeleceram limites (tabela 1.3) para a composição do azeite em ácidos gordos.

Tabela 1.3 - Composição (limites) em ácidos gordos do azeite virgem, determinados através de cromatografia gasosa (% total de ácidos gordos) (COI, 2003 in Boskou,2006; Codex Alimentarius, 2013).

Ácido Gordo		Codex (2013)	IOOC (2003)
C 12:0	Láurico	Não especificado	Não especificado
C 14:0	Mistérico	0,0-0,05	<0,05
C 16:0	Palmítico	7,5-20,0	7,5-20,0
C 16:1	Palmitoleico	0,3-3,5	0,3-3,5
C 17:0	Heptadecanóico	0,0-0,3	≤0,3
C 17:1	Heptadecenóico	0,0-0,3	≤0,3
C 18:0	Esteárico	0,5-5,0	0,5-5,0
C 18:1	Oleico	55,0-83,0	55,0-83,0
C 18:2	Linoleico	3,5-21,0	3,5-21,0
C 18:3	Linolénico	*	≤1,0
C 20:0	Araquídico	0,0-0,6	≤0,6
C 20:1	Eicosanóico	0,0-0,4	≤0,4
C 22:0	Beénico	0,0-0,2	≤0,2
C 22:1	Erúcido	Não especificado	Não especificado
C 24:0	Lignocérico	0,0-0,2	≤0,2

* Dependente dos resultados do Conselho Oleícola Internacional, os limites internacionais podem permanecer inalterados.

A fração lipídica do azeite apresenta elevada concentração de MUFAs, nomeadamente, ácido oleico (tabela 1.3). Encontram-se presentes no azeite, em quantidades relevantes outros ácidos gordos, como o ácido palmítico, um SFA e o ácido linoleico, um PUFA (Kiritsakis & Christie, 2000). Os MUFAs são extremamente importantes devido ao elevado valor nutricional e contribuição para a estabilidade oxidativa do azeite. Uma maior percentagem de MUFAs em detrimento de PUFAs, faz diminuir o risco de arteriosclerose (Moreno & Mitjavila 2003; El Riachyet al. 2011). Contudo, Mailer (2006) refere que os PUFAs também merecem destaque pois apresentam inúmeros benefícios para a saúde.

A azeitona é considerada uma fruta “amiga do ambiente”, pois não são necessárias doses elevadas de produtos químicos para promover o seu crescimento e é requerida pouca energia para o seu processamento. Seria então expectável, que a produção de azeite também fosse ambientalmente sustentável. Contudo, a geração de elevadas quantidades de resíduos altamente poluentes durante o processo produtivo é inevitável. Atualmente, o setor oleícola exige melhorias ambientais e no perfil de qualidade em toda a cadeia de produção (Azbar *et al.*, 2004).

1.2 Sistemas de extração de azeite

A primeira produção de azeite remonta à época da Pré-história, tendo sido produzido com instrumentos rudimentares da época (Rosón & Sánchez, 2010). Ao longo dos séculos desenvolveram-se melhorias nos processos e equipamentos para extração de azeite, impulsionadas pelo desenvolvimento tecnológico (García-González *et al.*, 2008). Atualmente, os lagares podem ser do tipo descontínuo ou de prensas; contínuo de 3 fases ou contínuo de 2 fases (ecológico).

Embora o processo de extração de azeite seja aparentemente simples, são necessários cuidados específicos em todas as etapas (Lozano, 1996). O principal objetivo de qualquer método é extrair a maior quantidade de azeite possível sem alterar a qualidade original. Para que a qualidade se mantenha é importante a exclusiva utilização de processos mecânicos, que evitam reações químicas e enzimáticas (Petракis, 2006).

As etapas iniciais do processo de obtenção de azeite são comuns a todos os tipos de lagar: limpeza e lavagem e lavagem, moenda e termobatedura (figura 1.1).

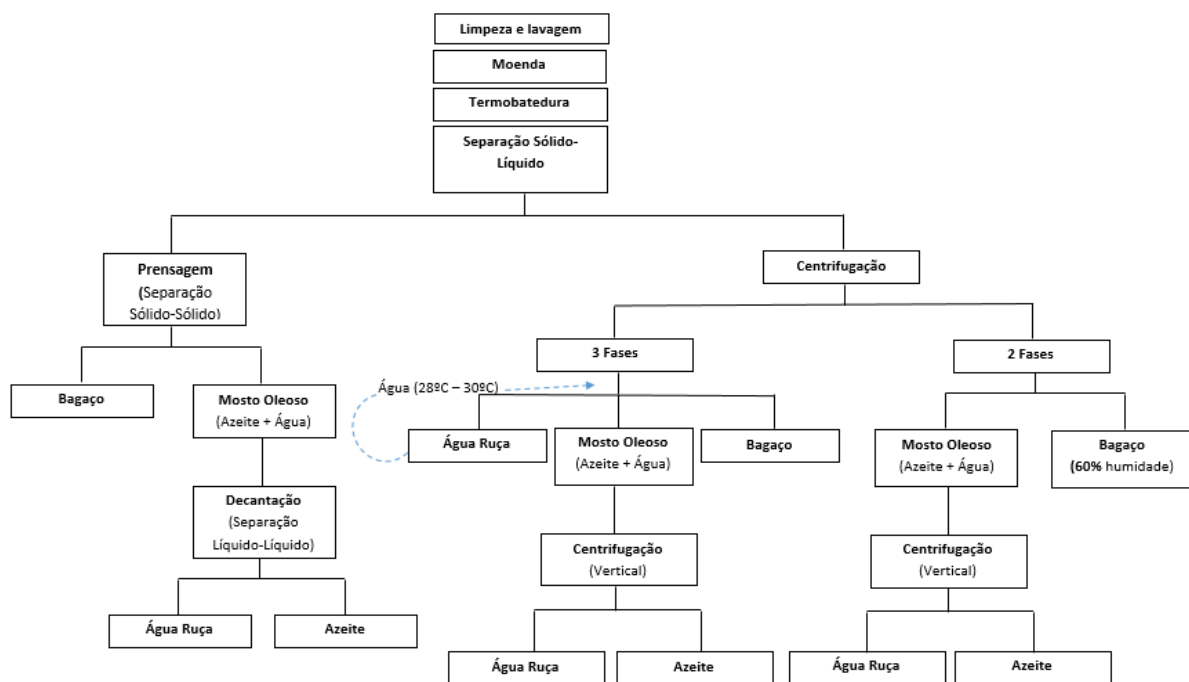


Figura 1.1- Esquema do processo de obtenção de azeite: através do sistema tradicional (a), sistema de 3 fases (b) e sistema de 2 fases (c) (Adaptado de Petrakis 2006; Clodoveo et al. 2014; Lozano 1996).

A fase que antecede a produção do azeite, a colheita da azeitona, acontece ainda fora do lagar. Esta é uma operação importante que contribui significativamente para a qualidade do azeite virgem, uma vez que a qualidade sensorial depende, entre outras, variáveis do grau de maturação e das condições sanitárias da azeitona (Harwood & Aparicio, 2000).

A colheita da azeitona pode realizar-se à mão ou com recurso a varas (figura 1.2), em que os frutos caem sobre panos colocados estrategicamente junto das árvores; ou com recurso a equipamento mecânico, mais moderno, que executa a colheita através da vibração da árvore. Neste último, o equipamento é adaptável às características da árvore e do terreno (Probeira, n.d.; Mirandela n.d.) O tipo de método usado para colheita da azeitona depende, entre outras variáveis, das técnicas culturais utilizadas, tamanho das árvores e do terreno (Petrakis, 2006).



Figura 1.2 - Colheita de azeitona realizada com recurso a varas e colheita de azeitona realizada mecanicamente (da esquerda para a direita) (García-González & Aparicio, 2011; Vidal & Vidal, 2011).

Após a colheita, a azeitona é transportada para o lagar. O transporte deve ser realizado com recurso a equipamentos que permitam a circulação de ar, por forma a evitar um aumento prejudicial da temperatura e fermentações indesejadas nas camadas inferiores de azeitona (García-González & Aparicio, 2011; Probeira, n.d.).

Com a entrada da azeitona no lagar iniciam-se as operações preliminares, que compreendem a amostragem, limpeza, lavagem, pesagem e armazenamento (se necessário) da matéria-prima. As características das azeitonas quando chegam ao lagar não são uniformes: podem ser provenientes de diferentes cultivares, apresentar estados de maturação distintos e, por vezes encontram-se em diferentes condições sanitárias (agentes patogénicos). Por isso, é necessário proceder à amostragem do fruto e posterior classificação em lotes de acordo com parâmetros de qualidade pré-estabelecidos. A classificação do fruto em categorias permite que seja laborado de acordo com a sua qualidade.

As operações de limpeza e lavagem da azeitona (figura 1.3) consistem na remoção de folhas, ramos e impurezas, que podem advir da colheita. Para isso, as azeitonas passam sobre uma peneira vibratória com um ventilador que remove folhas, ramos e impurezas. Retiradas as folhas é altura da lavagem da azeitona, a qual é feita através de uma corrente de água; é injetado um fluxo de ar para gerar agitação e assim melhorar a eficiência da lavagem.



Figura 1.3 - Limpeza (figura da esquerda) e lavagem (figura da direita) da azeitona (Olives 2000, 2016).

Contudo, a humidade elevada pode provocar a diminuição da eficiência da extração porque há formação de emulsões água/óleo. As operações referidas são extremamente importantes, porque quaisquer folhas ou detritos podem não só danificar o equipamento mecânico, como também causar alterações nos atributos sensoriais (*off-flavours*) do azeite extraído (Rosón & Sánchez, 2010; Petrakis, 2006; Civantos, 1999 in Vossen, 2007; Hermoso Fernández, 1998 in Vossen, 2007; García-González & Aparicio, 2011; Prolagar, 2011).

Numa fase inicial do processo, chamada moenda da azeitona, o fruto é esmagado e reduzido a uma pasta. Esta operação tem como finalidade quebrar as células da azeitona permitindo a libertação das gotas de azeite que se encontram na membrana. Atualmente, a moenda da azeitona é efetuada principalmente por moinhos de martelos metálicos mas, são ainda utilizados (em menores proporções) moinhos antigos de pedra com mós ou galgas (Vossen 2007; Probeira, n.d).

A pasta resultante da moenda da azeitona passa para termobatedeiras onde será batida lenta e continuamente, a temperatura controlada. A termobatedura permite reverter as emulsões de água/azeite formadas durante a moenda. Este processo favorece o aumento do tamanho das gotículas de azeite, bem como da porção de azeite livre (Clodoveo *et al.*, 2014; Petrakis, 2006). A agregação das gotículas de azeite permite que o azeite se separe mais facilmente do bagaço e da água ruça.

O processo de separação da fase sólida da fase líquida pode ser realizado por meio de prensagem - sistemas descontínuos ou tradicionais - ou centrifugação - sistemas contínuos, ambos com geração de subprodutos. Os subprodutos provenientes da atividade oleica são bagaço de azeitona (resíduo sólido) e águas ruças (resíduo líquido). São ambos resíduos de cor escura e contêm elevada carga orgânica e são composto por substâncias por substâncias complexas de difícil degradação (Azbar *et al.*, 2004).

1.2.1 Sistema de extração descontínuo ou tradicional: por pressão

O sistema de extração por pressão é considerado o processo de obtenção de azeite mais antigo. A pasta de azeitona resultante da termobatedura é colocada em discos de material filtrante (capachos),

que são empilhados e, em seguida, colocados na prensa (Lozano, 1996; Ben-Hassine *et al.*, 2013). Quando sujeita a pressão, a fase líquida é obrigada a drenar através dos capachos, separando-se da fase sólida. A pressão aplicada nos discos leva à compactação da fase sólida permitindo a percolação das fases líquidas (azeite e água). Finalmente, separação líquido-líquido (azeite - água ruça) faz-se através de decantação ou centrifugação vertical, ou através da combinação de ambos os sistemas (Petrakis, 2006; Demicheli & Bontoux, 1996; Olive Oil Emporium, n.d.).

O método de extração tradicional não prevê a adição de água, contudo esta pode ser adicionada em pequenas quantidades durante a moenda ou batadura quando a azeitona é difícil de processar; ou quando o azeite não se separa facilmente das outras fases; ou após a prensagem para lavagem da pilha dos capachos. Desta forma, a água é também transferida para o mosto oleoso (Petrakis, 2006; Di Giovacchino *et al.*, 1994).

O sistema de obtenção de azeite por prensagem garante um azeite de qualidade superior, uma vez que o tempo de batadura é reduzido e a temperatura é baixa durante todo o processo. Para garantir um elevado nível de qualidade, os discos (capachos) devam ser devidamente higienizados após cada extração, caso contrário irão desenvolver-se fermentações e *flavours* indesejados (defeitos), que irão contaminar o azeite. Atualmente os capachos são feitos de fibras sintéticas porque este material permite uma higienização e manutenção mais fáceis, ao contrário de outros materiais (Ben-Hassine *et al.*, 2013; Petrakis, 2006; Olive Oil Emporium, n.d.)

1.2.2 Sistema de extração de três fases

Após a termobatedura, a pasta resultante é introduzida num decantador horizontal para possibilitar a separação dos diversos constituintes da pasta. O sistema de extração se de "três fases", tal como a denominação indica, obtêm-se três fluxos de matéria: bagaço de azeitona (resíduos de caroço e polpa), mistura de água de vegetação com água adicionada (água ruça) e mosto oleoso (azeite e água) (Petrakis, 2006). A utilização deste tipo de sistema permite a extração do azeite de forma contínua, ao contrário do sistema descrito anteriormente (prensas) (Di Giovacchino, 2000 *citado in* Harwood & Aparicio, 2000).

Os *decanters* são constituídos por um tambor cilíndrico com lâminas helicoidais que giram a elevada velocidade (3500-3600 rpm). A centrifugação baseia-se na força centrífuga aplicada na pasta de azeitona diluída em água morna. A diluição permite aumentar a diferença entre os pesos específicos (sólidos > água ruça > azeite) dos líquidos imiscíveis (azeite e água) e a matéria sólida, e a sua separação por ação da gravidade. A quantidade de água adicionada deve ser ajustada às características reológicas da azeitona e à *cultivar*, uma vez que o excesso ou falta levam à diminuição do rendimento de extração do azeite. De acordo com Lozano (1996), a proporção de pasta de azeitona/água que permite uma melhor extração deve ser 1:0,6 – 1:1 (Petrakis, 2006; Di Giovacchino *et al.*, 2002; Lozano, 1996; García-González & Aparicio, 2011; Ben-Hassine *et al.*, 2013)

O mosto oleoso obtido na etapa anterior passa por uma última fase, a clarificação, que ocorre numa centrífuga vertical, a qual separa o azeite de alguma água e resíduos remanescentes (García-González & Aparicio, 2011; Clodoveo & Hbaieb, 2013).

As principais desvantagens desse método incluem a produção de quantidades elevadas de água ruça, aproximadamente 60-80L para 100kg (Di Giovacchino *et al.*, 1994) de azeitona, quantidade superior à produzida nos lagares tradicionais (prensas); perda de componentes antioxidantes naturais para a fase aquosa e, conseqüentemente dificuldade de deposição de águas ruças, que têm um impacto ambiental negativo devido à elevada resistência à biodegradação. A adição de água à pasta de azeitona altera o equilíbrio de partição entre as fases líquidas (água e azeite) e causa a diminuição da concentração de compostos fenólicos, através da sua diluição na fase aquosa (Di Giovacchino, 2000 *citado in* Harwood & Aparicio, 2000).

Para reduzir a quantidade de águas residuais provenientes da atividade oleica sugere-se a reciclagem da água ruça, diminuindo a quantidade água adicionada durante o processo (Amirante *et al.*, 1992 *in* Harwood & Aparicio, 2000; García-González & Aparicio, 2011).

1.2.3 Sistema de extração de duas fases

Os sistemas de extração de três fases foram introduzidos no mercado no início de 1990. Este é, aparentemente, aquele que apresenta mais vantagens, contudo as desvantagens referidas acima são consideradas importantes (redução de conteúdo antioxidante do azeite e elevado volume de água ruça) (Vossen, 2007; Di Giovacchino, 2000). Por isso, foi desenvolvido um sistema de duas fases, também denominado de lagar ecológico (Demicheli & Bontoux, 1996).

Tal como no sistema de três fases, no de duas fases também são utilizadas centrífugas que giram sobre um eixo horizontal. Mas neste caso, o equipamento separa o azeite do bagaço e da água ruça, que saem juntos. É em tudo semelhante ao sistema de extração de três fases, com rendimentos de produção semelhantes, mas o azeite produzido tem uma qualidade superior em termos de teor de polifenóis e difenóis, com capacidade de manutenção destes níveis (Petrakis, 2006).

O sistema de duas fases não prevê a adição de água a pasta de azeitona, contudo se esta se apresentar demasiado seca podem ser adicionados 5-10L de água por 100kg de azeitona. O bagaço obtido tem 60-70% de humidade, o que permite a retenção de compostos fenólicos no azeite (pouca diluição da pasta) (Di Giovacchino, 2000)

A tecnologia utilizada no sistema de duas fases tem especial relevância porque a quantidade de efluente líquido gerada é muito reduzida. A principal desvantagem deste sistema é a produção de um efluente sólido (bagaço) com elevada humidade e de difícil deposição. O resíduo sólido apresenta elevada concentração de açúcares, pectinas, resina, sal, bem como ácidos, polifenóis e iões metálicos pesados, que representam compostos potencialmente relevantes para recuperação posterior (Petrakis, 2006; Demicheli & Bontoux, 1996).

As principais diferenças nos sistemas de extração centram-se na força física aplicada e na quantidade de água requerida (Diraman & Dibeklioglu, 2014).

1.3 Estatísticas de produção de azeite na Europa e no Mundo

A figura 1.4 mostra a evolução da produção de azeite a nível mundial, entre 2000 e 2015, sendo os dados da campanha oleícola 2014/2015 provisórios.

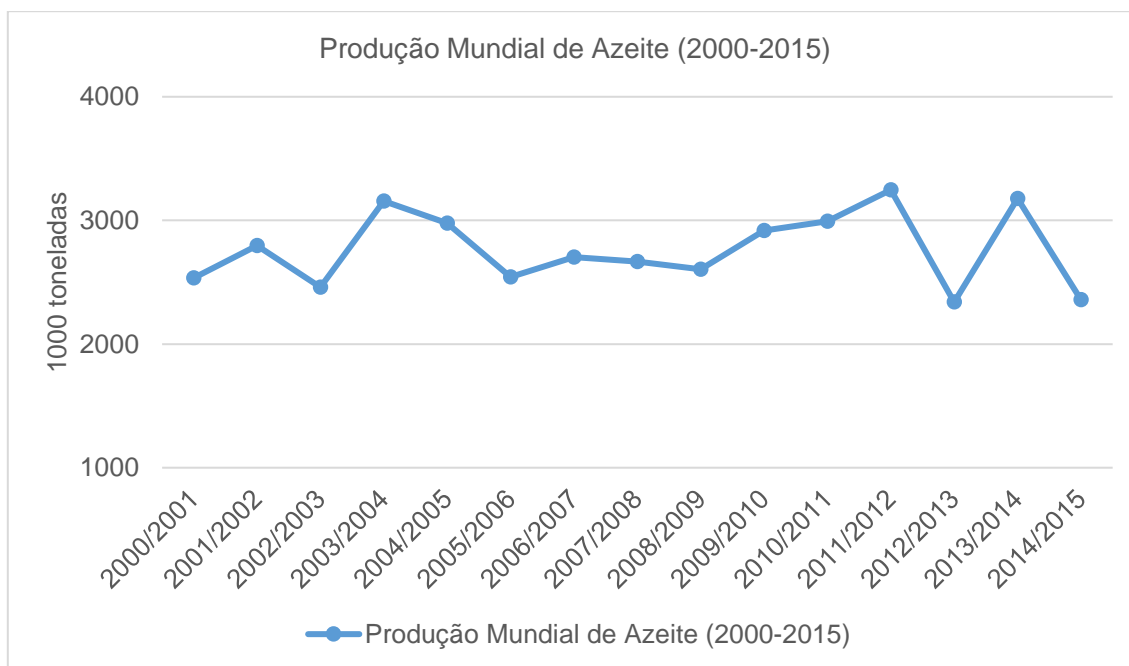


Figura 1.4 - Evolução da produção mundial de azeite entre 2000 e 2015 (*dados provisórios) (Adaptado de COI, 2015⁽²⁾).

A produção mundial de azeite tem-se mantido entre 2 401 500 toneladas e 3 321 000 toneladas, entre 2000 e 2015, com algumas oscilações. A campanha oleícola 2011/2012 registou a maior produção de azeite até ao momento, com 3.321.000 toneladas produzidas. Nas campanhas 2012/2013 e 2014/2015 registou-se a menor produção de azeite desde o início do século (figura 1.4).

As oscilações observadas durante os vários anos são, maioritariamente, devidas a fatores ambientais. Os olivais de cultivo intensivo e superintensivo dispõem de sistemas de rega que permitem superar a falta de precipitação e aumentar ou manter uma boa produção de azeitona para azeite, ao contrário dos olivais tradicionais ou de sequeiro (INE, 2016).

A figura 1.5 mostra a evolução da produção de azeite na Europa, entre 2000 e 2015, sendo os dados relativos à campanha oleícola 2014/2015 provisórios.

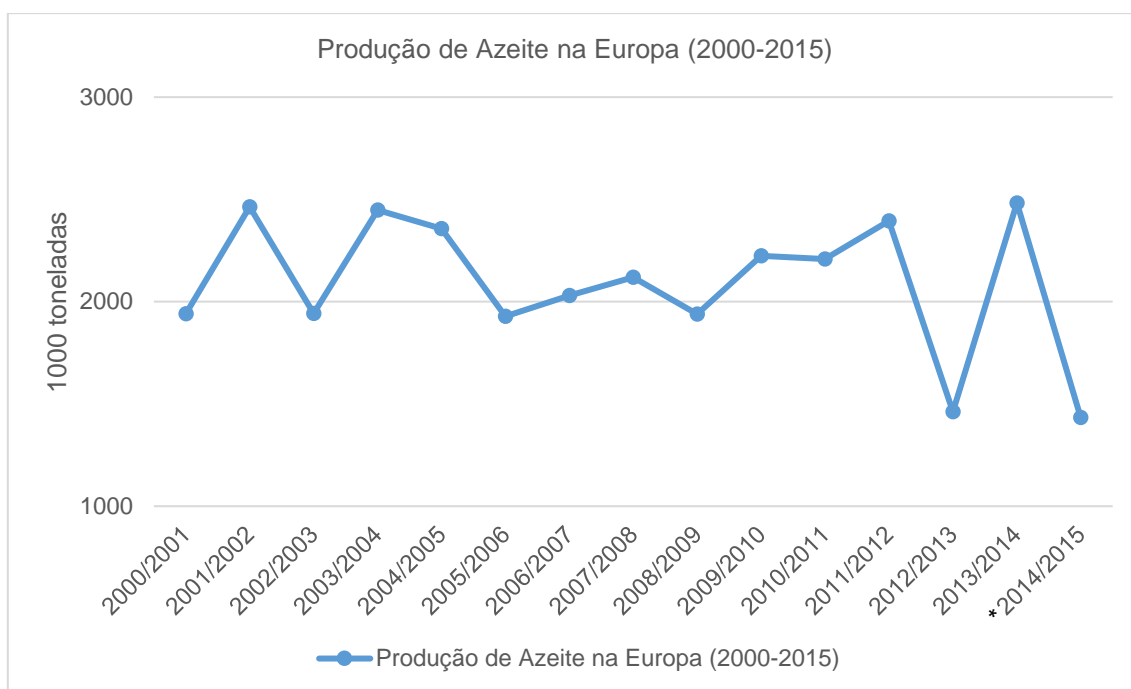


Figura 1.5 - Evolução da produção de azeite na Europa entre 2000 e 2015 (*dados provisórios) (Adaptado de COI, 2015 ⁽³⁾).

A par do que se verificou para a produção mundial de azeite, a produção de azeite na Europa igualmente oscilações ao longo do tempo de produção. As oscilações mais relevantes registaram-se nas campanhas de 2011/2012 e 2014/2015, em que de forma bianual ocorreu um aumento ou queda na produção de forma mais acentuada do que nas restantes campanhas. (figura 1.5). Na campanha 2014/2015 os países europeus alcançaram uma produção total 1.433.500 toneladas de azeite, o que representa um decréscimo de aproximadamente 42% relativamente à campanha anterior.

Os países membros do COI alcançaram uma produção total de 2.320.000, das quais os países produtores europeus totalizam 1.532.000 t, decrescendo no seu todo 38% face à campanha anterior. As condições meteorológicas adversas provocaram uma diminuição da produção em alguns países produtores.

A figura 1.6 mostra os principais países produtores de azeite e respetivas proporções.

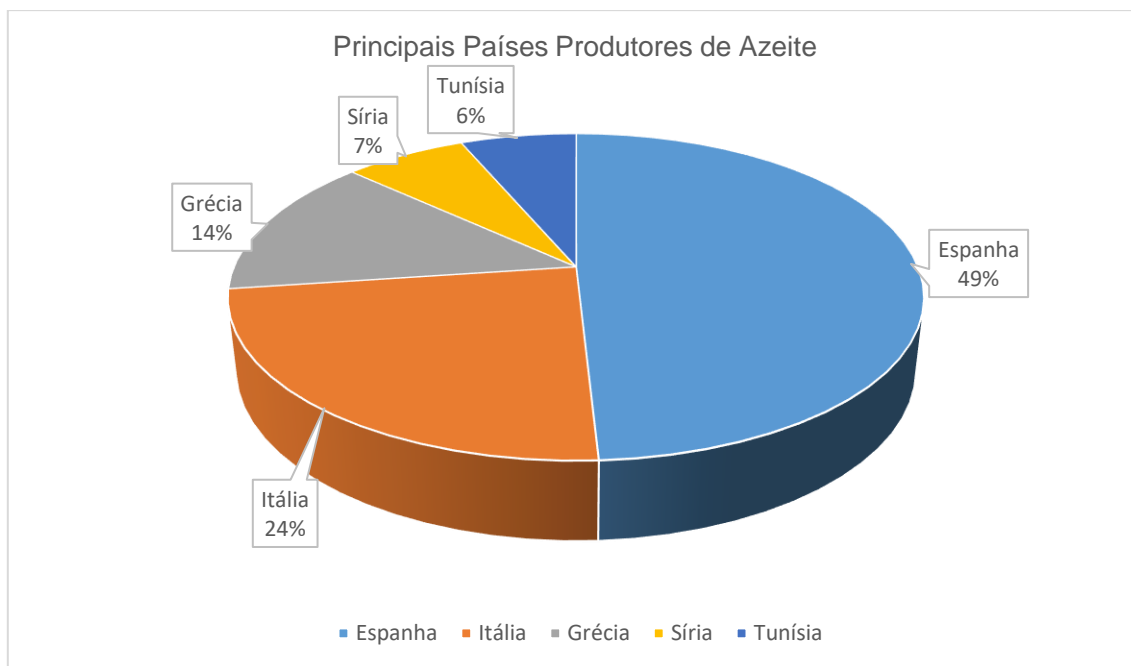


Figura 1.6 - Principais países produtores mundiais de azeite, entre 2000 e 2013 (Adaptado de FAOSTAT, 2015).

A figura 1.6 revela que a Espanha é o principal produtor de azeite, com 49% da produção mundial, seguido da Itália e Grécia com 24% e 14%, respetivamente. A Síria e a Tunísia detêm a menor parte da fatia.

Três quartos da produção mundial de azeite é proveniente de países localizados na região Mediterrânica, como Espanha, Itália, Grécia, Tunísia, Turquia, Síria, Marrocos e Portugal. As oliveiras crescem a latitudes entre 30° e 45° dos hemisférios Norte e Sul (Azbar *et al.*, 2004). O INE prevê, para Portugal, um aumento de 75% na produção de azeite, face à campanha 2014/2015 (INE, 2016).

1.4 Legislação relativa à produção de azeite

1.4.1 Decreto-Lei nº 76/2010, de 24 de junho de 2010.

O Decreto-Lei nº 76/2010 “estabelece as regras de execução, a nível nacional, do Regulamento (CE) nº 1019/2002, da Comissão, de 13 de junho relativo às normas de comercialização do azeite (...) e estabelece as condições a observar na obtenção, tratamento e comercialização do azeite e do óleo de bagaço de azeitona”.

De acordo com a presente legislação, o azeite possui qualidades organoléticas e nutricionais únicas, advindo daí a necessidade de estabelecer critérios objetivos para a sua comercialização, destinados a defender a sua autenticidade, segurança alimentar a o próprio consumidor.

Na extração e duração do azeite apenas são admitidas as seguintes operações: lavagem e moenda da azeitona, batedura e aquecimento da massa, extração realizada apenas por processos físicos de ação mecânica e de tensão superficial e depuração mediante operações de decantação, lavagem, filtração e centrifugação. Para a obtenção azeite refinado ou de azeite lampante as operações permitidas diferem em vários aspetos das permitidas para o azeite.

1.4.2 Regulamento de Execução (EU) nº 1348/2013, da Comissão de 16 de dezembro de 2013

Regulamento de Execução (EU) nº 1348/2013, que altera o Regulamento (CEE) nº 2568/91 é relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados.

O Regulamento (CEE) nº 2568/91 define as características químicas e organoléticas dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona e descreve os métodos a utilizar para as determinar. Esses métodos, assim como os valores-limite relativos às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, devem ser atualizados com base no parecer dos peritos químicos e em consonância com o trabalho realizado no Conselho Oleícola Internacional (COI). Desta forma, devem ser adaptados os valores-limite para os estigmastadienos, as ceras, o ácido mirístico e os ésteres alquílicos de ácidos gordos e alterados os esquemas de decisão utilizados para verificar se as amostras de azeites ou de óleos de bagaço de azeitona correspondem à categoria declarada. Por forma a garantir a autenticidade dos azeites e a proteger o interesse dos consumidores, é necessário introduzir um esquema de decisão com parâmetros mais restritivos para o campesterol e o delta-7-estigmastenol. O método de análise relativo à composição e ao teor de esteróis e para determinação do eritrodiol e do uvadiol deve ser substituído por um método mais fiável, bem como a reformulação da avaliação organolética dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona (Regulamento de Execução (EU) nº 1348/2013).

1.4.3 Regulamento (UE) nº 652/2014 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de maio de 2014

Regulamento (UE) nº 652/2014 “estabelece disposições para a gestão das despesas relacionadas com a cadeia alimentar, a saúde e o bem-estar animal, a fitossanidade e o material de reprodução vegetal”. A presente legislação “determina requisitos em matéria de alimentos e de segurança dos alimentos, (...) incluindo regras destinadas a garantir práticas leais no comércio e a prestação de informações aos consumidores”. Estabelece ainda requisitos relacionados com “material de reprodução vegetal, proteção de variedades vegetais, organismos geneticamente modificados, colocação no mercado, utilização de produtos fitofarmacêuticos e utilização sustentável de pesticidas”.

1.4.4 Regulamento (CE) nº 510/2006, de 20 de março de 2006

Regulamento (CE) nº 510/2006 do Conselho “estabelece as regras relativas à proteção das denominações de origem e das indicações geográficas dos produtos agrícolas destinados à alimentação humana”. “O presente documento considera que a produção, o fabrico e a distribuição de produtos agrícolas e de géneros alimentícios ocupam um lugar importante na economia da Comunidade”

O Regulamento (CE) nº 510/2006 estabelece as seguintes definições:

«**Denominação de origem**» refere-se ao nome de uma região, de um local determinado ou, em casos excecionais, de um país, que serve para designar um produto agrícola ou um género alimentício: originário dessa região, desse local determinado ou desse país, cuja qualidade ou características se devem essencial ou exclusivamente a um meio geográfico específico, incluindo os fatores naturais e humanos e cuja produção, transformação e elaboração ocorrem na área geográfica delimitada;

«**Indicação geográfica**» refere-se ao nome de uma região, de um local determinado ou, em casos excecionais, de um país, que serve para designar um produto agrícola ou um género alimentício: originário dessa região, desse local determinado ou desse país, e que possui determinada qualidade, reputação ou outras características que podem ser atribuídas a essa origem geográfica, e cuja produção e/ou transformação e/ou elaboração ocorrem na área geográfica delimitada.

1.4.5 Decreto-Lei nº 113/2006, de 13 de junho de 2006

Decreto-Lei nº 113/2006 “visa assegurar a execução e garantir o cumprimento, no ordenamento jurídico nacional, das obrigações decorrentes dos Regulamentos (CE) nº 852/2004 e 853/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril, relativos à higiene dos géneros alimentícios e às regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, respetivamente (...)”.

1.4.6 Decreto-Lei nº 560/99, de 18 de dezembro de 1999

Decreto-Lei nº 560/99 “estabelece as regras a que deve obedecer a rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios, sejam ou não pré-embalados, a partir do momento em que se encontram no estado em que vão ser fornecidos ao consumidor final, bem como as relativas à indicação do lote”

“Na rotulagem dos géneros alimentícios deverão ainda observar-se, quando for o caso, as regras especiais relativas aos géneros alimentícios com denominações de origem e indicações geográficas protegidas e agro-biológicos”.

O presente Decreto-Lei prevê as seguintes menções obrigatórias:

- A denominação de venda;

- A quantidade líquida;
- A data de durabilidade mínima ou a data limite de consumo;
- A referência ao teor alcoométrico adquirido, para as bebidas com um teor alcoométrico superior a 1,2 % vol.

1.5 Propriedades nutricionais e nutracêuticas do azeite

As peculiares propriedades bioquímicas, biológicas e nutricionais do azeite permitem a sua aplicação em nutrição clínica (Mangas-Cruz *et al.*, 2004). O consumo de azeite tem aumentado em todo mundo devido às suas excelentes propriedades nutricionais e organolépticas (El Riachy *et al.*, 2011). As principais razões para o crescimento do mercado dos alimentos funcionais prendem-se com a população atual e com as tendências de mercado. A palavra nutracêutica é a fusão das palavras “nutrição” e “farmacêutico” e é definida como qualquer substância que pode ser considerada como alimento ou como parte de um alimento, que proporciona benefícios médicos ou de saúde, incluindo prevenção e tratamento de doenças (Santini *et al.*, 2017)

A composição química do azeite virgem extra contribui para satisfazer as necessidades diárias de ácidos gordos essenciais e de antioxidantes, especialmente em situações de carência de vitamina E (Mangas-Cruz *et al.*, 2004) devido ao elevado teor em α -tocoferol. Têm, também, sido atribuídas outras propriedades nutricionais benéficas à ingestão azeite, como baixos níveis de pressão sanguínea, baixa incidência de doenças cardiovasculares e cancro (Frankel, 2011; Storniolo *et al.*, 2014). As propriedades saudáveis do azeite são atribuídas à elevada quantidade de ácidos gordos monoinsaturados, sob a forma de ácido oleico (18:1 n-9), que varia entre 56% e 84% do total de ácidos gordos (Visioli & Galli, 2002). A elevada percentagem de MUFA em detrimento de PUFA reduz o risco de arteriosclerose (García-González *et al.*, 2008).

O azeite é um alimento amplamente consumido por algumas populações de países da bacia mediterrânica, bem como por povos de outras regiões do mundo. Isto deve-se ao sabor único, ao conteúdo elevado em MUFA (saudáveis) e à presença de constituintes minoritários biologicamente importantes (Boskou, 2009). A dieta Mediterrânica é um modelo nutricional inspirado no padrão alimentar tradicional de alguns países da bacia do Mediterrâneo. Este regime alimentar é caracterizado por consumo abundante de azeite, alimentos de origem vegetal, como frutas, legumes, leguminosas, cereais, nozes e sementes, por a ingestão moderada de vinho (principalmente com as refeições), bem como por consumo moderado de peixe, frutos do mar, iogurtes, carne, queijos, aves e ovos e por um baixo consumo de carnes vermelhas e carnes processadas (Casas *et al.*, 2014).

Alguns estudos acerca de aspetos evolutivos da dieta referem que têm ocorrido grandes mudanças na dieta humana, particularmente no tipo e quantidade de ácidos gordos essenciais e no teor de antioxidantes ingeridos (Simopoulos, 2002).

1.6 Composição química detalhada do azeite

O azeite virgem é constituído por dois grupos principais: os componentes maioritários ($\approx 98\%$) e os componentes minoritários ($\approx 2\%$) (El Riachy *et al.*, 2011)). A fração maioritária do azeite é constituída principalmente por triglicéridos, por pequenas concentrações de monoglicéridos e diglicéridos e por alguns ácidos gordos livres (Cerretani *et al.*, 2006; Moreno & Mitjavila, 2003). Os componentes minoritários constituintes do azeite virgem são as vitaminas, como α e β -tocoferol e β -carotenos (responsáveis pela cor em conjunto com a clorofila), fitoesteróis, esqualenos, pigmentos, ácidos terpénicos, flavonóides e compostos fenólicos (Visioli & Galli, 2002).

1.6.1 Perfil de ácidos gordos

Os ácidos gordos são estruturas simples constituídas por cadeias longas de átomos de carbono (C). Embora estejam presentes no azeite apenas alguns tipos de ácidos gordos, as suas proporções influenciam fortemente as características e valor nutritivo do produto (Mailer, 2006). Desta forma, a composição em ácidos gordos representa um parâmetro indicador de qualidade e autenticidade do azeite virgem (Diraman, 2010).

A fração saponificável é constituída principalmente por ácido oleico (MUFA), que representa cerca de 80% da composição lipídica total. Em menor quantidade estão presentes os ácidos gordos saturados – ácido palmítico (10% - 20%) e os polinsaturados – ácido oleico (2,5% - 20%) (Gomez-Gonzalez *et al.*, 2011; Pellegrini *et al.*, 2001). Os ácidos gordos monoinsaturados são extremamente importantes devido ao seu elevado valor nutricional e à contribuição para a estabilidade oxidativa dos óleos (Diraman & Dibeklioglu, 2014).

A composição do azeite em ácidos gordos (tabela 1.4) é um parâmetro que se encontra diretamente relacionado com o tempo de prateleira do produto e é quantitativamente afetado por fatores, como a cultivar de azeitona utilizada para produção do azeite (Diraman, 2010).

Tabela 1.4 - Composição em ácidos gordos dos azeites virgem, determinada através de cromatografia gasosa (% total de ácidos gordos) (Adaptado de Codex Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils, 2013).

Ácidos Gordos	Azeites Virgem
C14:0	0.0-0.05
C16:0 – Palmítico	7.5-20.0
C16:1 – Palmitoleico	0.3-3.5
C17:0	0.0-0.3
C17:1	0.0-0.3
C18:0 – Esteárico	0.5-5.0
C18:1 – Oleico	55.0-83.0
C18:2 – Linoleico	3.5-21.0
C18:3*	
C20:0 - Araquidónico	0.0-0.6
C22:0	0.0-0.4
C24:0	0.0-0.2
Ácidos Gordos <i>trans</i>	
C18:1 T	0.0-0.05
C18:2 T + C18:3 T	0.0-0.05

* não determinado

Apesar dos efeitos benéficos para a saúde atribuídos ao ácido linoleico, este é um PUFA com três ligações duplas e por isso, é particularmente instável e suscetível à oxidação (rancidez) (Mailer, 2006).

1.6.2 Perfil de componentes antioxidantes

Os antioxidantes constituintes do azeite são representados por tocoferóis, pigmentos (carotenoides e clorofilas) e compostos fenólicos (Servili & Montedoro, 2002). Os principais antioxidantes são compostos fenólicos e dividem-se em fenólicos lipofílicos e hidrofílicos. A maioria dos fenólicos hidrofílicos presentes no azeite são exclusivos da espécie *Olea europaea*, ao contrário dos fenólicos lipofílicos, como os tocoferóis, que existem noutros óleos vegetais (El Riachy *et al.*, 2011).

De acordo com Pellegrini e colaboradores (2001), o conteúdo em α -tocoferol (> 90% da composição total de tocoferóis) varia com tipo de azeite (azeite ou azeite virgem extra), sendo mais elevado no azeite virgem extra virgem. A denominação “extra virgem” refere-se apenas ao azeite que tem um grau de acidez inferior a 1%, de acordo com a legislação vigente (Regulamento (CE) nº1234/2007 do Conselho, de 22 de outubro de 2007). Esta categoria de azeite apresenta um elevado teor de compostos fenólicos quando comparado com outros, incluindo aqueles cujo rótulo os define como “azeite”. Os últimos são pobres em compostos fenólicos devido aos procedimentos químicos utilizados para redução da acidez excessiva (Visioli & Galli, 2002).

O azeite virgem apresenta elevada resistência à deterioração oxidativa devido ao seu conteúdo em triglicéridos, ao baixo teor em ácidos gordos polinsaturados e à presença de compostos fenólicos antioxidantes, principalmente polifenóis e tocoferóis. Os polifenóis são compostos de grande importância para a estabilidade do azeite virgem, ao contrário do que acontece com outros óleos refinados, nos quais estes compostos são eliminados ou drasticamente reduzidos durante o processo de refinação (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005; Velasco & Dobarganes 2002). Os polifenóis atuam como antioxidantes primários por forma inibir a oxidação do azeite. Atuando como disruptores de cadeias através da doação de um radical hidrogénio aos radicais alquilperóxido, que são gerados através de oxidação lipídica, havendo formação de derivados estáveis durante esta reação (Servili *et al.*, 2009).

1.7 Azeites Aromatizados

Os consumidores estão cada vez mais informados acerca de produtos alimentares, tornando-os mais exigentes em matéria de qualidade, saúde e inovações. O setor do azeite tem vindo a sofrer inovações, como a introdução de aroma (Sousa *et al.*, 2015). A adição de aromatizantes ao azeite, tais como ervas aromáticas, especiarias ou frutas/legumes, alteram as suas características sensoriais e a estabilidade durante o tempo de prateleira (Moldão-Martins *et al.*, 2004), para além melhorar as suas propriedades antioxidantes (Nevado *et al.*, 2012).

1.7.1 Utilização de carotenoides como aditivos de azeite

Os carotenoides são pigmentos naturais, responsáveis pela cor de vários frutos e vegetais; são solúveis em matrizes oleosas, emulsões e formas coloidais; apresentam boa estabilidade a valores de pH variáveis dos alimentos uma estabilidade aceitável em uso alimentar, em condições de redução em atmosferas mínimas de oxigénio (Bauernfeind *et al.*, 1981; Arscott, 2013).

A cor amarela-laranja-vermelha de alguns frutos e vegetais deve-se principalmente aos carotenoides (Sanchez *et al.*, 2014). Estes são sintetizados apenas por plantas e microrganismos, o que implica que estes sejam incluídos na alimentação humana sob a forma de alimentos, principalmente frutos ou vegetais, ou suplementos (Bauernfeind *et al.*, 1981). Os animais também não sintetizam carotenoides, mas podem acumulá-los, por vezes em quantidades elevadas, quando ingeridos. Os animais e seus derivados (ovos, leite, pescado) representam uma fonte adicional de carotenoides (Britton & Khachik, 2009).

Os carotenoides são uma classe de fitoquímicos que contribuem para o estatuto de “alimentos funcionais” atribuído aos frutos e vegetais e, um dos principais contribuintes para os benefícios de saúde (Arscott, 2013; Arscott & Tanumihardjo, 2010). Alguns carotenoides apresentam elevada atividade provitamina A, sendo capazes de transformar estruturas específicas dos carotenoides nesta vitamina.

Os carotenoides com atividade provitamina A são abundantes em frutos de cor escura e vegetais, os quais possuem, pelo menos, um anel de β -ionona (figuras 1.7 e 1.8) não substituído, com uma cadeia lateral poliênica, com um mínimo de 11 carbonos (Panel on Micronutrients *et al.*, 2002; Arscott & Tanumihardjo, 2010). O β -caroteno é o carotenoide precursor de vitamina A mais conhecido, devido ao elevado nível de atividade provitamina A e à sua abundância em alimentos (Bauernfeind *et al.*, 1981). No organismo humano a conversão do β -caroteno em vitamina A ocorre por via enzimática em vários tecidos, sobretudo no intestino delgado. A vitamina A é um nutriente importante para a visão, expressão genética, reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento e função imunitária (Tang & Russel, 2009).

Para além da atividade provitamina A, a outros carotenoides, como o licopeno têm sido atribuídas propriedades antioxidantes (Bauernfeind, 1972). Os carotenoides podem prevenir danos causados pelas espécies reativas de oxigénio, as quais são continuamente produzidas pelo organismo durante o funcionamento celular e/ou introduzidas por fontes endógenas como o fumo de tabaco, exposição solar ou exposição a solventes orgânicos (Gaté *et al.*, 1999).

Os carotenoides mais abundantes no plasma humano são β -caroteno, licopeno, luteína, criptoxantina, α -caroteno e zeaxantina (figura 1.7) (Arscott & Tanumihardjo, 2010).

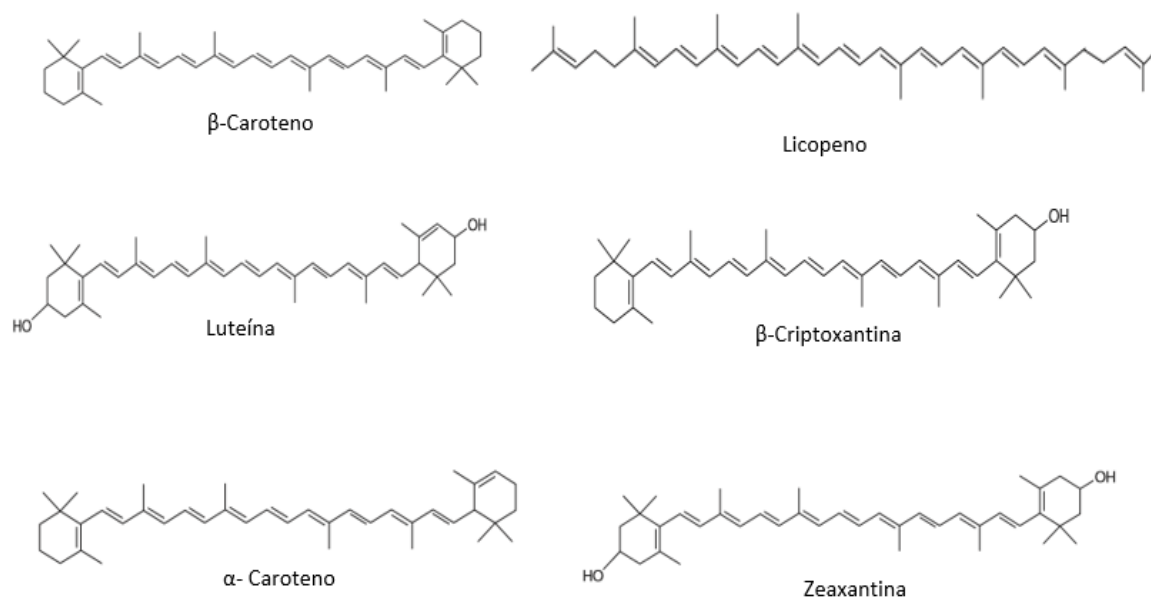


Figura 1.7 - Estruturas químicas dos carotenoides mais abundantes no plasma humano (Arscott & Tanumihardjo, 2010).

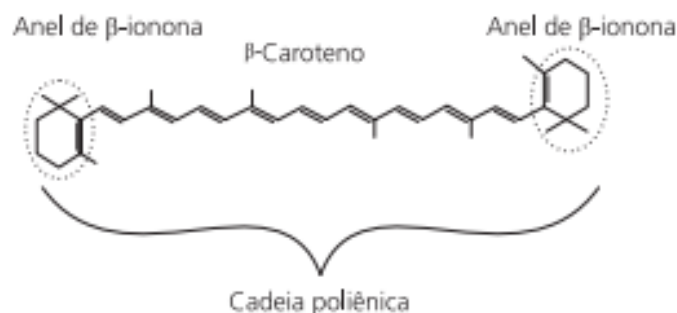


Figura 1.8 - Estrutura química do β -caroteno e identificação do anel β -ionona (Arscott & Tanumihardjo, 2010).

A associação entre a ingestão de carotenoides, especialmente do β -caroteno, e a redução do risco de doenças degenerativas é inconclusiva. Alguns autores referem a inexistência de correlação positiva entre o consumo de carotenoides e a diminuição de risco de cancro do pulmão ou da próstata (Männistö *et al.*, 2004; Ambrosini *et al.*, 2008); outros estudos que revelam uma associação positiva entre consumo de carotenoides e a prevenção do cancro (Niizu & Rodriguez-Amaya, 2005).

1.7.2 Utilização de licopeno como aromatizante do azeite

O licopeno é o principal pigmento responsável pela cor vermelha do tomate (*Lycopersicon esculentum*) e produtos de tomate, bem como da melancia, uva negra, papaia e goiaba. É um dos principais carotenoides presentes nas dietas Norte-Americana e Europeia (Clinton, 1998; Arscott, 2013; Montesano *et al.*, 2006)

O licopeno é carotenoide acíclico constituído apenas por carbono e hidrogénio ($C_{40}H_{56}$) com 13 ligações duplas, 11 das quais são conjugadas (Story *et al.*, 2010; Ciurlia *et al.*, 2009). A cor dada pelo licopeno ao tomate e produtos de tomate deve-se à existência das muitas ligações conjugadas que compõem a sua estrutura (Topal *et al.*, 2006; Singh & Goyal, 2008). O tomate faz parte da dieta mediterrânica, representa uma importante fonte de nutrientes para a população mundial. A planta do tomate (*Lycopersicum esculentum*) sintetiza pigmentos bioativos como carotenoides, principalmente licopeno e β - caroteno, glicoalcalóides e α - tomatina (Friedman, 2013). As dietas atuais recomendam o aumento do consumo de frutos e vegetais ricos em antioxidantes, que potenciam o papel protetor do licopeno contra diversas doenças (Agarwal & Rao, 2000).

Este carotenoide possui diferentes formas isométricas (figura 1.11), mas está disponível na natureza maioritariamente na forma de isómero *trans*, sendo que nos tecidos e no plasma humano é encontrado apenas na forma *cis* (Clinton, 1998; Unlu *et al.*, 2007; Chasse *et al.*, 2001). O tomate vermelho contém, tipicamente, cerca de 95% de licopeno na forma de isómero *trans*, ao passo que no tomate-tangerina predomina o licopeno na sua forma *cis*-tetra, um isómero da forma *trans* deste carotenoide (Singh & Goyal, 2008). Tonucci e colaboradores (1995) detetaram e quantificaram vários tipos de carotenoides em tomate, sendo o licopeno mais abundante, com concentrações de 55mg/100g em pasta de tomate. Também outros estudos referem a maior abundância do licopeno no tomate, embora também existam quantidades muito baixas de β -caroteno e luteína (Lin & Chen, 2003).

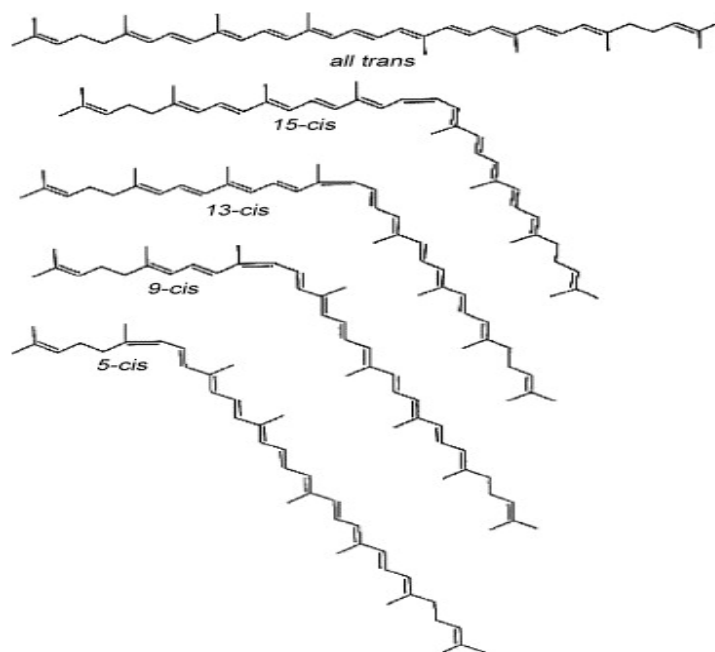


Figura 1.9 - Formas isoméricas *trans* e *cis* do licopeno (Agarwal & Rao, 2000).

A cadeia poliénica conjugada que é característica dos carotenoides faz com que estes sejam suscetíveis à degradação provocada por diversos agentes (Boon *et al.*, 2010). A isomerização da cadeia poliénica *cis-trans* é induzida pela luz, pela energia térmica e pelas reações químicas (Goula *et al.*, 2006) (Zechmeister *et al.*, 1943), portanto, na ausência destes fatores, o licopeno é um elemento estável (Lee & Chen, 2002, Topal *et al.*, 2006). A degradação do licopeno acarreta problemas, compromete a qualidade sensorial do produto final e provoca a diminuição da sua atividade biológica (propriedades benéficas para a saúde humana) (Egydio *et al.*, 2010; Shi & Le Maguer, 2000). Os mecanismos de proteção envolvem o aprisionamento de oxigénio atómico e de radicais livres (Böhm *et al.*, 2002).

Ao contrário do β -caroteno, o licopeno é um carotenoide desprovido de atividade provitamina A, pois a sua estrutura carece do anel β -ionona (figuras 1.8 e 1.10) (Clinton, 1998; Arscott, 2013). Contudo, o licopeno tem um elevado poder antioxidante.

Os carotenos são moléculas naturalmente hidrofóbicas, apresentam solubilidade limitada em água e são mais solúveis em solventes apolares (Strati & Oreopoulou, 2011).

1.7.3 Capacidade antioxidante do licopeno e mecanismo de ação

O *stress* oxidativo é reconhecido como potenciador de diversas doenças crónicas, incluindo cancro, doenças cardiovasculares, osteoporose e diabetes. O *stress* oxidativo é induzido pelas espécies reativas de oxigénio (ROS), que são geradas pela atividade metabólica normal, bem como por fatores inerentes ao estilo de vida. Tabagismo, sedentarismo e alimentação desequilibrada são hábitos que estão envolvidos no desenvolvimento e progressão das doenças acima mencionadas. A manutenção

de uma baixa concentração de ROS no organismo humano é fundamental na defesa contra agentes patogénicos, uma vez que as ROS podem reagir com as membranas lipídicas, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outras micromoléculas. (Rao & Rao 2007; Rajendran *et al.*, 2014) Níveis elevados de ROS podem desencadear um feedback positivo e sobrecarregar a capacidade antioxidante, levando ao *stress* oxidativo e à apoptose das células. A produção intracelular de ROS não implica necessariamente toxicidade celular, pois estes são compostos essenciais para a manutenção da vida. Desta forma, deve existir um equilíbrio entre a produção e a remoção de ROS para evitar danos celulares (Jones, 2006).

López-Alarcón & Denicola (2013) consideram a existência de três mecanismos antioxidantes diferentes: (1) inibição de enzimas oxidantes, que se traduz na diminuição da produção celular de ROS/RNS; (2) interação com as vias de sinalização redox, que se traduzem numa resposta celular antioxidante (mecanismo menos clássico); (3) reação direta com ROS/RNS, desencadeando uma resposta/produto menos tóxico (mecanismo mais popular de um antioxidante - “aprisionamento de radicais livres”).

Os carotenoides com atividade antioxidante têm um papel significativo na saúde humana, na medida em que, equilibram o balanço pró-oxidantes/antioxidantes. A ausência de equilíbrio representa um fator crítico no desencadeamento de processos patogénicos responsáveis por diversas doenças crónicas (Fiedor & Burda, 2014). O licopeno é, entre os carotenoides, o antioxidante mais poderoso, *in vitro*, encontrado no organismo humano. A natureza insaturada da molécula de licopeno permite considerá-lo, entre os carotenoides naturais, um dos mais poderosos antioxidante e inibidores do oxigénio singleto (Böhm *et al.*, 2002; Rao & Rao, 2007). A elevada atividade de eliminação de ROS atribuída ao licopeno permite a inibição da peroxidação lipídica e de danos no DNA (Kelkel *et al.*, 2011). Um estudo desenvolvido por Böhm e colaboradores (2002), que partiu do isolamento de 4 tipos de carotenoides (α -caroteno, β -caroteno, licopeno e zeaxantina) permitiu concluir que o licopeno tem uma atividade antioxidante superior ao α -caroteno e zeaxantina e, cerca de duas vezes maior que o β -caroteno. As moléculas dos carotenoides reagem com os radicais livres e há formação de um novo radical mais estável, devido ao sistema de ligações duplas conjugadas (Krinsky & Yeum 2003).

1.7.4 Efeitos preventivos do licopeno

O licopeno apresenta importantes propriedades biológicas e físico-químicas, relacionadas especialmente com a sua capacidade antioxidante (Maiani *et al.*, 2009; Shi & Le Maguer, 2000), um dos mecanismos que confere proteção contra doenças coronárias. Dados científicos demonstram que o licopeno inibe sinergicamente a oxidação do colesterol, nomeadamente, do LDL (*Low Density Lipoprotein*) em combinação com a vitamina E ou flavonoides (Fuhrman *et al.*, 2000). Enquanto antioxidante, o licopeno atua na prevenção de doenças cardíacas, uma vez que, reduz a acumulação de placas que possam levar à formação de coágulos de sangue, ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais (Singh & Goyal, 2008).

Uma dieta rica em carotenoides, presentes em quantidades elevadas em frutas e vegetais, confere fotoproteção a organismos fotossintéticos, aos olhos e à pele (Böhm *et al.*, 2002). As frutas e os vegetais representam boas fontes de antioxidantes fitoquímicos (ex.: carotenoides), que podem atenuar os efeitos negativos do *stress* oxidativo (Rao & Rao, 2007). Estudos realizados referem que o aumento do consumo de tomate e de alimentos que contenham licopeno está associado ao baixo risco de alguns câncros, incluindo próstata e mama (Giovannucci, 2002; Gann *et al.*, 1999; Shi & Le Maguer, 2000; Agarwal & Rao, 2000).

Diversos estudos se referem aos benefícios de saúde providenciados pelos alimentos ricos em licopeno, mas o número de estudo em que foi encontrado um papel benéfico potenciado pelo consumo de licopeno isoladamente, é muito limitado (Kong *et al.*, 2010).

1.8 Solventes permitidos na indústria alimentar

De acordo com Diretiva 95/45/CE da Comissão, de 26 de julho de 1995 que estabelece os critérios de pureza específicos dos corantes que podem ser utilizados nos géneros alimentícios, “o licopeno é obtido por extração com solvente naturais de tomates vermelhos (*Lycopersicon esculentum* L.) e subsequente remoção do solvente”. Os solventes permitidos para extrações em alimentos destinados ao consumo humano são: diclorometano, dióxido de carbono, acetato de etilo, acetona, 2-propanol, metanol, etanol, hexano (Diretiva 95/45/CE). O licopeno apresenta elevada solubilidade em acetato de etilo e n-hexano, é parcialmente solúvel em acetona e etanol e insolúvel em água (Rath, 2007).

Alguns artigos referem a utilização de um fluido supercrítico de CO₂ para extração do licopeno. Este método extrai cerca de 60% (ou menos) do licopeno existente no bagaço (resíduo) de tomate (Rozzi *et al.*, 2002; MacHmudah *et al.*, 2012). Outros artigos referem a utilização de solventes orgânicos, como hexano, acetona, acetato de etilo (tabela 1.5) e etanol, usados separadamente ou em mistura (Lavecchia & Zuorro, 2008). A utilização de mistura de solventes será essencial para otimizar o processo de extração (Periago *et al.*, 2004; Dewanto *et al.*, 2002) descreve um método em que utilizada apenas acetona para extrair o licopeno do tomate.

Tabela 1.5 – Características gerais dos solventes orgânicos acetona e acetato de etilo (Smallwood, 1996).

Caraterísticas Gerais	Acetato de Etilo	Acetona
Fórmula empírica	C ₄ H ₈ O ₂	C ₃ H ₆ O
Massa Molar	88 g/mol	58 g/mol
Ponto de Ebulição	77°C	56°C
Ponto de Fusão	-84°C	-95°C
Solubilidade na água (25°C %m/m)	7,7	Total

1.9 Processos de extração de licopeno – Revisão Bibliográfica

O licopeno pode ser extraído do tomate ou frações através de diversos procedimentos. Hakala & Heinonen (1994) descrevem um processo de isolamento do licopeno em três etapas distintas: (1) extração dos carotenoides a partir de puré de tomate, com éter de petróleo; (2) pré-purificação do extrato de carotenoides a partir de todos os carotenoides, exceto o licopeno, para o qual foi utilizado o sistema de extração em fase sólida (SPE) usando colunas de sílica e, por fim (3) o licopeno foi purificado com recurso à utilização de cromatografia líquida de alta definição e a colunas de C18.

O procedimento apresentado por Rozzi e colaboradores (2002) consiste na extração de licopeno a partir de subprodutos de tomate (sementes e peles), permitindo assim a valorização de toda a matéria-prima. Os autores afirmam que o licopeno pode ser extraído, com elevado sucesso, através de SPE utilizando CO₂ sem recurso a co-solventes. Foi determinado o equilíbrio entre temperatura e pressão, por forma a otimizar o processo de extração. A par da metodologia anteriormente referida, Machmudah e colaboradores (2012) também utilizam um fluido supercrítico de dióxido de carbono para extrair o licopeno dos subprodutos de tomate. Neste último, o óleo de semente de tomate foi extraído sob condições semelhantes às dos carotenoides e analisado através de GC-MS e GC-FID, enquanto os carotenoides foram analisados através de HPLC.

Periago e colaboradores (2004) utilizaram uma mistura de três solventes orgânicos, hexano, acetona e etanol, para extrair o licopeno do tomate cru, molho de tomate e tomate em pasta. Lin & Chen (2003) testaram a eficiência de extração de carotenoides do sumo de tomates utilizando de cinco sistemas de solventes: (1) etanol-hexano (4:3, v/v), (2) acetona-hexano (3:5, v/v), (3) etanol-acetona-hexano (2:1:3, v/v), (4) acetato de etilo-hexano (1:1, v/v) e (5) acetato de etilo (100%). Para além da utilização de solventes (hexano, acetato de etilo, acetona e etanol), Lavecchia and Zuurro (2008) testaram a capacidade de aumento de extração de licopeno, a partir da casca do tomate, recorrendo a quatro preparações de enzimas comerciais com atividades pectinolítica, celulolítica e hemicelulolítica. Naviglio e colaboradores (2008) desenvolveram um equipamento inovador no campo da extração de licopeno puro. O equipamento, Naviglio ®, extrai licopeno a partir de resíduos de tomate em água e utiliza esta como fase de extração.

As propriedades benéficas do tomate são já conhecidas por potenciarem a diminuição do risco de alguns tipos de cancro e doenças cardiovasculares. Um estudo realizado por Fielding e colaboradores (2005) demonstrou que a adição de azeite ao tomate picado, durante a confeção, aumenta significativamente a absorção de licopeno no plasma humano Montesano e colaboradores (2006)

analisaram as alterações ocorridas no azeite virgem fortificado com licopeno puro (0,5 – 1,0 mg) obtido de tomate. Os realizados pelos autores permitiram concluir que o conteúdo em fenólicos totais era superior no azeite fortificado com licopeno, comparativamente com as amostras de referência (azeite sem qualquer suplementação). Permite também verificar uma boa correlação ($R^2= 0,969$) entre o conteúdo em fenólicos totais e a capacidade antioxidante do azeite enriquecido. A adição de licopeno ao azeite mostrou-se vantajosa tanto durante a confeção como a frio.

1.10 Objetivos e estrutura da dissertação

O trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação teve como objetivo principal a fortificação de azeite com extrato de licopeno, valorizando as diversas frações do tomate. A produção de extrato de licopeno baseou-se em dois processos: (1) utilizando subprodutos de tomate, considerando um tipo de processo industrial e (2) utilizando o tomate como um todo, considerando uma aproximação ao processo artesanal. Após a extração do licopeno, o extrato obtido foi incorporado em azeite virgem. Por fim, procederam-se às determinações analíticas nos extratos de licopeno e respetivos subprodutos.

A presente dissertação está organizada por capítulos:

- **Capítulo 1** – Descreve e reflete acerca dos fundamentos teóricos relativos ao trabalho desenvolvido. Aborda assuntos relativos ao azeite, como a composição química geral e específica, sistemas de extração, estatísticas de produção, legislação aplicável e respetivas propriedades benéficas. Este capítulo explora o licopeno enquanto carotenoide proveniente do tomate e caracteriza-o de acordo com as suas propriedades físicas e químicas, capacidade antioxidante e efeitos preventivos contra doenças;
- **Capítulo 2** – Evidencia e descreve todos os métodos de extração de licopeno utilizados ao longo do trabalho experimental, bem como todas as metodologias analíticas utilizadas para avaliação dos extratos preparados e respetivos subprodutos;
- **Capítulo 3** – Apresenta e discute os resultados obtidos pelos ensaios realizados aos extratos e respetivos subprodutos obtidos, fundamentando-os;
- **Capítulo 4** – Refere as conclusões gerais obtidas e sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2.1 Preparação do extrato bruto de tomate - Valorização de frações de tomate

Para a realização dos ensaios utilizaram-se quatro lotes de tomate inteiro. Adquiriu-se o tomate fresco, em estabelecimentos de comércio tradicional e em quantidade suficiente para cada um dos ensaios. Os procedimentos foram adaptados ao processamento artesanal e industrial.

Utilizaram-se diferentes métodos de extração de licopeno:

- A. Transferência de licopeno para o azeite por emulsificação;
- B. - Extração de licopeno a partir de tomate inteiro
 - 1. Extração a frio do resíduo de tomate;
 - 2. Extração *Soxhlet* do resíduo de tomate
- C. Extração de licopeno a partir de bagaço de tomate
 - 1. Extração *Soxhlet* de bagaço de tomate sem pré-tratamento;
 - 2. Extração *Soxhlet* de bagaço de tomate sujeito a pré-tratamento;
 - 3. Extração a refluxo do bagaço de tomate.

O ensaio A teve como objetivo avaliar, de forma preliminar, a passagem direta de licopeno para o azeite. Os métodos B permitiram testar a extração de licopeno a partir de tomate inteiro e os métodos C testaram a extração de licopeno a partir de bagaço de tomate.

2.1.1 Preparação do bagaço de tomate

Numa primeira fase lavou-se, pesou-se em balança analítica (KERN FKB) e cortou-se o tomate em pedaços pequenos, para que pudesse ser colocado numa centrifugadora (Ufesa, LC5005). Este equipamento permitiu a separação bruta da fase sólida do tomate, constituída por polpa, semente e pele; da fase líquida, constituída pelo sumo de tomate e alguma polpa.

2.1.2 Método A – Transferência de licopeno para o azeite por emulsificação

Neste ensaio procedeu-se à eliminação do excesso de água presente no bagaço de tomate, através de filtração a vácuo por pano-cru. Colocou-se o bagaço de tomate filtrado em contacto direto com o azeite e homogeneizou-se. Deixou-se repousar durante 5 dias, filtrou-se a mistura a vácuo, por pano-cru e posteriormente através de sulfato de sódio anidro (secagem da água) e de algodão (clarificar). Acondicionou-se o azeite fortificado em frasco de vidro, no escuro, por forma a evitar reações de oxidação.

2.1.3 Método B – Extração de licopeno a partir de tomate inteiro (Processo tradicional)

As extrações alusivas a este processo desenvolveram-se tendo por base um processo que se aproximasse o máximo possível do artesanal. Para esse efeito, o tomate, previamente lavado e pesado em balança analítica (ADAM® Nimbus), foi triturado com varinha mágica (Selecline). Após a trituração filtrou-se por pano-cru, obtendo-se uma fração líquida (filtrado), e uma fração sólida, (resíduo de tomate sem tratamento). Posteriormente procedeu-se à dispersão do resíduo obtido em acetona e filtrou-se, sob vácuo.

Em todos os ensaios o resíduo de tomate foi previamente disperso em acetona e as filtrações foram feitas através de pano-cru, conforme mostra a figura 2.1.



Figura 2.1 – Tomate triturado preparado para filtração inicial, por pano-cru.

2.1.3.2 Método B1- Extração a frio do resíduo de tomate

Neste método sujeitou-se o resíduo de tomate a duas dispersões consecutivas em acetona. Como produtos da primeira dispersão obteve-se o filtrado e o resíduo de tomate (figura 2.2). A parte líquida mediu-se por proveta graduada e colocou-se em balão de vidro previamente tarado em balança analítica (ADAM® Nimbus) e evaporou-se a acetona em evaporador rotativo (BüCHI® Rotavapor R-200). Reutilizou-se o resíduo de tomate para a segunda dispersão em acetona. Procedeu-se da mesma forma que na primeira dispersão. Colocou-se o resíduo resultante da segunda dispersão sob arrefecimento para evaporar totalmente a acetona. Pesou-se em balança analítica (ADAM® Nimbus) e guardou-se em recipiente apropriado.



Figura 2.2 - Produtos (filtrado e resíduo de tomate) resultantes da segunda dispersão em acetona do resíduo de tomate em acetona.

2.1.3.3 Método B2 - Extração Soxhlet do resíduo de tomate

A par dos outros métodos artesanais também neste se procedeu dispersão inicial do resíduo em acetona. Tratou-se o resíduo previamente com acetona, pesou-se em balança analítica (ADAM® Nimbus), colou-se em cartuxos e inseriu-se no extrator *Soxhlet*. Preparou-se a extração *Soxhlet* conforme descrito no ponto 2.1.3 e após a conclusão desta mediu-se o volume de solução bruta de licopeno obtido em proveta graduada e transpôs-se para outro balão de vidro previamente tarado em balança analítica (ADAM® Nimbus). Evaporou-se à secura em evaporador rotativo (BÜCHI® Rotavapor R-200). Pesou-se o extrato obtido após evaporação à secura em balança analítica (ADAM® Nimbus), bem o bagaço de tomate que se deixou dentro do cartuxo, em *hotte*, para evaporar completamente a acetona.

2.1.4 Método C - Extração de licopeno a partir de bagaço de tomate

2.1.5.1 Método C1 - Extração Soxhlet de bagaço de tomate sem pré-tratamento

Para a realização deste método não se sujeitou o bagaço previamente preparado a qualquer tipo de tratamento com solventes orgânicos antes da extração. Pesou-se a amostra em balança analítica (ADAM® Nimbus) e colocou-se em cartuxos feitos a partir de papel de filtro e inseriu-se no interior do extrator *Soxhlet*. Encaixou-se o extrator *Soxhlet* entre o balão de vidro com acetona e o condensador. Adicionaram-se reguladores de ebulição ao balão contendo solvente. Ligou-se a manta de aquecimento para iniciar a extração. Quando o solvente no interior do balão entrou em ebulição, o vapor produzido subiu e condensou devido à existência de arrefecimento (condensador); ao condensar caiu, sob a forma líquida, para o interior do extrator. Quando o volume de solvente atingiu um determinado nível, no interior do extrator, foi empurrado novamente para o balão, e assim continuamente.

Deu-se por concluída a extração quando o bagaço de tomate no interior do cartuxo ficou amarelo pálido/branco. Mediu-se o volume de extrato obtido, por proveta graduada, e transpôs-se para outro balão de vidro previamente tarado em balança analítica (ADAM® Nimbus). Evaporou-se o extrato à

secura, em evaporador rotativo (BüCHI® Rotavapor R-200). Pesou-se o extrato obtido após evaporação à secura, bem o bagaço de tomate que se deixou dentro do invólucro de papel, em *hotte*, para evaporar completamente a acetona.



Figura 2.3 – Exemplo de extração Soxhlet de bagaço de tomate após vários ciclos de extração.

2.1.5.2 Método C2 - Extração a Soxhlet de bagaço de tomate com pré-tratamento

Procedeu-se à dispersão do bagaço de tomate em solvente orgânico, sob agitação e deixou-se em contacto com solvente durante 15 minutos antes de filtrar a vácuo. Da filtração a vácuo resultou filtrado com acetona e bagaço de tomate tratado. Pesou-se o bagaço de tomate em balança analítica (ADAM® Nimbus) e utilizou-se na extração *Soxhlet*. Os fundamentos relativos à extração *Soxhlet* são iguais aos descritos no ponto 2.1.4. Após o término da extração procedeu-se de forma análoga ao descrito no ponto 2.1.4.

Nos ensaios desenvolvidos recorreu-se à utilização de acetona e de acetato de etilo (separadamente), por forma a comparar as eficiências de extração.

2.5.1.3 Método C3 - Extração a refluxo do bagaço de tomate

A preparação do bagaço de tomate para extração a refluxo realizou-se de forma igual ao descrito no ponto 2.1.5.1. Este método permitiu o contacto direto entre a amostra e o solvente, uma vez que o bagaço de tomate foi colocado dentro do balão juntamente com o solvente (figura 2.4). Quando o solvente entrou em ebulição libertou-se vapor que rapidamente condensou devido à ação do condensador colocado no topo do balão, onde circula água fria. A passagem do vapor ao estado líquido possibilitou a escorrência deste, de novo, para o interior do balão. Realizaram-se entre 3 a 4 ciclos de extração, de 15 minutos cada um, até o bagaço adquirir uma tonalidade amarelo pálido/ branco. Concluída a extração, procedeu-se de forma igual ao descrito no ponto 2.1.4

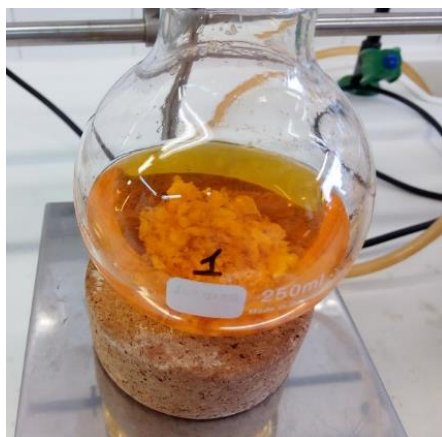


Figura 2.4 – Balão de vidro após extração a refluxo, contendo bagaço de tomate e solução bruta de licopeno.

2.2 Metodologias Analíticas

2.2.1 Determinações aplicadas aos extratos preparados

2.2.1.1 Teor de licopeno nos extratos preparados

Para determinar o teor de licopeno presente nos extratos preparados mediram-se as respectivas absorvâncias a 503 nm, em espectrofotómetro (Biochrom Libra S4), utilizando-se uma célula de vidro (10 mm). Para efetuar a leitura da absorvância de alguns dos extratos foi necessário realizar diluições, uma vez que a sua coloração original dos extratos não permitia obter leituras no comprimento de onda utilizado. Utilizou-se um comprimento de onda de 503 nm, que é o comprimento de onda máximo de absorção do licopeno e permite minimizar interferências provenientes de outros carotenoides existentes na matriz (Fish *et al.*, 2002).

A partir da absorvância medida calculou-se a concentração de licopeno na solução, em mole por litro, utilizando a expressão:

$$C(\text{mole/L}) = \frac{A(503)}{\epsilon \times b} \dots\dots\dots \text{Equação 2.1}$$

Onde,

A = Absorvância da solução a 503 nm;

ϵ = Coeficiente de extinção molar do licopeno, em Mole por centímetro;

b = Comprimento da célula, em centímetro.

A Eq.2.1 foi obtida a partir da expressão seguinte, conhecida como Lei de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon \times b \times c \dots\dots\dots \text{Equação 2.2}$$

Onde,

A = Absorvância da solução a 503 nm;

ϵ = Coeficiente de extinção molar do licopeno, em Mole por centímetro;

b = Comprimento da célula, em centímetro;

c = Concentração, em número de mole.

Calculou-se de seguida a respetiva concentração de licopeno, em mg por litro, através da expressão:

$$C(mg/L) = C(mole/L) \times MM(g/mole) \times 1000 \dots \dots \dots \text{Equação 2.3}$$

Onde,

C (mole/L) = Concentração de licopeno, em mole por litro, na solução;

MM = Massa molar do licopeno, em grama por mole.

Assim, foi possível calcular a massa de licopeno na solução:

$$m(mg/L) = \frac{C(mg/L) \times V(mL) \times \text{Fator dil.}}{1000} \dots \dots \dots \text{Equação 2.4}$$

Onde,

C (mg/L) = Concentração de licopeno, em miligrama por litro, na solução;

V = Volume de redissolução do extrato, em mililitro;

Fator dil. = Diluição utilizada para cada solução.

E, por fim a massa de licopeno extraída da amostra:

$$m(mg/100g) = \frac{m(lic.,sol.) \times 1000}{m(bag.,extr)} \dots \dots \dots \text{Equação 2.5}$$

Onde,

m (lic.sol) = massa, em miligramas, de licopeno na solução

m (bag. extr.) = Massa de bagaço utilizada na extração *Soxhlet* ou a Refluxo, em grama.

Utilizou-se um coeficiente de extinção molar de $17,2 \times 10^4 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, reportado por Zechmeister *et al.*, 1943, para o licopeno em hexano.

2.2.2 Determinações aplicadas ao produto final e aos extratos de licopeno

Com o objetivo de averiguar a existência de diferenças entre os azeites, fortificado com licopeno e não fortificado, os ensaios abaixo descritos foram aplicados a ambos os tipos de azeite. Os testes de atividade antioxidante DPPH e FRAP também foram aplicados aos extratos de licopeno preparados.

2.2.2.1 Atividade sequestradora de radicais livres – Teste Radical DPPH•

A avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) foi monitorizada através do método descrito por Blois (Blois, 1958 *citado in* Kedare & Singh, 2011). O DPPH• é um radical estável que permite avaliar a capacidade antioxidante de compostos específicos e extratos, através da sua reação com estes (Brand-Williams *et al.*, 1995), ou seja, após a redução do radical, na presença de um antioxidante, ocorre descoloração, que é detetável através de espectrofotometria (Miguel, 2007). A maior capacidade antioxidante é dada por um decréscimo da absorvância a 517 nm.

Procedeu-se à preparação das amostras de azeite e da solução de DPPH (Fluka©); utilizou-se TROLOX (ácido carboxílico \pm -6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2) como padrão. Diluíram-se as amostras, azeite fortificado com licopeno e azeite não fortificado, em proporção de 1:5, em etanol. Pesaram-se 9 mg de padrão de DPPH, transferiu-se para um balão volumétrico e perpez-se com 100 mL de metanol comercial, obtendo-se uma solução com concentração aproximada de 45 mg/L. A solução diluída de DPPH foi mantida refrigerada e isolada da luminosidade, devido à sua fotossensibilidade.

Mediram-se 0,5 mL de amostra ou de padrão, por pipeta graduada, e adicionou-se 4 mL da solução metanólica de DPPH. Homogeneizou-se a solução em vórtex, incubou-se no escuro durante 30 minutos. A redução do radical DPPH• foi medida por monitorização da diminuição da absorvância a 517 nm, medida em espectrofotómetro (Biochrom Libra S4). Os ensaios foram realizados em duplicado e contra um branco de metanol.

2.2.1.2 Capacidade antioxidante por redução do ferro – Teste FRAP

O teste FRAP mede a capacidade dos antioxidantes para reduzirem o complexo férrico tripiridiltiazina (Fe^{3+} - TPTZ) a um complexo ferroso Fe^{2+} - TPTZ (ver figura 2.5) e deteta compostos com potencial redox $<0,7V$ (potencial redox do Fe^{3+} - TPTZ) (Goulas *et al.*, 2015; Vignoli *et al.*, 2012). A reação ocorre em meio ácido (pH 3,6) (Huang *et al.*, 2005), de modo a manter a solubilidade férrica (Prior *et al.*, 2005).

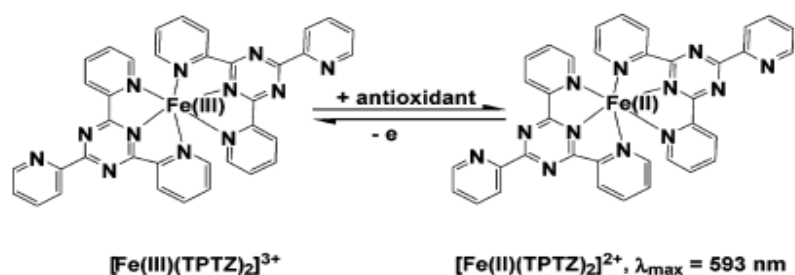


Figura 2.5- Redução férrica do reagente FRAP pelos compostos antioxidantes (Huang *et al.*, 2005)

O oxidante FRAP foi preparado através da mistura de solução tampão acetato 300 mM, solução de HCl diluído 40 mM, solução TPTZ 10 mM e solução de cloreto férrico ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$). Utilizou-se como padrão sulfato de ferro heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$). Todas as soluções utilizadas neste método encontram-se descritas abaixo.

Solução tampão acetato 300 mM

Num copo de 50 mL colocaram-se 3,1 g de acetato de sódio $3H_2O$, pesados em balança analítica (ADAM® Nimbus) e, adicionaram-se 16 mL de ácido acético glacial. Passou-se a solução para um balão volumétrico de 1500 mL e perfez-se com 1000 mL de água destilada. Acertou-se o pH a 3,6 e conservou-se a 4°C.

Solução de HCl diluído 40mM

Mediram-se, por pipeta graduada, 1,46 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado para um balão volumétrico de 1000 mL e perfez-se com água destilada.

Solução de TPTZ 10 mM

Pesaram-se 0,031 g de TPTZ, em balança analítica (ADAM® Nimbus), diluiu-se em 10 mL de HCl 40 mM. Levou-se a solução ao banho de ultrassons para dissolução completa do TPTZ.

Solução de cloreto férrico 20 mM

Pesaram-se 0,054 g de cloreto férrico ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), em balança analítica (ADAM® Nimbus), e dissolveu-se em 10 mL de água destilada. Levou-se ao banho de ultrassons para dissolução completa do cloreto férrico.

Prepararam-se as amostras de azeite e de extrato de licopeno em duplicado. Neste ensaio não se procedeu à diluição inicial das amostras de azeite, uma vez que foram detetadas interferências na metodologia. Mediram-se 0,1 mL de amostra/padrão, por pipeta graduada, para os tubos de ensaio e adicionaram-se 3 mL de reagente FRAP. Levaram-se as amostras ao banho a 37 °C durante 30 minutos e leu-se a absorvância, em espectrofotómetro (Biochrom Libra S4), a 593 nm.

2.2.1.3 Teor em compostos fenólicos totais – Método Folin-Ciocalteu

O teste de Folin-Ciocalteu baseia-se na reação do reagente Folin-Ciocalteu com os compostos fenólicos presentes na matriz. O reagente é constituído por ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), que são reduzidos a uma mistura de óxidos azuis de tungsténio (W_8O_{23}) e de molibdénio (Mo_8O_{23}), quando ocorre a oxidação dos compostos fenólicos, (Singleton, 1999)

O conteúdo em fenólicos totais das amostras de azeite (azeite fortificado com licopeno e azeite sem aditivos) foi determinado através do método Folin-Ciocalteu e usou-se ácido gálico como padrão. Desta forma, obteve-se o teor de fenólicos totais das amostras em equivalentes de ácido gálico. Para a reta

de calibração prepararam-se soluções-padrão com diferentes concentrações de ácido gálico, entre 0 mg/L e 100 mg/L.

Diluíram-se em etanol, em proporção de 1:5, as amostras a analisar. Para os tubos de ensaio mediu-se, por pipeta graduada, 0,5 mL de amostra diluída ou de padrão, adicionaram-se 2 mL de água destilada, 0,5 mL de reagente Folin (Chem-Lab©) e 2 mL de carbonato de sódio (NaCO_3 , 10 %). Deixou-se a incubar durante 30 minutos e leu-se a absorvância a 760 nm, em espectrofotómetro (Biochrom Libra S4).

2.2.3 Determinações aplicadas aos subprodutos resultantes da preparação do extrato de licopeno

2.2.3.1 Azoto Total

Determinou-se o teor de azoto nas amostras de filtrado, com base na norma ISO 5663:1984. As amostras foram sujeitas a digestão com H_2SO_4 concentrado (> 95% v/v), na presença de catalisador (Zn e Se), até apresentarem uma coloração transparente ou amarelo pálido. Após a digestão a solução foi filtrada e transferida para um balão de 100 mL, lavando bem o tubo com água ultrapura. Após a diluição retirou-se uma massa de amostra para determinação do fósforo total, sendo a restante para determinação do Azoto Kjeldahl.

Posteriormente, procedeu-se à alcalinização do digerido ácido com NaOH e levou-se o digerido alcalinizado a destilar sob uma corrente de vapor (Tecator Kjeltex System 1002 Distilling Unit), para uma solução indicadora de ácido bórico. As soluções de ácido bórico contendo NH_4^+ foram posteriormente tituladas com ácido sulfúrico (0,02 N).

Cada amostra foi analisada em triplicado, tendo o teor de azoto sido calculado de acordo com a seguinte equação:

$$g(N/L) = 0,02 \times V \times 0,014 \times 1000 \times \left(\frac{V_a}{V_b \times V_c} \right) \dots \dots \dots \text{Equação} \\ 2.6$$

Onde,

V = Volume, em mililitro, de titulante gasto;

V_a = Volume, em mililitro; de amostra digerida utilizada na destilação

V_b = Volume, em mililitro, do balão onde está a amostra digerida;

V_c = Volume, em mililitro, da amostra para digestão.

2.2.3.2 Fósforo total

O fósforo foi calculado com base no procedimento descrito pela norma ISO 6878:2004, com algumas adaptações. Para determinação do fósforo (P) no filtrado de tomate foram utilizadas as amostras previamente digeridas com 10 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado e mistura catalisadora. Após

a digestão lavou-se o tubo de digestão com água ultrapura e perpez-se a 100 mL. O teor de fósforo nas amostras foi quantificado por espectrofotometria (Biochrom Libra S4) em meio alcalino (NaOH 6N), na presença de agente redutor e água ultrapura.

Cada amostra foi analisada em triplicado. O teor de fósforo nas amostras foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$mg(P/L) = x \times \left(\frac{V_{bal\tilde{a}o}}{V_a \times V_b} \right) \dots \dots \dots \text{Equação 2.7}$$

Onde,

x = valor, em miligrama, obtido da equação da reta;

V_a = volume, em mililitro, de amostra usado para a digestão;

V_b = volume, em mililitro, de amostra do digerido;

V_{balão} = volume, em mililitro, do balão onde se colocou o digerido.

2.2.3.3 Açúcares totais

O cálculo do teor de açúcares totais presentes nas amostras de filtrado realizou-se através da técnica de Munson e Walker (NP 1419, 1998), adaptada.

Tarou-se o cadinho filtrante, de porosidade 3, em estufa a 103 ± 2 °C durante 30 minutos. Pesou-se, em balança analítica (ADAM® Nimbus), uma massa de amostra e transferiu-se para um balão de 100 mL, adicionando cerca de 25 mL de água. Adicionaram-se 6,5 mL de solução da solução de Carrez I (150 g K₄Fe(CN)₆.3H₂O/L) e 6,5 mL da solução de Carrez II (300 g ZnSO₄.H₂O/L). Perpez-se o volume do balão com água destilada e filtrou-se após a formação de um precipitado branco.

Para determinar o teor de açúcares totais utilizaram-se 50 mL do filtrado obtido e 3,5 mL de ácido clorídrico concentrado (HCL, 37%). Colocou-se em banho de água a 69 ± 1°C, mantendo o balão exatamente 5 minutos após o líquido nele contido tivesse atingido aquela temperatura. Neutralizou-se a solução com hidróxido de sódio (NaOH, 30 g/100mL) em presença de indicador de fenolftaleína e acidificou-se com HCl, 3,7%. Adicionou-se a um volume V₁ 25 mL de solução de sulfato de cobre (69,278 g CuSO₄.5H₂O/L) e 25 mL da solução alcalino tartárica ((346 g KNaC₄H₄O₆.H₂O + 100 g NaOH)/L). Colocou-se em aquecimento até à ebulição, mantendo-a por 2 minutos, posteriormente, filtrou-se a vácuo, em cadinho filtrante (preparado anteriormente). Por fim, lavou-se o óxido cuproso com água quente, 10 mL de álcool etílico e com 10 mL de éter etílico. Secou-se o cadinho em estufa a 103 ± 2 °C, por 30 minutos. Arrefeceu-se em exsiccador e pesou-se.

O teor de açúcares totais presentes nas amostras analisadas é expresso em açúcar invertido, em % em massa, através da seguinte equação:

$$\text{Açúcares totais (\%)} = \frac{40 \times m_t}{V_1 \times m} \dots \dots \dots \text{Equação 2.8}$$

Onde,

m = massa, em grama, da toma para análise;

mt = massa, em grama, de açúcar invertido que corresponde à massa de óxido cuproso obtido.

V1 = volume, em mililitro, do filtrado obtido após defecação e inversão.

2.2.3.4 Peso seco/ humidade

Determinou-se o peso seco do filtrado e o teor de humidade presente nas amostras de bagaço de tomate não tratado, bagaço de tomate tratado com acetona e filtrado de tomate através de uma adaptação do método 2540B/2011 – Standard Methods for Examination of Water and Wastewater).

Marcaram-se os cadinhos e colocaram-se em estufa a 105 ± 2 °C, durante 1 hora. Deixaram-se arrefecer em exsiccador, pesaram-se em balança analítica (ADAM® Nimbus) e adicionou-se, por pipeta graduada 5 mL ou 1,5 g de amostra (conforme tipologia da amostra). Levaram-se os cadinhos com amostra à estufa a 105 ± 2 °C durante 12 horas. Passaram-se os cadinhos para exsiccador até arrefecerem e pesaram-se em balança analítica (ADAM® Nimbus).

O peso seco do filtrado calculou-se de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Sólidos totais (mg/L)} = \frac{(A-B) \times 1000}{V} \dots\dots\dots \text{Equação 2.9}$$

Onde,

A = massa, em grama, do cadinho com amostra após ter ido à estufa;

B = tara do cadinho, em grama;

V = volume da amostra, em mililitro.

A humidade presente nas amostras de bagaço foi calculada com base na seguinte equação:

$$\text{Humidade (\%m/m)} = \frac{m_{\text{água}}}{m_{\text{amostra húmida}}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Equação 2.10}$$

Onde,

m amostra húmida = massa da amostra, em grama, antes de ir à estufa;

m água = massa de água da amostra, em grama.

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

O bagaço de tomate é uma fonte abundante de licopeno, um metabolito com elevado valor nutracêutico que se concentra predominantemente na pele do tomate e que, portanto, apresenta uma concentração no bagaço de tomate que ultrapassa a respetiva concentração no fruto inteiro (Agarwal & Rao, 2000; Ranveer *et al.*, 2013). O bagaço de tomate é um resíduo agro-industrial produzido em quantidades substanciais (Silva-Beltrán *et al.*, 2015; Machmudah *et al.*, 2012) mas que apresenta algumas limitações à sua valorização como fonte de licopeno. Uma das principais dificuldades na utilização do bagaço de tomate como matéria-prima para a extração de licopeno são as quantidades elevadas de água de vegetação do tomate que contém, o que impõe grandes restrições à transferência do licopeno (um metabolito apolar), para solventes como hexano ou éter de petróleo. O elevado teor de água do bagaço de tomate limita também o seu transporte desde o local de produção para unidades de valorização a alguma distância, pois acarreta um dispêndio elevado de combustível para transportar maioritariamente água (~ 80%); também o seu armazenamento apresenta limitações de tempo e temperatura pois a disponibilidade de água e substratos como açúcares ou ácidos orgânicos provoca a sua rápida degradação pela flora microbiana natural (Boon *et al.*, 2010).

Assim, o principal objetivo deste trabalho foi encontrar uma metodologia que permitisse o processamento rápido do bagaço de tomate, promovendo a sua estabilização em condições que inibissem o crescimento microbiano e que favorecessem a recuperação do licopeno. Para atingir este objetivo, estudou-se a extração do licopeno a partir de tomate ou do respetivo bagaço por diferentes metodologias que incluíram operações unitárias de dispersão/emulsificação, filtração, centrifugação, extração sólido-líquido e extração líquido-líquido, tendo-se iniciado os testes pelos processos mais simples.

No desenvolvimento destas metodologias de extração procurou-se respeitar os princípios da simplicidade e eficiência dos processos, bem como a sua sustentabilidade e em particular, não utilizar solventes do tipo hidrocarboneto, minimizar a produção de resíduos e valorizar os subprodutos. Os principais critérios utilizados para avaliar cada método foram a concentração de licopeno obtida, o rendimento de extração e outras características complementares como o tempo de extração, as características do solvente ou o número de operações unitárias envolvidas.

Na maior parte dos ensaios utilizou-se como solvente a acetona devido às suas características particulares de ter uma boa capacidade de dissolução do licopeno (Phiney *et al.*, 2017) e simultaneamente ser miscível com água. Outras propriedades vantajosas adicionais deste solvente são o facto de ter um ponto de ebulição inferior ao do hexano ou éter de petróleo (Smallwood, 1996), facilitando a sua recuperação, não formar misturas azeotrópicas com a água (Gjineci, 2016) e não apresentar contaminações de resíduos aromáticos como o benzeno ou xilenos, como ocorre frequentemente com os solventes do tipo hidrocarboneto (Eilerts, n.d.)).

Finalmente, procurou-se desenvolver uma abordagem artesanal, que pudesse ser implementada num lagar artesanal de pequena ou média dimensão, partindo-se não de bagaço de tomate, mas sim de tomate inteiro. Este largar artesanal teria um perfil semelhante ao da empresa que forneceu as

amostras de azeite (Azeites Tojeira), sendo que poderia pretender fortificar azeite com licopeno recorrendo a tomate da sua própria produção.

A Tabela 3.1 mostra o tipo de matriz utilizada e as operações unitárias desenvolvidas em cada um dos métodos experimentais.

Tabela 3.1 – Identificação dos métodos desenvolvidos e principais características.

Código de Método	Matriz Utilizada	Operações unitárias
Método A	Bagaço de Tomate	1. Emulsificação; 2. Filtração; 3. Secagem
Método B1	Tomate	1. Trituração do tomate; 2. Filtração e prensagem; 2. Dispersão do bagaço de tomate em acetona; 3. Filtração; 4. Extração do resíduo a frio; 5. Filtração; 6. Eliminação do solvente
Método B2	Tomate	1. Trituração do tomate; 2. Dispersão do bagaço de tomate em acetona; 3. Filtração; 4. Extração <i>Soxhlet</i> ; 5. Eliminação do solvente
Método C1	Bagaço de Tomate	1. Extração <i>Soxhlet</i> ; 2. Eliminação do solvente
Método C2	Bagaço de Tomate	1. Dispersão em acetona; 2. Filtração; 3. Extração <i>Soxhlet</i> ; 4. Eliminação do solvente
Método C3	Bagaço de Tomate	1. Dispersão em acetona; 2. Filtração; 3. Extração a refluxo; 4. Filtração; 5. Eliminação do solvente

Alguns dos métodos referidos acima apresentaram ainda algumas variantes segundo opções de escolha de solvente ou da utilização de diferentes lotes de matéria-prima.

O método A visou a transferência direta do licopeno para o azeite pois apesar da presença da água a grande solubilidade do licopeno em matrizes apolares como o azeite poderia permitir esta transferência sem recurso ao uso de solventes orgânicos.

Os métodos B1 e B2 envolveram a trituração do tomate e filtração por pano de algodão e prensagem do resíduo para reduzir o tamanho de partícula, homogeneizar a matriz tomate e remover uma quantidade substancial da água de vegetação; esperava-se assim que na subsequente dispersão do resíduo de tomate em acetona a transferência do licopeno fosse facilitada pelo menor teor de água.

No método B1 efetuou-se a extração a frio com acetona, para testar esta abordagem mais simples e económica.

No método B2 pretendeu-se verificar se a extração *Soxhlet* (extração a quente) permitia obter melhores resultados do que na extração a frio (método B1).

Os métodos C1, C2 e C3, partiram de bagaço de tomate preparado por centrifugação de tomate inteiro e utilizaram sempre uma operação de extração a quente.

No método C1 testou-se a extração *Soxhlet* do bagaço húmido com acetona, para verificar se este solvente tinha a capacidade de nos primeiros ciclos de extração remover a água e de seguida remover o licopeno.

Nos métodos C2 e C3, efetuou-se um passo prévio de remoção de água por dispersão em acetona seguido de um passo de extração a quente com acetona, respetivamente por extração *Soxhlet* e por extração a refluxo.

A comparação entre extração *Soxhlet* e extração a refluxo visou avaliar se o aquecimento da matriz, mais pronunciado no caso da extração a refluxo tem um efeito favorável ou desfavorável na transferência do licopeno para o solvente de extração.

3.1 Transferência de licopeno de bagaço de tomate para azeite por emulsificação (Método A)

O método A (transferência de licopeno de bagaço de tomate húmido para o azeite por emulsificação) visou, como foi referido, testar a transferência direta de licopeno da matriz para o azeite. Uma vez que a matriz apresenta alguma suscetibilidade ao aquecimento, este foi evitado para prevenir a eventual degradação dos seus constituintes. Contudo, a emulsificação do extrato no azeite possibilitou o contacto com o ar atmosférico, podendo ter havido oxidação da matriz.

A emulsificação direta do bagaço de tomate em azeite revelou um rendimento de extração de 4,9 mg de licopeno/100 g de bagaço húmido, o que poderá dever-se à afinidade do licopeno com matrizes apolares como o azeite (Strati & Oreopoulou, 2011). De notar que a transferência ocorreu na presença de uma matriz com mais de 90% de água o que ilustra a grande solubilidade do licopeno no azeite

Nestas condições obteve-se uma concentração de licopeno no azeite de 9,9 mg/L, o que apesar de ser suficiente para produzir uma alteração na tonalidade do azeite (Figura 3.1) foi bastante inferior ao valor obtido por Garrido e colaboradores (2012) que produziram um azeite enriquecido em licopeno com 350 mg licopeno/ L azeite. A razão para esta diferença prende-se com o facto de no processo de extração A, se ter realizado a emulsificação do bagaço de tomate húmido diretamente no azeite enquanto Garrido e colaboradores, extraíram o licopeno por contacto direto entre o azeite e polpa de tomate desidratada. Este processo é efetivamente mais eficiente no que se refere à transferência do licopeno para o azeite mas implica o consumo de uma quantidade substancial de energia para garantir a evaporação da água presente no bagaço.

Não se considerou a hipótese de proceder à emulsificação de bagaço previamente seco em estufa porque, para além de poder ocorrer a degradação térmica do licopeno (Knockaert *et al.*, 2012), os elevados teores de açúcar e proteína do bagaço de tomate favorecem reações de caramelização (reações de Maillard), que alteram a estrutura da matriz e podem limitar a extração do licopeno.

O processo de desidratação do bagaço de tomate geralmente exige também o recurso a pressão reduzida, para acelerar a remoção da água, dificultada pela presença de quantidades importantes de açúcares simples que formam pontes de hidrogénio com a água dificultando a sua evaporação; a pressão reduzida também permite a evaporação da água a uma temperatura inferior a 100 °C e assim limita fenómenos como a já referida caramelização dos açúcares presentes na matriz.

Pelas razões acima apontadas, não se tentaram desenvolver metodologias que envolvessem a desidratação térmica do bagaço de tomate, mas sim otimizar processos de extração alternativos, que permitissem obter eficiências comparáveis, mas a partir de bagaço de tomate húmido.

No Método A, a separação entre o azeite e a fase aquosa fez-se por decantação após um período de repouso e ainda se incluiu após a separação de fases, uma etapa de tratamento do azeite com um agente secante (sulfato de sódio anidro), para garantir que a água transferida para o azeite durante a emulsificação era eliminada; estes passos de secagem com um agente secante e filtração conferem maiores custos e complexidade a este método e nas condições utilizadas não foram completamente eficientes pois, após alguns dias, surgiu um aroma desagradável no azeite fortificado que foi atribuído à proliferação de microrganismos, possível na presença de alguma água residual.



Figura 3.1 - Amostra de azeite enriquecido diretamente com bagaço de tomate.

3.2 Extração de Licopeno a partir de tomate inteiro (Método artesanal)

A extração de licopeno a partir de tomate inteiro foi desenvolvida numa perspetiva de utilização por produtores de azeite, tipicamente artesanais, que pretendessem efetuar a extração de licopeno a partir de tomate produzido para esse efeito.

A extração de licopeno a partir de tomate inteiro foi estudada de acordo com dois métodos alternativos, B1 (figura 3.2) e B2 (figura 3.3), que se distinguiram por algumas das operações unitárias utilizadas. Estas metodologias pretenderam desenvolver uma abordagem tradicional, valorizando o tomate como um todo e considerando o seu processamento a partir do fruto inteiro.

Ambos os métodos se iniciam por um passo de trituração do fruto inteiro, homogeneização e filtração por pano de algodão; esta filtração tem que ser auxiliada por prensagem do filtro de pano contendo o resíduo para auxiliar à separação da água de vegetação. No passo seguinte, o resíduo da filtração (bagaço de tomate) que ainda contém cerca de 90% de água, é disperso em acetona e sujeito a

homogeneização mecânica para favorecer a remoção de água; o volume de acetona foi ajustado até se atingir uma proporção de volume de acetona para massa de bagaço de tomate de 1 mL de acetona/g de tomate (ph), que impede a solvatação apropriada das proteínas do tomate por moléculas de água; quando esta interação é perturbada as proteínas desnaturam, libertando muita água de solvatação e alterando significativamente a textura e propriedades do bagaço de tomate. Em particular, observou-se que até atingir esta proporção crítica de acetona: água, o bagaço de tomate triturado mantém uma viscosidade que impede a separação entre solução e sólidos suspensos, fazendo com que o passo de filtração subsequente seja muito mais lento. Quando se ultrapassa este valor limite do volume de acetona, a inserção de acetona na esfera de solvatação das proteínas, a variação da força iónica do meio, ou ambos os fatores provocam a alteração da estrutura terciária das proteínas e a filtração torna-se muito mais rápida e eficiente, pois as ligações de moléculas de água com a matriz tomate são fortemente reduzidas.

A filtração da massa de tomate triturada foi efetuada por pano de algodão (pano crú) pois é um material utilizado em processamento artesanal de produtos alimentares como o queijo ou o requeijão, e permite uma separação rápida entre o sólido (massa de tomate) e o líquido (filtrado); no entanto, dada o seu diâmetro de orifícios do pano as partículas mais pequenas da polpa precipitada passam com o filtrado, mas representam uma fração reduzida da massa total precipitada.

O líquido filtrado contém a água de vegetação do tomate bem como alguma polpa e pode ser diretamente incluído em alimentação animal ou humana; no entanto dada a sua riqueza em açúcares e outros nutrientes deve ser rapidamente utilizado ou estabilizado por pasteurização caso se pretenda armazená-lo para utilização posterior.

Após a dispersão do bagaço de tomate em acetona também o líquido filtrado contém alguma água de vegetação, água de solvatação dos componentes do fruto e ainda a acetona adicionada bem como açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos que são solúveis em água e em misturas de água com acetona. Este filtrado, na forma em que é recolhido é bastante estável porque a presença de acetona impede a proliferação de microrganismos. Uma fração da acetona (cerca de 26 % v/v) perde-se por evaporação durante a filtração a vácuo subsequente, porque laboratorialmente esta filtração é efetuada à temperatura ambiente e em sistema aberto, mas num processo a uma escala piloto ou industrial, pode efetuar-se esta separação de fases num sistema fechado e com refrigeração apropriada para garantir a recuperação quase total da acetona adicionada. Por exemplo, no passo de eliminação da acetona, que é realizado por destilação simples, à pressão atmosférica as perdas de acetona oscilaram entre 0,7% (v/v) e 3,7% (v/v) mesmo sem refrigerar o recipiente de recolha e efetuando a condensação a cerca 15°C.

O líquido remanescente após a evaporação da acetona é uma solução aquosa rica em nutrientes, que foi caracterizada de forma poder sugerir processos adequados à sua valorização (seção 3.6.1).

Como foi referido, os dois métodos B1 e B2 distinguem-se pelo método de extração aplicado ao bagaço de tomate tratado pela dispersão em acetona, extração a frio com acetona no caso do método B1 e extração *Soxhlet* com acetona no caso do método B2.

Foi também avaliada a quantidade de fibra de tomate remanescente após esse passo de extração. Este resíduo sólido contém quantidades significativas de pectina (fibra solúvel), as sementes ricas em óleo vegetal polinsaturado e alguma celulose das paredes celulares vegetais (fibra insolúvel). Este é, portanto, um material com um valor nutricional e nutracêutico que pode ser valorizado como aditivo na alimentação humana.

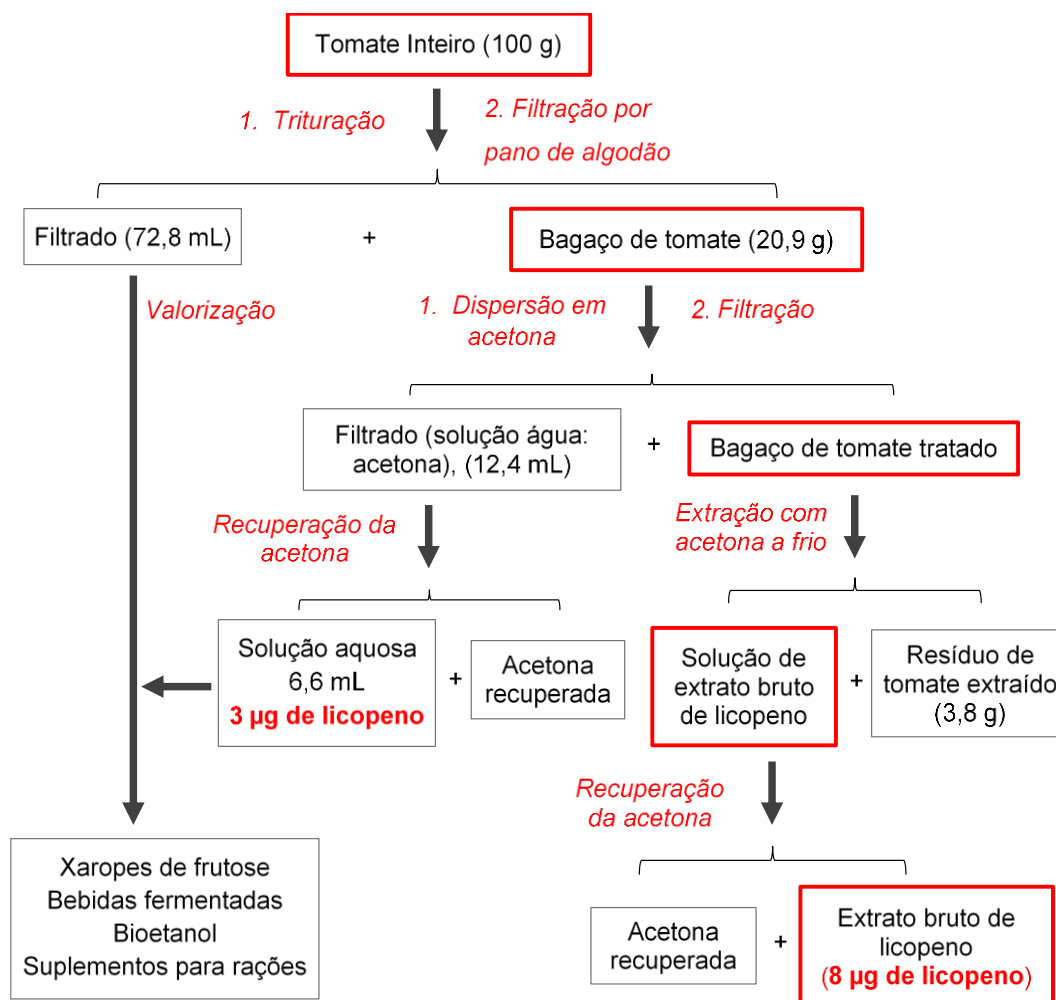


Figura 3.2 - Esquema ilustrativo das operações unitárias realizadas para o método B1.

Os produtos finais recuperados através deste método a partir de 100g de tomate fresco são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Produtos obtidos a partir de 100 g de tomate pelo método B1.

100 g de tomate		
Solução aquosa com nutrientes (mL)	Resíduo de tomate extraído (g, ph)	Massa de licopeno (µg)

84,8	3,8	8
------	-----	---

A presença de cerca de 33% de água no extrato bruto proveniente da extração com acetona a frio poderá ter limitado a extração a partir do bagaço tratado.

Como a extração a frio envolveu um único passo de extração, ou seja, uma extração simples, decidiu-se comparar este procedimento com uma extração múltipla, a quente, efetuando a extração *Soxhlet* do bagaço tratado (Método B2).

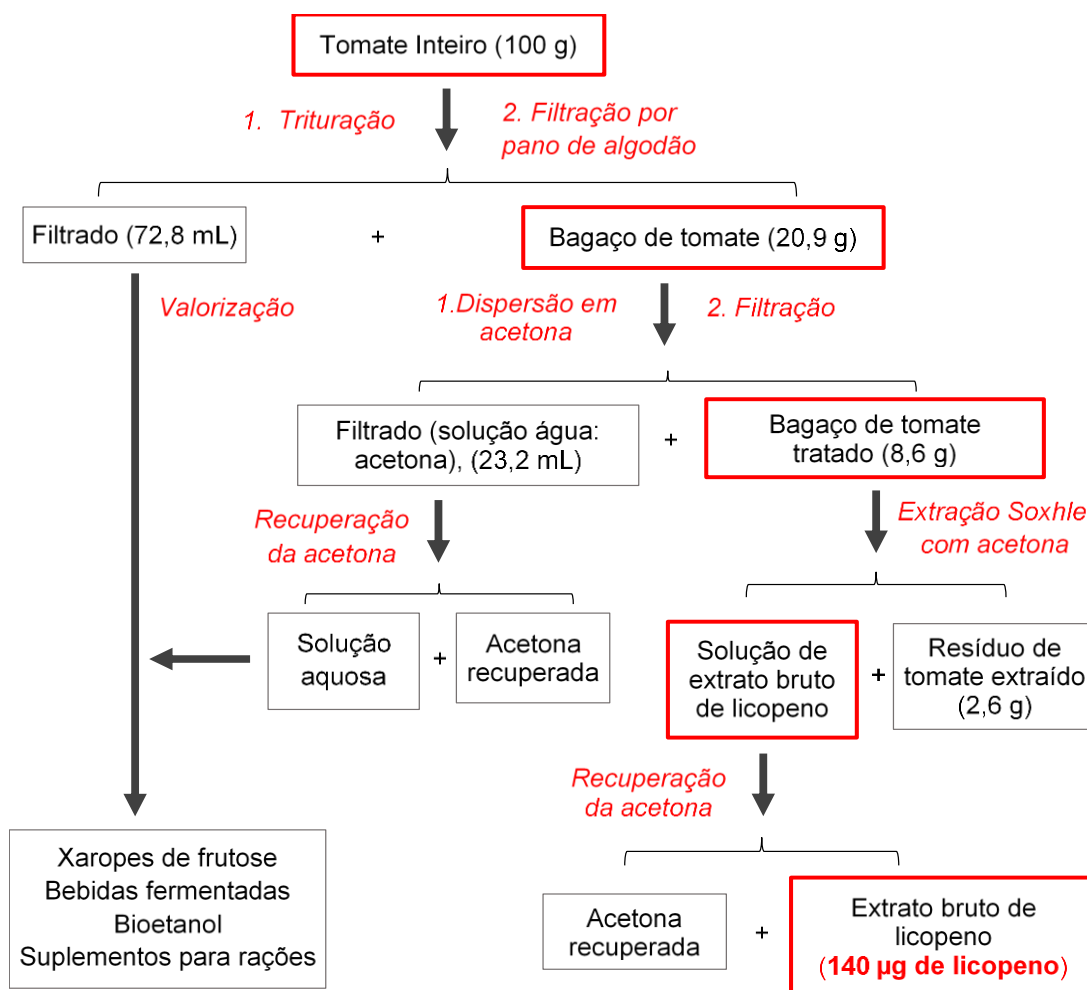


Figura 3.3 – Esquema ilustrativo das operações unitárias realizadas para o método B2.

A extração a quente através do método *Soxhlet* promove um contacto sucessivo do bagaço de tomate tratado com acetona em cada ciclo de extração, ficando a água e o licopeno extraídos no balão de extração enquanto a acetona circula entre o balão e o extrator. Desta forma nos primeiros ciclos de extração a acetona dissolve a água presente no bagaço tratado trazendo-a para o balão e nessas condições dissolve pouco licopeno; no entanto, à medida que o bagaço de tomate vai ficando desidratado a acetona contacta com a matriz numa forma cada vez mais isenta de água, pelo que consegue dissolver bastante mais licopeno. Os ciclos de extração foram prosseguidos durante um

período de cerca de 3h até se comprovar visualmente que o bagaço de tomate tinha uma cor esbranquiçada indicando que o licopeno presente no bagaço tinha sido totalmente extraído. Os produtos obtidos com o método B2 apresentam-se na Tabela 3.3 e pode observar-se que a quantidade de licopeno extraído aumentou bastante relativamente ao método B1 (extração simples a frio) quando a extração foi realizada a partir da mesma massa de bagaço de tomate húmido (tabelas 3.2 e 3.3).

Tabela 3.3 – Produtos obtidos a partir de 100 g de tomate, com o método B2.

100 g de tomate		
Solução aquosa com nutrientes (mL)	Resíduo de tomate extraído (g, ph)	Massa de licopeno (µg)
77,0	2,6	140

A aplicação de extração a frio com solvente orgânico permite apenas a saída da água presente e de uma quantidade residual de carotenoides, enquanto no método B2, a extração múltipla e o aquecimento terão possibilitado uma extração de licopeno mais eficiente. O método B2 requer um aquecimento prolongado (3h) mas a uma temperatura moderada (cerca de 53°C) o que pode ser facilmente assegurado por uma fonte de energia renovável como energia solar tornando o processo bastante sustentável. As variações no resíduo de bagaço extraído resultam de flutuações no processo de dispersão em acetona e filtração para isolamento do bagaço, durante os quais pode haver maior ou menor separação entre polpa e pele. No entanto, a polpa não retida no passo de filtração pode ser recuperada mais tarde a partir da solução aquosa com nutrientes, que é a fase na qual será retida. Submetendo todo o filtrado a uma filtração adicional, sob vácuo, mas utilizando papel de filtro, foi possível recolher toda a polpa de tomate em suspensão, e submetê-la a extração Soxhlet com acetona até recuperar todo o licopeno presente nesta polpa residual, tendo-se obtido quantidades inferiores a 5 µg, para uma quantidade inicial de tomate de 100g.

A solução aquosa com nutrientes contém uma variedade de nutrientes como açúcares, ácidos orgânicos e componentes minerais que suportam o crescimento de microrganismos pelo que é um meio líquido adequado a processos fermentativos; assim pode ser valorizada como substrato para produção de uma bebida fermentada ou de etanol. Esta solução pode ainda ser utilizada como suplemento para rações animais desde que consumida de imediato, pois a sua riqueza de nutrientes não permite o seu armazenamento prolongado, mesmo refrigerada.

Por outro lado, dado que é um líquido rico em açúcares presentes na água de vegetação do tomate e extraídos da sua polpa sabe-se que deverá ter percentagens elevadas de frutose, um açúcar com menor índice glicémico que a glucose. Assim uma aplicação possível deste líquido é a sua desidratação parcial para produzir um xarope de glucose e frutose, um produto com interesse para o sector alimentar.

3.3 Extração de Licopeno a partir de bagaço de tomate (Método industrial)

A extração de licopeno a partir de bagaço de tomate produzido nas indústrias de processamento deste fruto foi designada como processo industrial pois corresponderia a uma valorização deste resíduo agroindustrial para produção de subprodutos de valor acrescentado.

Este processo foi estudado segundo três métodos alternativos C1 (figura 3.4), C2 (figura 3.5) e C3 (figura 3.6) que tal como nos métodos anteriores se distinguiram por algumas das operações unitárias utilizadas. A extração de licopeno através de bagaço de tomate baseia-se na utilização das metodologias *Soxhlet* e refluxo que usam a temperatura como auxiliar de extração e a acetona como solvente.

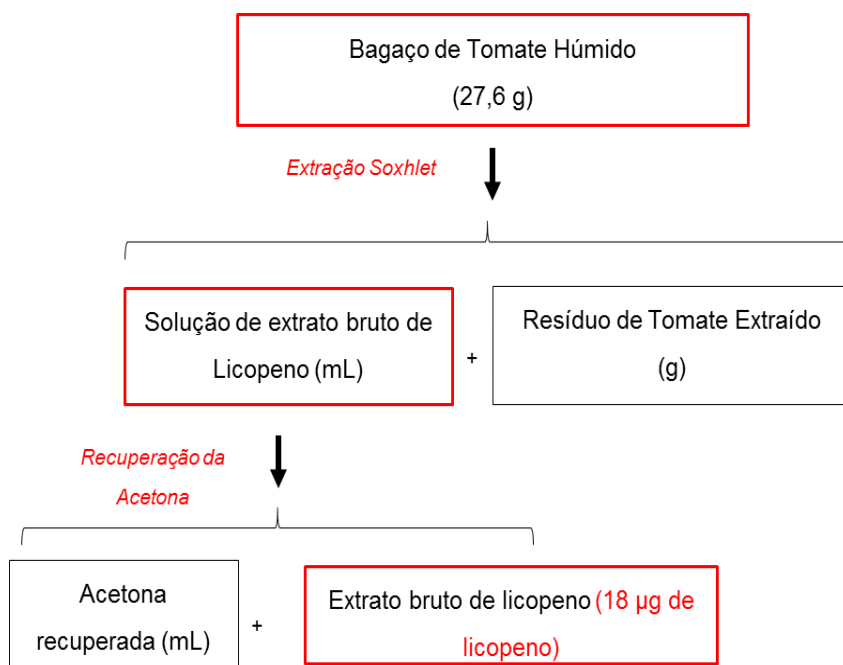


Figura 3 4- Esquema ilustrativo das operações unitárias realizadas para o método C1.

Tabela 3 4- Produtos obtidos a partir de 100 g de tomate, com o método C1.

100 g de tomate		
Solução aquosa com nutrientes (mL)	Resíduo de tomate extraído (g, p sa)	Massa de licopeno (µg)
-	-	18

A figura 3.5 mostra as operações unitárias realizadas para obtenção de licopeno através de extração *Soxhlet* com dispersão inicial do bagaço de tomate húmido.

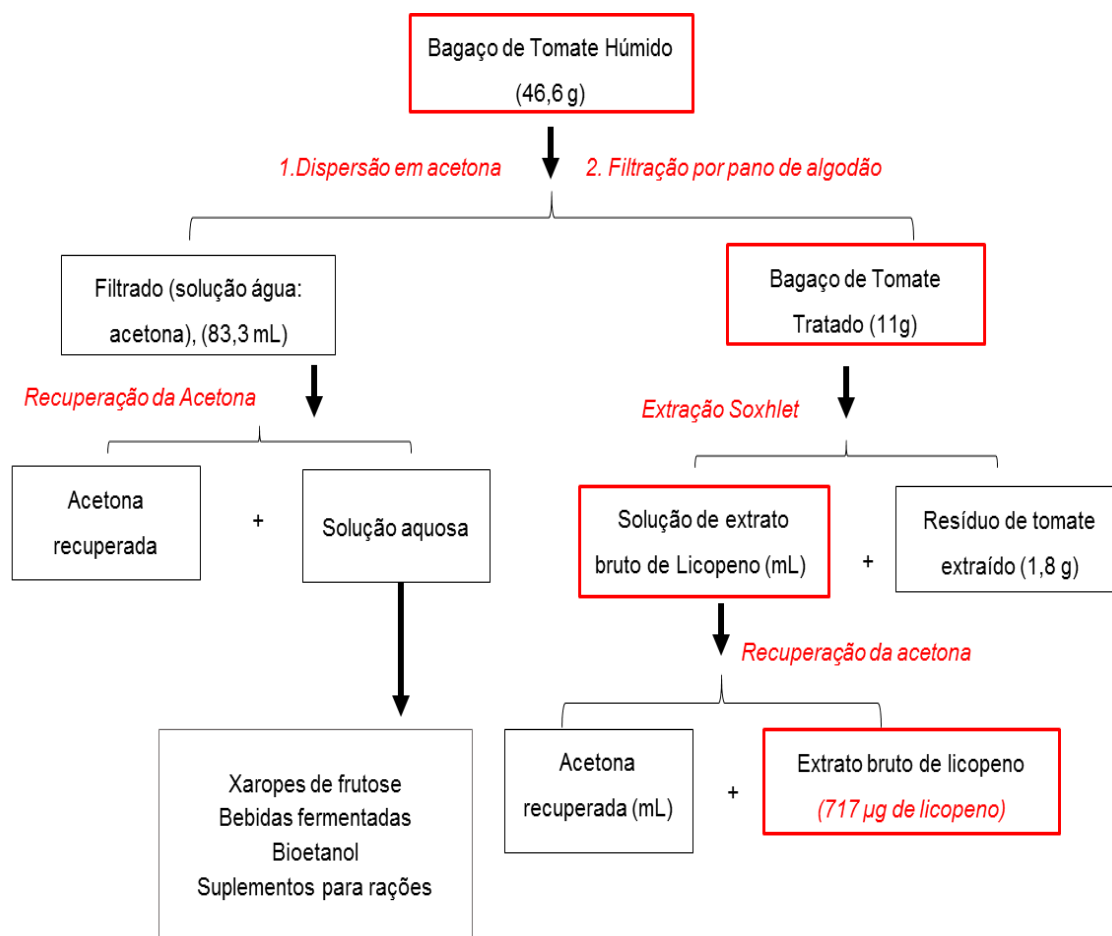


Figura 3 5- Esquema ilustrativo das operações unitárias realizadas para o método C2.

A extração *Soxhlet* que utiliza dispersão inicial do bagaço de tomate foi mais eficiente na extração de licopeno do que quando não é usada dispersão inicial do bagaço de tomate (tabelas 3.4 e 3.5). A dispersão inicial da matriz em acetona terá permitido a saída da maior parte da água presente. A existência de água em pequenas quantidades na matriz permite que durante não hajam interferências da água. Isto acontece porque a acetona é um solvente polar permitindo numa primeira fase a extração da água (polar) e a respetiva precipitação das proteínas constituintes, possibilitando uma eficiente extração do licopeno. Uma vez que o acetato de etilo é considerado um solvente ideal para extrair o licopeno (Rath, 2007) testou-se também a eficiência de extração deste solvente,

O acetato de etilo extraiu 5/10 vezes menos licopeno do que a acetona, porque apesar de ser mais apolar e, portanto, ter uma boa capacidade de dissolução de licopeno é imiscível com água, pelo que não têm a mesma capacidade que a acetona. Para além disso verificou-se diferença na massa de licopeno obtida para ambas as extrações com acetona, o que poderá dever-se à diferença nos lotes de tomate utilizados. A quantidade de licopeno poderá ser diferente entre lotes de tomate (tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Produtos obtidos a partir de 100 g de tomate, com o método C2.

100 g de tomate fresco				
Método/Solvente de extração	Lote	Solução aquosa de nutrientes (mL)	Resíduo de tomate extraído (g, p, sa)	Massa de licopeno (mg)
C2.1/Acetona	2	-	1,6	460
C2.2/Acetato de Etilo	3	-	2,3	74
C2.3/Acetona	3	25,1	1,8	709

O método *Soxhlet* torna-se excessivamente moroso e energeticamente exigente, pois os ciclos de extração têm a duração aproximada de 4 horas. Por outro lado, possibilitaria a degradação térmica da matriz, uma vez que períodos mais longos do que 1 hora de extração induzem a isomerização do licopeno (conversão *cis-trans*) (Ho *et al.*, 2015). Por forma a reduzir o tempo de extração testou-se a extração do licopeno a refluxo. A extração a refluxo permite o contacto direto da matriz com o solvente de extração (acetona) e reduz a duração da extração para 2 a 3 ciclos de 15 minutos. As operações unitárias realizadas encontram-se descritas na figura 3.6.

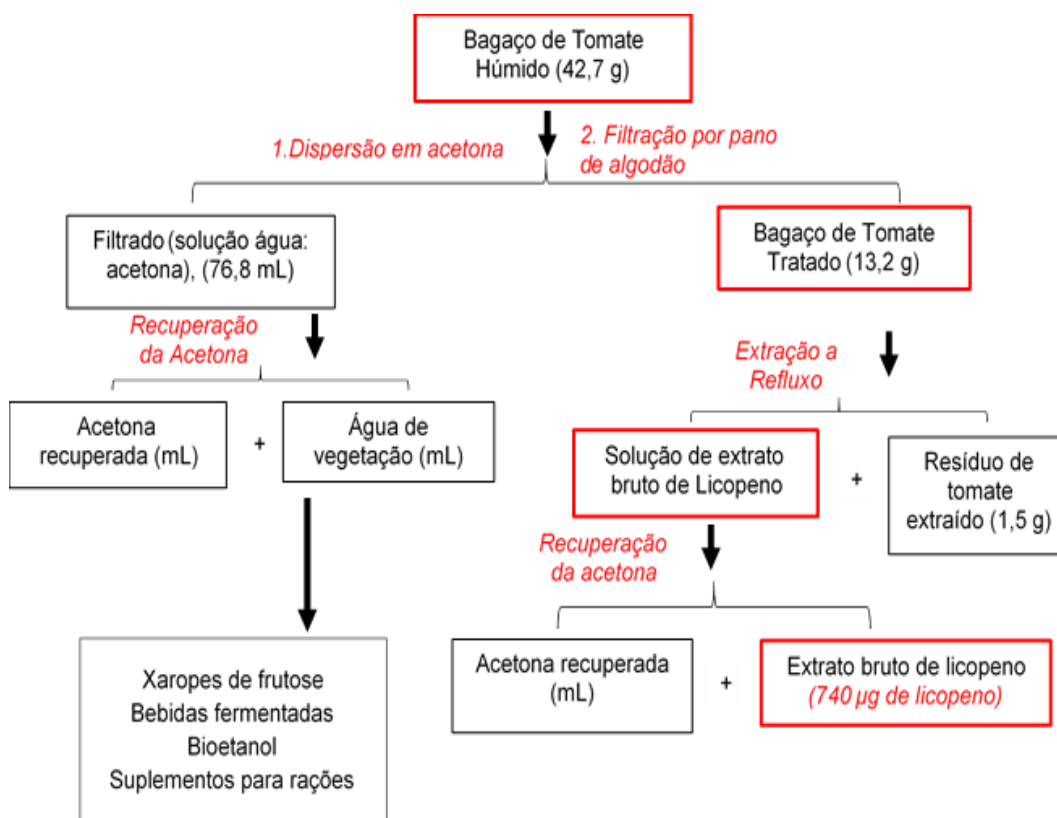


Figura 3.6 - Esquema ilustrativo das operações unitárias realizadas para o método C3.

Pela análise das tabelas 3.5 e 3.6, os resultados revelam uma performance superior da tecnologia de extração a refluxo comparativamente com a extração *Soxhlet*, tendo-se obtido 0,709 mg de licopeno

e 1,45 mg de licopeno, respetivamente. A par do que aconteceu para o método C2, neste também se verificaram diferenças na massa de licopeno obtida para os diferentes lotes de tomate usados. A exposição direta da matriz ao calor e respetivo contacto direto com o solvente terão permitido a disrupção das membranas celulares do bagaço de tomate (Fielding *et al.*, 2005) e melhoria da sua solubilidade (Ho *et al.*, 2015) facilitando a migração de licopeno para o solvente. A elevada relação solvente/ bagaço de tomate terá permitido uma migração de carotenoides para o solvente de forma quase imediata. A posterior evaporação da acetona, que teve como objetivo garantir a inocuidade do extrato, revelou-se um processo relativamente fácil e rápido de executar.

Tabela 3.6 - Produtos obtidos a partir de 100 g de tomate, com o método C3.

100 g de tomate fresco				
Método	Lote	Solução aquosa de nutrientes (mL)	Resíduo de tomate extraído (g, p, sa)	Massa de licopeno (µg)
C3.1	3	12,8	1,5	1450
C3.2	4	12,0	1,3	740

Os rendimentos de extrato mais elevados foram obtidos para o método B1, os quais poderão ter sido favorecidos pela elevada relação solvente/resíduo de tomate húmido utilizada. Esta superioridade verificou-se para todos os parâmetros de rendimento de extrato obtidos e os rendimentos mais baixos foram obtidos para o método em que se testou a extração de licopeno a frio (B1) (tabela 3.7). A concentração de licopeno nos extratos mais elevada foi obtida para ambas os ensaios relativos à extração a refluxo e, tal como seria expectável, verificou-se a concentração mais baixa para a extração de licopeno a frio (tabela 3.7).

Os rendimentos de licopeno mais baixos foram, mais uma vez, obtidos para o ensaio de extração de licopeno a frio, bem como a extração *Soxhlet* de bagaço de tomate húmido, que se revelou ineficiente. Os valores de rendimento de licopeno mais elevados pertencem aos ensaios C2.3 e C3.1, que se referem a uma extração *Soxhlet* e a uma extração a refluxo, respetivamente. Nestes ensaios foi utilizado o mesmo lote de tomate, o qual poderia conter um teor de licopeno superior aos restantes (tabela 3.8).

A fibra de tomate representa o resíduo de tomate extraído após a evaporação total do solvente de extração. Os rendimentos de fibra de tomate mais elevados foram 57,71g/100 g de tomate fresco e 44,65g/100 g de tomate fresco, em peso após a evaporação do solvente (tabela 3.8). Ambos os valores se referem a extrações *Soxhlet*. Neste tipo de extração a matriz fica isolada do solvente, uma vez que se encontra no interior de um cartucho, ao contrário da extração a refluxo em que a matriz se encontra em contacto direto com o solvente. Este contacto direto favorecerá a perda de fibra de tomate porque antes da evaporação do solvente este terá que ser filtrado, podendo haver perdas de fibra de tomate durante esta operação.

Tabela 3.7 – Resultados de rendimentos de extração de licopeno obtidos para as diferentes frações de tomate, em peso húmido e em pesos sem acetona, e respetivas concentrações de licopeno, considerando os métodos de extração de testados.

Ensaio	Rendimento de extrato (g/ 100g)						Concentração de licopeno no extrato (mg/g)
	Tomate		Bagaço de tomate		Bagaço tratado		
	Ph	P,sa	Ph	P,sa	Ph	P,sa	
B1	0,011	0,662	0,0529	0,814	-	-	0,18
B2	0,30	18,01	1,44	22,15	9,55	22,75	0,47
C1	-	-	-	-	-	-	-
C2.1	0,29	17,55	0,87	13,33	2,53	6,02	1,57
C2.2	0,1	6,12	0,3	4,65	0,91	2,16	0,69
C2.3	0,34	20,05	0,99	15,22	2,88	6,85	2,28
C3.1	0,24	14,25	0,51	7,87	2,10	4,99	6,10
C3.2	0,17	9,93	0,39	6,01	1,37	3,26	3,88

Tabela 3.8 – Resultados de rendimentos de licopeno obtidos para as diferentes frações de licopeno, em peso húmido e em peso sem acetona, e respetivo rendimento de fibra de tomate em peso húmido e peso seco, considerando os métodos de extração testados

Ensaio	Rendimento de licopeno (mg/100 g)						Rendimento de fibra de tomate (g/100 g)	
	Tomate		Bagaço de tomate		Bagaço tratado		Tomate fresco	
	Ph	P,sa	Ph	P,sa	P,sa	P,sa	Ph	P,sa
B1	0,01	0,66	0,05	0,81	-	-	1,58	94,48
B2	0,14	8,46	0,68	10,41	4,49	10,69	1,1	65,9
C1	0,02	1,09	0,07	1,01	-	-	-	-
C2.1	0,46	27,49	1,36	20,87	3,96	9,43	0,66	39,45
C2.2	0,07	4,45	0,22	3,38	0,66	1,58	0,96	57,71
C2.3	0,71	42,41	1,52	23,43	6,08	14,48	0,75	44,65
C3.1	1,45	86,97	3,12	48,03	12,80	30,47	-	-
C3.2	0,65	38,70	1,52	23,45	5,33	12,70	0,60	35,67

3.4 Caracterização funcional dos extratos de licopeno

Os extratos de licopeno preparados ao longo deste trabalho foram caracterizados quanto à sua capacidade antioxidante, através dos testes de redução férrica (FRAP) e de atividade anti-radicalar (DPPH). A caracterização funcional dos extratos de licopeno, para além de permitir avaliar a capacidade antioxidante, permite também a comparação dos extratos com o azeite fortificado com os respetivos extratos.

3.4.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante de uma amostra pode ser exercida através de diferentes mecanismos, com características físico-químicas distintas. Não existe nenhuma metodologia que abranja todos os mecanismos antioxidantes de um sistema, por isso foram utilizados diferentes ensaios de avaliação da capacidade antioxidante, de modo que fosse possível obter informação de forma mais realista. O teste FRAP realizado aos extratos de licopeno extraído do bagaço de tomate através de refluxo mostrou uma capacidade antioxidante de 0,32 mM de equivalentes de Sulfato Ferroso por litro de extrato (tabela 3.9). A atividade antirradicalar dos extratos testados obtida foi 16,20 mg de equivalentes de Trolox por litro de extrato (tabela 3.9).

Tabela 3.9 – Resultados obtidos para os testes de atividade antioxidante (FRAP e DPPH) aplicados aos extratos de licopeno.

Teste	Teor nos extratos
FRAP (mM ESF/L)	0,32
DPPH (mg ET/L)	16,20

3.5 Fortificação do azeite com licopeno e caracterização funcional do azeite fortificado

O azeite fornecido pela empresa “Azeites Tojeira” foi fortificado com extratos de licopeno, sendo que este poderá exercer atividade antioxidante máxima ao nível das membranas celulares e respetiva interação com os componentes lipídicos, devido à sua forte afinidade com matrizes lipídicas. (Agarwal & Rao, 2000). O azeite fortificado foi, posteriormente, caracterizado quanto ao teor de compostos fenólicos totais, através do método Folin-Ciocalteu e quanto à atividade antioxidante, através dos testes FRAP e DPPH. Mostrou-se relevante caracterizar tanto os extratos incorporados no azeite como o próprio azeite fortificado, uma vez que é importante compreender o comportamento antioxidante do extrato na presença do azeite.

3.5.1 Concentração de licopeno

Após a produção dos extratos procedeu-se à fortificação do azeite. O azeite foi fortificado com os extratos de licopeno provenientes da extração a refluxo do bagaço de tomate. A transferência do licopeno para o azeite fez-se por emulsificação do mesmo no extrato de licopeno. Por forma a averiguar a passagem do licopeno para o azeite, calculou-se a sua concentração após emulsificação, tendo-se obtido 15,2 µg de licopeno por litro de azeite, partindo de 0,91 g de extrato bruto de licopeno.

3.5.2 Análise de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu

A determinação do teor de compostos fenólicos foi realizada através da aplicação do Folin-Ciocalteu, tendo os resultados sido expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por litro de azeite. Para que fosse possível considerar como negligenciáveis as interferências causadas por outros compostos presentes na matriz, que não fossem os que se pretendia estudar, fez-se um ensaio em branco. Este ensaio consistiu na utilização de um solvente adequado em detrimento da amostra.

Procedeu-se à determinação do teor de compostos fenólicos totais presentes nas amostras de azeite sem fortificação (azeite virgem extra) e nas amostras de azeite fortificado com extrato de licopeno obtido por extração a refluxo. A determinação do teor de compostos fenólicos totais nas duas amostras permite avaliar o comportamento do extrato de licopeno, quanto à sua composição fenólica, na presença do azeite.

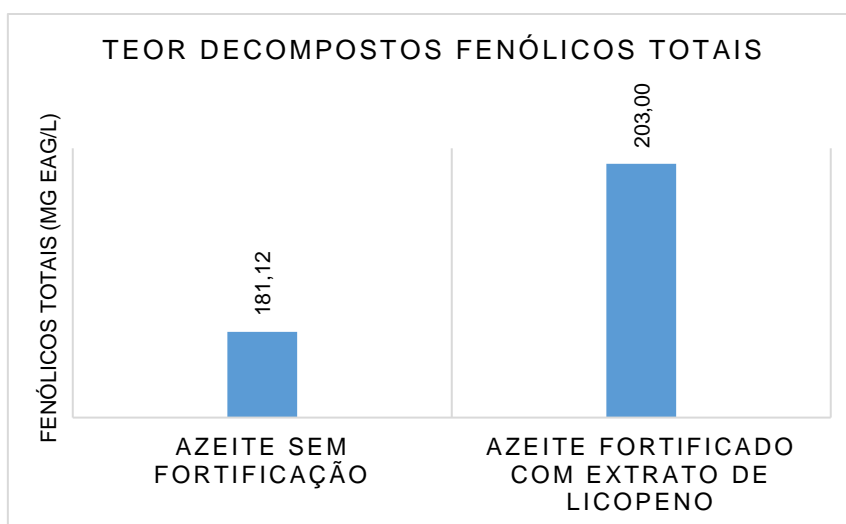


Figura 3.7 - Resultados obtidos para o teste de Folin-Ciocalteu do azeite sem fortificação e do azeite fortificado com extrato de licopeno.

Os resultados obtidos mostram que o teor de compostos fenólicos no azeite fortificado com licopeno é superior ao azeite sem fortificação (figura 3.7). Tal como seria expectável existe diferença entre as amostras analisadas. Embora o azeite virgem extra seja rico em compostos antioxidantes, especialmente compostos fenólicos lipofílicos e hidrofílicos (El Riachy *et al.*, 2011), a adição de extrato

de licopeno parece melhorar ligeiramente o teor de compostos fenólicos no azeite. O extrato de licopeno isoladamente não apresenta, aparentemente, um teor de compostos fenólicos relevante, mas a sua incorporação no azeite poderá melhorar a sua biodisponibilidade e, conseqüentemente o aumento composição fenólica do azeite.

3.5.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método FRAP

A avaliação da capacidade antioxidante através do método FRAP consistiu na avaliação da atividade de redução do Fe(III) a Fe(II) pelos compostos antioxidantes presentes na amostra. A determinação foi feita em meio ácido (pH 3,6), podendo obter-se uma coloração azul intensa, a uma absorvância máxima de 593 nm.

O poder de redução férrica (FRAP) foi medido no azeite sem fortificação e no azeite fortificado com extrato de licopeno obtido da extração a refluxo de bagaço de tomate. Esta determinação permitiu comparar a capacidade antioxidante do extrato de licopeno isoladamente e na presença de azeite, bem como a diferença entra o azeite simples e o azeite fortificado com extrato de licopeno. Os resultados obtidos para o teste FRAP são expressos em mM de equivalentes de Sulfato Ferroso (ESF) por litro de azeite. A fortificação de azeite com extrato de licopeno melhora a capacidade antioxidante da matriz (figura 3.8).

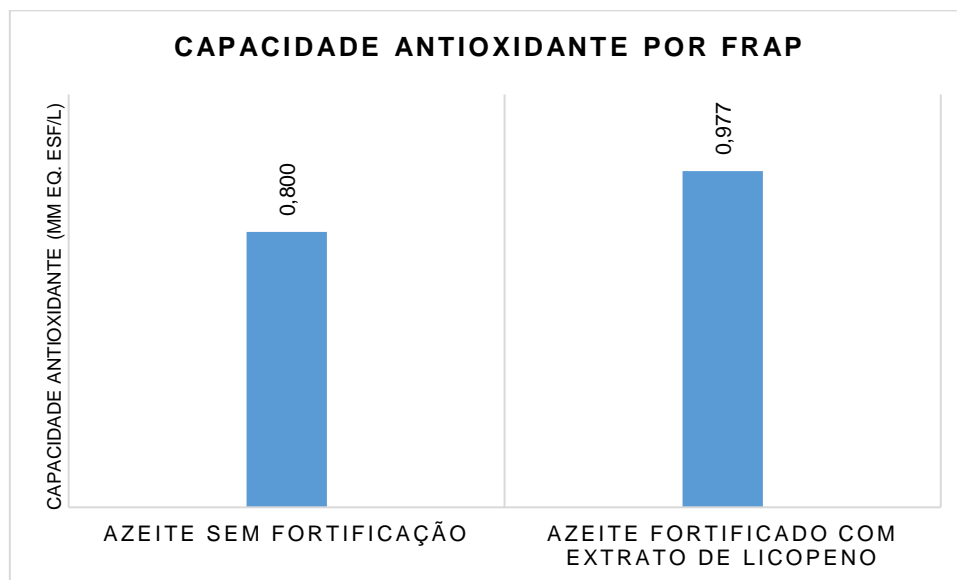


Figura 3.8 - Resultados obtidos para o teste FRAP do azeite sem fortificação e do azeite fortificado com extrato de licopeno.

O conhecimento do potencial antioxidante em alimentos *in vitro* não indica estritamente a sua capacidade *in vivo*, uma vez que esta é afetada por diversos fatores, entre eles, a biodisponibilidade. Alguns antioxidantes são absorvidos, transportados e retidos em locais específicos das células, tecidos e fluidos biológicos (Niki, 2010). Quando incorporado na alimentação humana o azeite fortificado com

licopeno poderá ter um potencial antioxidante diferente do obtido nos estudos realizados. Garrido e colaboradores (2013) avaliaram a capacidade antioxidante urinária, após a ingestão de azeite enriquecido com licopeno, em humanos. Os autores concluíram que inclusão de licopeno em azeite virgem extra melhora as propriedades antioxidantes do azeite e a sua biodisponibilidade no organismo humano.

3.5.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH

No teste de redução do radical DPPH a maior capacidade antioxidante é dada pelo decréscimo na concentração de equivalentes Trolox (ET). Tal como para os métodos de avaliação da capacidade antioxidante supramencionados, para o método DPPH também foram medidos os diferenciais entre o azeite simples e o azeite fortificado com extrato de licopeno extraído de bagaço de tomate através de refluxo. Os resultados obtidos revelam que a adição de extrato de licopeno ao azeite se traduz numa melhoria da capacidade antioxidante, ou seja, o azeite fortificado com extrato de licopeno apresenta uma capacidade sequestradora de radicais livres superior ao azeite não fortificado.

Ao contrário do que aconteceu no teste FRAP, neste teste os extratos de licopeno mostraram um poder antioxidante superior ao de qualquer um dos azeites analisados (16,20 mg ET/L). Os resultados sugerem que os extratos apresentam uma capacidade anti-radicalar mais elevada do que qualquer uma das amostras de azeite. Por outro lado, os extratos de licopeno foram incorporados no azeite a frio pelo que a sua biodisponibilidade poderá ser baixa.

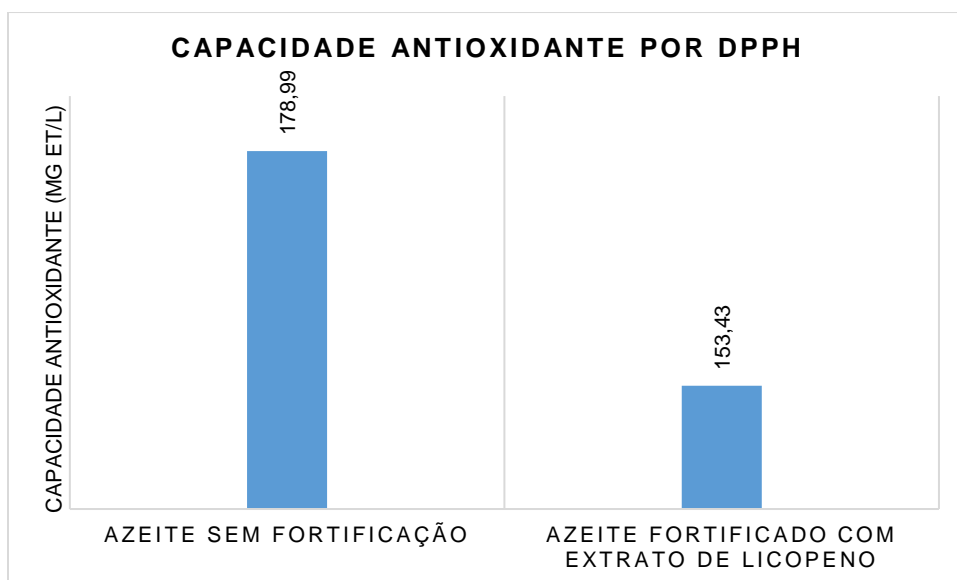


Figura 3.9 – Resultados obtidos para o teste DPPH do azeite sem fortificação e do azeite fortificado com extrato de licopeno.

3.6 Valorização dos sub-produtos

Ao longo do processo da preparação dos diversos extratos de licopeno obtiveram-se subprodutos que incluem a água de vegetação resultante da evaporação da acetona após a dispersão do bagaço de tomate e a pectina, que é o resíduo sólido obtido após evaporação do solvente presente no bagaço de tomate. Estes subprodutos foram caracterizados de acordo com parâmetros que se consideraram relevantes tendo em conta a sua valorização, tornando a produção de extrato de licopeno com sustentável do ponto de vista ambiental.

3.6.1 Caracterização das soluções aquosas (água de vegetação) resultantes do tratamento do bagaço de tomate

Após a dispersão do bagaço de tomate fresco com acetona para remover a água em excesso e promover a desnaturação das proteínas obtém-se um filtrado que contém o solvente de extração (acetona), água de vegetação e diversos compostos polares dissolvidos, em particular, açúcares, ácidos orgânicos e componentes minerais, entre outros. Estes componentes estavam presentes na água de vegetação do tomate ou na sua polpa e são extraídos pela solução de acetona água durante a etapa de dispersão do bagaço.

Procurou-se identificar os principais compostos presentes nesta solução, não só devido ao valor económico atribuído, mas também devido à possibilidade de excesso de nutrientes na matriz, que impossibilitará a sua descarga para as massas de água sem qualquer tratamento prévio.

A acetona utilizada na dispersão pode ser recuperada quase totalmente, por destilação simples uma vez que se trata de um solvente com um ponto de ebulição bastante inferior à água e que não azeótropos com este líquido.

Por cada 100 g de bagaço de tomate húmido aos quais se adicionaram 150 mL de acetona, recuperou-se 180 a 200 mL de filtrado, contendo x% de água residual.

Foi possível eliminar a acetona por destilação simples com um rendimento de recuperação de $73,8 \pm 5,5\%$ (v/v); a acetona que não foi recuperada volatilizou-se sobretudo durante a filtração a vácuo pois a acetona, quando colocada a baixa pressão evapora facilmente mesmo à temperatura ambiente. Estas perdas poderão ser evitadas num sistema à escala industrial efetuando esta filtração noutras condições e nomeadamente em sistema fechado.

A solução aquosa residual obtida após a eliminação da acetona foi caracterizada quanto ao seu peso seco, teor de açúcares totais, teor de fósforo total e teor azoto total. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 3.10.

Tabela 3.10 – Resultados obtidos para humidade, açúcares totais, fósforo total e azoto total do filtrado.

Parâmetro	Teor no filtrado
Peso seco (g/100 mL)	3,99
Açúcares Totais (g/100 cm³)	5,32
Fósforo total (mg/L)	136,49
Azoto total (g/L)	0,0063

3.6.2 Rendimento de fibra de tomate

A fibra de tomate considerada é o produto resultante do bagaço de tomate utilizado para extração do licopeno, e evaporação total do solvente. Os rendimentos obtidos para a fibra de tomate apresentam-se na tabela 3.11.

Tabela 3.11 – Resultados obtidos para os rendimentos de fibra de tomate.

Rendimento fibra (g/100 g de bagaço de tomate centrifugado)	Rendimento fibra (g/100 g de tomate)
7,20	1,20

O rendimento obtido tendo em consideração o bagaço de tomate utilizado é superior ao rendimento em massa de tomate porque, a massa de tomate é sempre superior à massa de bagaço utilizada.

3.6.3 Humidade do bagaço de tomate

Foram determinados os teores de humidade para o bagaço de tomate sem tratamento e para o bagaço de tomate tratado com acetona. Os resultados obtidos encontram-se expressos na tabela 3.12.

Tabela 3.12 – Resultados obtidos para os teores de humidade presentes no bagaço de tomate com e sem tratamento com acetona.

Condição (bagaço de tomate)	Humidade (% m/m)
Sem tratamento	6,5
Tratamento com acetona	17

O bagaço de tomate sem tratamento com solvente orgânico apresenta um teor de humidade inferior ao bagaço de tomate tratado com acetona. Esta diferença pode dever-se ao rompimento das células da matriz pela ação da acetona, que levou a uma maior libertação de água presente no bagaço de tomate.

Capítulo 4 – Conclusão e desenvolvimentos futuros

A incorporação direta do extrato de licopeno representa uma mais-valia, uma vez que ambas as matrizes apresentam propriedades benéficas para a saúde humana. Tem-se verificado um interesse crescente das populações em novos produtos que incluam uma componente nutricional e nutracêutica, para além disso o licopeno apresenta melhor absorção no organismo humano quando se encontra em contacto com matrizes lipídicas. Durante o desenvolvimento deste trabalho foram testadas diferentes metodologias de extração de licopeno a partir de bagaço de tomate ou de tomate triturado. Foram testadas formas de incorporação direta no azeite, extração de licopeno a quente e a frio.

O método, em que foi utilizada acetona como solvente, apresentou-se como o melhor em matéria de rendimento de licopeno. Considerou-se a extração a refluxo mais vantajosa do que a extração *Soxhlet* devido ao menor consumo de energia, duração da extração, uma vez que o menor tempo de extração limita a degradação térmica do licopeno; obtiveram-se concentrações elevadas de licopeno aquando da utilização desta metodologia.

A concentração de licopeno presente nos extratos e no azeite fortificado foi, finalmente, avaliada através de espectrofotometria visível, a um comprimento de onda de 503 nm. A atividade antioxidante do azeite fortificado com extrato de licopeno, avaliada através dos métodos FRAP e DPPH, mostrou-se superior à obtida nos extratos brutos de licopeno (para os mesmos métodos). O azeite fortificado apresentou um teor em compostos fenólicos elevado, o qual foi obtido através do teste de Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos para o teste de sequestração do radical DPPH nos azeites não correspondeu ao que seria expectável: o azeite sem fortificação apresenta valores de atividade antioxidantes superiores ao azeite fortificado com extrato de licopeno, 178,99 mg ET/L e 153,43 mg ET/L, respetivamente.

Os subprodutos obtidos da produção de extrato de licopeno, o filtrado e a fibra de tomate, poderão ser valorizados e reintegrados num sistema de produção. O filtrado poderá complementar rações animais, uma vez que, apresenta teores nutricionais importantes, especialmente fósforo (136,49 mg/L) e açúcares (5,32 g/100 cm³), por outro lado numa escala mais tradicional, poderá ser utilizado como água de regadio para diversas culturas. A polpa de tomate apresenta um teor de fósforo (19,07 mg/kg) e açúcar (2,66 % m/m) inferior ao obtido para o filtrado, embora o conteúdo em azoto total seja superior (1,72 g/100 g). A polpa de poderá ser incorporada em pasta de azeitona, um produto que pode ser utilizado para barrar no pão ou para utilizar como tempero culinário, permitindo aliar as propriedades nutricionais e nutracêuticas do azeite e do tomate num único produto. A fibra de tomate que é o resíduo sólido obtido do bagaço de tomate após completa evaporação do solvente orgânico utilizado na extração de licopeno, poderá ser utilizado como fibra na forma bruta para ser incorporado em gelatinas em pó, em polpa de tomate para melhorar a consistência ou em qualquer produto que necessite de obter uma consistência específica.

Referências Bibliográficas

- Agarwal, S. and A. V. Rao. 2000. "Tomato Lycopene and Its Role in Human Health and Chronic Diseases." *CMAJ: Canadian Medical Association journal* 163(6):739–44. Disponível: (<http://www.cmaj.ca/content/163/6/739.abstract>).
- Amirante, P. L. Di Giovacchino and G. C. Di Renzo. 1992. *citado in* Harwood, John and R. Aparicio.(Eds.).2000. *Handbook of Olive Oil: Springer Science + Business Media*.Sevilha ISBN 978-1-4419-5194-6.
- Arscott, Sara A. and Sherry A. Tanumihardjo. 2010. "Carrots of Many Colors Provide Basic Nutrition and Bioavailable Phytochemicals Acting as a Functional Food." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9(2):223–39.
- Arscott, S. A. 2010. "Food Sources of Carotenoids" *in*: Tanumihardjo, S. A. (Ed.) "Carotenoids and Human Health": *Humana Press*. ISBN 978-1-62703-202-5.
- Azbar, N., A. Bayram, A. Felibeli, A. Muezzinoglu, F. Sengul and A. Ozer 2004. "A Review of Waste Management Options in Olive Oil Production." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 34(3):209–47.
- Bauernfeind, J. C. 1972. "Carotenoid Vitamin A Precursors and Analogs in Foods and Feeds", incluído em Symposium on the chemical aspects of nutrition needs. *Journal of agricultural and food chemistry* 20(3):456–73.
- Bauernfeind, J. C., C. R. Adams and W. L. Marusich. 1981.*in*: Bauernfeind, J. C. 1981. "Carotenoid as Colorants and Vitamin Percursors. - Technological and Nutritional Applications": *Academic Press*. ISBN 0-12-082850-2.
- Ben-Hassine, Kaouther, A. Taamalli, S. Ferchichi, A. MlaouGah, C. Benincasa, E. Romano, G. Flamini, A. Lazzez, N. Grati-kamoun, E. Perri, D. Malouche and M. Hammami. 2013. "Physicochemical and Sensory Characteristics of Virgin Olive Oils in Relation to Cultivar, Extraction System and Storage Conditions." *Food Research International* 54(2):1915–25. Disponível: (<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.007>).
- Bohm, V., N. L. Puspitasari-Nienaber, M. G. Ferruzzi, and S. J. Schwartz. 2002. "Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of Different Geometrical Isomers of α -Carotene, β -Carotene, Lycopene, and Zeaxanthin." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(1):221–26.
- Boon, Caitlin S., D. Julian McClements, Jochen Weiss, and Eric a Decker. 2010. "Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods." *Critical reviews in food science and nutrition* 50(6):515–32.
- Boskou, Dimitrios. 2006. *Olive Oil - Chemistry and Technology*. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598039>).
- Bostou, D. "Phenolic Compounds in Olives and Olive Oil" *in* Boskou, D.(Ed.) 2009. "*Olive Oil - Minor Constituents and Health*": *CRC Press*. Londres. ISSN 978-1-4200-5993-9.
- Britton, G., S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander. "A Healthy Debate" *in* Britton, G., S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander.(Eds.) 2009. "*Carotenoids - Volume 5: Nutrition and Health*": *Birkhäuser Verlag Birkhäuser Verlag*. ISBN 978-3-7643-7500-3.
- Britton, G. and F. Khachik 2009 "Carotenoids in food" *in*: Britton, G., S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander.(Eds.) *Carotenoids - Volume 5: Nutrition and Health: Birkhäuser Verlag Birkhäuser Verlag*.

ISBN 978-3-7643-7500-3.

- Carrasco-Pancorbo, A, L. Cerretani, A. Bendini, A. Segura-Carretero, M. del Carlo, T. Gallina-Toschi, G. Lercker, D. Compagnone and A. Fernández-Gutiérrez. 2005. "Evaluation of the Antioxidant Capacity of Individual Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(23):8918–25.
- Casas, Rosa, E. Sacanella, and R. Estruch. 2014. "Mediterranean Diet and Cancer: Epidemiological Evidence and Mechanism of Selected Aspects." *Nutrition and cancer* 10(4):1–16. Disponível: (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2010.07.025><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20432162><http://ebn.bmj.com/cgi/doi/10.1136/eb-2012-100831>npapers3://publication/doi/10.1136/eb-2012-100831[nAvailable in localholdings_kf at Nursing Standard](http://nAvailable.in.localholdings_kf.at/NursingStandard)[nAvailable fr](http://nAvailable.fr)).
- Castelo-Branco, V.N. and A.G. Torres. 2011. "Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos" *Revista de Nutrição* 24(1):173–87. Disponível: (http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732011000100017&script=sci_arttext&tlng=pt).
- Cerretani, L., A. Bendini, A. Del Caro, A. Piga, V. Vacca, M. F. Caboni, T. G. Toschi. 2006. "Preliminary Characterisation of Virgin Olive Oils Obtained from Different Cultivars in Sardinia." *European Food Research and Technology* 222(3-4):354–61.
- Civantos, L. 1999 *citado in* P. Vossen. 2007. "Olive Oil: History, Production, and Characteristics of the World's Classic Oils." *HortScience* 42(5):1093–1100.
- Chasse, G.A., M.L. Mak, E. Deretey, I. Farkas, L.L. Torday, J.G. Papp, D.S.R. Sarma, A. Agarwal, S. Chakravarthi, S. Agarwal, A.V. Rao. 2001. "An ab initio computational study on selected lycopene isomers". *Journal of Molecular Structure Theochem* 571:27–37.
- Clinton, S.K. 1998. "Lycopene: Chemistry, Biology, and Implications for Human Health and Disease." *Nutrition Reviews* 56(2):35–51. Disponível: (<http://nutritionreviews.oxfordjournals.org/content/56/2/35.abstract>).
- Clodoveo, M.L. and R.H. Hbaieb. 2013. "Beyond the Traditional Virgin Olive Oil Extraction Systems: Searching Innovative and Sustainable Plant Engineering Solutions." *Food Research International* 54(2):1926–33. Disponível: (<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.014>).
- Clodoveo, M.L., R.H. Hbaieb, F. Kotti, G.S. Mugnozza, and M. Gargouri. 2014. "Mechanical Strategies to Increase Nutritional and Sensory Quality of Virgin Olive Oil by Modulating the Endogenous Enzyme Activities." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(2):135–54.
- Codex Alimentarius, 2013 (última revisão). Codex Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils. *Codex Stan 33-1981*;
- COI, Concelho Oleícola Internacional. 2003 - "Tabela de composição de ácidos gordos presentes no azeite" *in*: Boskou, D. (Ed.). 2006. *Olive Oil - Chemistry and Technology*. 2ª edição, AOCS Press. Illinois. Disponível: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598039>).
- ⁽²⁾ COI, Concelho Oleícola Internacional. 2015 - "Tabela de Produção Mundial de Azeite (1990/2016)".
- ⁽³⁾ COI, Concelho Oleícola Internacional. 2015 - "Tabela de Produção de Azeite na Europa (1991-2016)".
- Decreto-Lei nº560/99, de 18 de dezembro. - "Estabelece as regras relativas à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios destinados ao consumidor final". *Diário da República - ISérie-A* 9049-9158.

- Decreto-Lei nº113/2006, de 12 de junho. - "Estabelece as regras relativas à higiene dos géneros alimentícios". *Diário da República - I Série- A*. 4143-4148
- Decreto-Lei nº76/2010, de 24 de junho. 2010. - "Relativo às normas de comercialização do azeite". *Diário da República, 1.ª série — N.º 121*: 2253-2256.
- Demicheli, M. and L. Bontoux. 1996. "Survey on Current Activity on the Valorization of by-Products from the Olive Oil Industry." *Institute of Prospective Thecnological Studies Seville - Final Report of European Comission*.
- D 'evoli, L., G. Lombardi-Boccia. and M. Lucarini. 2013. "Influence of Heat Treatments on Carotenoid Content of Cherry Tomatoes". *Foods*, 2:352–363. Disponível: www.mdpi.com/journal/foods.
- Dewanto, V., X. Wu, K.K. Adom and R.H. Liu. 2002. "Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:3010–3014.
- Diraman, H. 2010. "Characterization by Chemometry of the Most Important Domestic and Foreign Olive Cultivars from the National Olive Collection Orchard of Turkey". *Grasas y Aceites*. 61(4):341–51.
- Diraman, H and H. Dibeklioglu. 2014. "Using Lipid Profiles for the Characterization of Turkish Monocultivar Olive Oils Produced by Different Systems." *International Journal of Food Properties* 17(5):1013–33. Disponível: (<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10942912.2012.685675>).
- Diretiva 95/45/CE da Comissão, de 25 de julho de 1995 - "Estabelece critérios de pureza específicos dos corantes que podem ser usados nos géneros alimentícios". *Jornal Oficial da União Europeia* L0045/1-42.
- Egydio, J.A., Â.M. Moraes, and Paulo T.V. Rosa. 2010. "The Journal of Supercritical Fluids Supercritical Fluid Extraction of Lycopene from Tomato Juice and Characterization of Its Antioxidation Activity." *Journal of Supercritical Fluids journal*. 54:159–64.
- Eilerts, N., Hydrocarbon Solvent Solutions. *Ecosolv Drycleaning Fluid*. Disponível: (<http://www.cpchem.com/bl/specchem/en-us/Documents/SolventsforDryClean.pdf>)
- Fiedor, J. and K Burda. 2014. "Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease." *Nutrients* 6(2):466–88.
- Fielding, J.M., K.G. Rowley, P. Cooper, and K. O'Dea. 2005. "Increases in Plasma Lycopene Concentration after Consumption of Tomatoes Cooked with Olive Oil." *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 14(2):131–36.
- Fish, W.W., P. Perkins-Veazie,. and J.K. Collins. 2002. A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15:309–317. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157502910690>.
- Frankel, Edwin N. 2011. "Nutritional and Biological Properties of Extra Virgin Olive Oil." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(3):785–92.
- Friedman, Mendel. 2013. "Anticarcinogenic, Cardioprotective, and Other Health Benefits of Tomato Compounds Lycopene, Alpha-Tomatine, and Tomatidine in Pure Form and in Fresh and Processed Tomatoes." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(40):9534–50.
- Fuhrman, Bianca, N. Volkova, M. Rosenblat, and M. Aviram. 2000. "Lycopene Synergistically Inhibits LDL Oxidation in Combination with Vitamin E, Glabridin, Rosmarinic Acid, Carnosic Acid, or

- Garlic." *Antioxidants and Redox Signaling*. 3(2):491-606.
- Gann, P.H., J. Ma, E. Giovannucci, W. Willett, F.M. Sacks, C.H. Hennekens, M.J. Stampfer. 1999. "Lower Prostate Cancer Risk in Men with Elevated Plasma Lycopene Levels : Results of a Prospective Analysis" 59(1):1225–1230.
- García-González, D.L., R. Aparicio-Ruiz, and R. Aparicio. 2008. "Virgin Olive Oil - Chemical Implications on Quality and Health." *European Journal of Lipid Science and Technology* 110(7):602–7.
- García-González, D.L. and R. Aparicio. 2011. "Olive Oil - Edible Oil Processing." *AOCS Lipid Library*.1–12. Disponível: (<http://lipidlibrary.aocs.org/OilsFats/content.cfm?ItemNumber=40333>)
- Garrido, M., D. González-Flores, A.M. Marchena, E. Prior, J. García-Parra, C. Barriga and A.B.R. Moratinos. 2013. "A lycopene-enriched virgin olive oil enhances antioxidant status in humans". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(8), pp.1820–1826.
- Gaté, L., J. Paul, G.N. Bal, K.D. Tew, and H. Tapierol. 1999. "Dossier : Oxidation and Antioxidizing Agents Oxidative Stress Induced in Pathologies : The Role of Antioxidants." *Biomed & Pharmacother (Ldl)*:169–80.
- Di Giovacchino, L., M. Solinas, and M. Miccoli. 1994. "Effect of Extraction Systems on the Quality of Virgin Olive Oil." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71(11):1189–94.
- Di Giovacchino, L., S. Sestili, and D. Di Vincenzo. 2002. "Influence of Olive Processing on Virgin Olive Oil Quality." *European Journal of Lipid Science and Technology* 104(9-10):587–601.
- Di Giovacchino, L. "Technological Aspects" citado in: Harwood, John and R. Aparicio.(Eds.).2000. *Handbook of Olive Oil: Springer Science + Business Media*.Sevilha ISBN 978-1-4419-5194-6.
- Giovannucci, E. 2002. "A Prospective Study of Tomato Products, Lycopene, and Prostate Cancer Risk." *Cancer Spectrum Knowledge Environment* 94(5):391–98. Disponível: (<http://jncli.oxfordjournals.org/content/94/5/391.abstract>).
- Gjineci, N., E. Boli, A. Tazani, A. Detsi, E. Voutsas. 2016. "Separation of the ethanol/water azeotropic mixture using ionic liquids and deep eutectic solvents". *Fluid Phase Equilibria*, 424:1–7. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fluid.2015.07.048>.
- Gomez-Gonzalez, S., J. Ruiz-Jimenez, and M. D. Castro. 2011. "Oil Content and Fatty Acid Profile of Spanish Cultivars During Olive Fruit Ripening." *Journal of the American Oil Chemists Society* 88(11):1737–45. Disponível: (<Go to ISI>://WOS:000297127800009).
- Goula, A.M., K.G. Adamopoulos, P.C. Chatzitakis, and V.A. Nikas. 2006. "Prediction of Lycopene Degradation during a Drying Process of Tomato Pulp." *Journal of Food Engineering* 74(1):37–46.
- Hakala, S. H. and I. M. Heinonen. 1994. "Chromatographic Purification of Natural Lycopene." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42:1314–16. Disponível: (file:///C:/Documents and Settings/ETUDIANTS/Mes documents/Articles/Lipides/hakala94.pdf).
- Harwood, John and R. Aparicio.(Eds.).2000. *Handbook of Olive Oil: Springer Science + Business Media*.Sevilha ISBN 978-1-4419-5194-6.
- Hermoso-Fernadéz. 1998 citado in Vossen, Paul. 2007. "Olive Oil: History, Production, and Characteristics of the World's Classic Oils." *HortScience* 42(5):1093–1100.
- Ho, K.K.H.Y., M.G. Ferruzzi, A.M. Liceaga, M.F. San Martín-González 2015. "Microwave-assisted extraction of lycopene in tomato peels : Effect of extraction conditions on all- trans and cis -isomer

- yields". *LWT - Food Science and Technology*, 62:160–168.
- INE - Instituto Nacional de Estatística. 2016. "Previsões Agrícolas 31 de Janeiro 2016 Produção de Azeitona Oleificada Próxima de Máximos Históricos." *Instituto Nacional de Estatística - Statistics Portugal* 1–4.
- INSA, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. 2015. "Tabela de Composição de Alimentos - Azeite". Disponível: (<http://portfir.insa.pt/foodcomp/pdf?777>).
- ISO 5663:1984 "Determination of Kjeldahl nitrogen". (última revisão e confirmação em 2012).
- ISO 6878:2004 "Determination of phosphorus"(última revisão e confirmação em 2013).
- Jones, D.P. 2006. "Extracellular Redox State: Refining the Definition of Oxidative Stress in Aging". *Rejuvenation Research*. 9(2):169-181
- Kedare, S.B. and R.P. Singh. 2011. "Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay". *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), pp.412–422.
- Kelkel, M., M. Schumacher, M. Dicato, M. Diederich. 2011. "Antioxidant and Anti-Proliferative Properties of Lycopene Antioxidant and Anti-Proliferative Properties of Lycopene." *Free Radical Research* 45(8):925-940.
- Kiritsakis, A. and W.W. Christie. 2000. "Analysis of edible oils" in Harwood, John and R. Aparicio.(Eds.).2000. *Handbook of Olive Oil: Springer Science + Business Media*.Sevilha. ISBN 978-1-4419-5194-6.
- Knockaert, G., S.K. Pulissey, I. Colle, S.V. Buggenhout, M. Hendrickx and A.V. Loey. 2012. "Lycopene degradation, isomerization and in vitro bioaccessibility in high pressure homogenized tomato puree containing oil: Effect of additional thermal and high pressure processing". *Food Chemistry*, 135(3):1290–1297. Disponível: (<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.065>).
- Kong, K.W., H.E. Khoo, K.N. Prasad, A. Ismail, C.P. Tan, N.F. Rajad. 2010. "Revealing the Power of the Natural Red Pigment Lycopene." *Molecules* 15(2):959–87.
- Krinsky, Norman I. and Kyung J. Yeum. 2003. "Carotenoid-Radical Interactions." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305(3):754–60. ISSN 1420-3049.
- Lavecchia, R. and A. Zuurro. 2008. "Improved Lycopene Extraction from Tomato Peels Using Cell-Wall Degrading Enzymes." *European Food Research and Technology* 228(1):153–58.
- Lee, M. T. and B. H. Chen. 2002. "Stability of Lycopene during Heating and Illumination in a Model System." *Food Chemistry* 78(4):425–32.
- Lin, C.H. and B.H. Chen. 2003. "Determination of Carotenoids in Tomato Juice by Liquid Chromatography." *Journal of Chromatography A* 1012(1):103–9.
- López-Alarcón, C. and A. Denicola. 2013. "Evaluating the Antioxidant Capacity of Natural Products: A Review on Chemical and Cellular-Based Assays." *Analytica Chimica Acta* 763:1–10. Disponível: (<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>).
- Lozano, Espínola. 1996. "Cambios Tecnológicos en la Extracción del Aceite de Oliva Virgen." *Alimentación, Equipos y Tecnología* 1–11.
- MacHmudah, S., Zacaria, S. Winardi, M. Susaki, N. Kusumoto, K. Hayakawa 2012. "Lycopene

- Extraction from Tomato Peel by-Product Containing Tomato Seed Using Supercritical Carbon Dioxide.” *Journal of Food Engineering* 108(2):290–96. Disponível: (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.012>).
- Maiani, G., M.J.P. Gastón, G. Catasta, E. Toti, I.G. Cambrodón, A. Bysted, F. Granado-Lorencio, B. Olmedilla-Alonso, P. Knuthsen, M. Valoti, V. Bohm, E. Mayer-Miebach, D. Behnlian and U. Schlemmer. 2009. “Carotenoids: Actual Knowledge on Food Sources, Intakes, Stability and Bioavailability and Their Protective Role in Humans.” *Molecular Nutrition and Food Research*. 53(2):194–218.
- Mailer, R. 2006. “Chemistry and Quality of Olive Oil.” *Prime facts NSW Department of Primary Industries*. 227:1–4.
- Mangas-Cruz, M.A., M. Martínez-Brocca, C. Ortiz-Leyba, J. Garnacho-Montero, J.L.P. Cunil and P.B. Garcáa-Luna. 2004. “Olive Oil in Clinical Nutrition.” *Grasas y Aceites* 55(1):76–83. Disponível: (<http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/149/149>).
- Männistö, S.I., S.A. Smith-Warner, D. Spiegelman, D. Albanes, K. Anderson, P.A. van den Brandt, J.R. Cerhan, G. Colditz, D. Feskanich, J.L. Freudenheim, E. Giovannucci, R.A. Goldbohm, S. Graham, A.B. Miller, T.E. Rohan, J. Virtamo, W.C. Willett and D.J. Hunter. 2004. “Dietary Carotenoids and Risk of Lung Cancer in a Pooled Analysis of Seven Cohort Studies.” *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 13(1):40–48. Disponível: (<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-9144260520&partnerID=40&md5=df336c541b687d4b04829df4d53a897b>).
- Matos, L.C., S.C. Cunha, J.S. Amaral, J.A. Pereira, P.B. Andrade, R.M. Seabra and B.P.P. Oliveira. 2007. “Chemometric Characterization of Three Varietal Olive Oils (Cvs. Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana) Extracted from Olives with Different Maturation Indices.” *Food Chemistry* 102(1):406–14.
- Miguel, M.G., 2007. Plantas aromáticas e medicinais como antioxidantes naturais: Métodos de análise. *Curso Teórico Prático*, 106–136.
- Mirandela, Município. n.d. “Lagares de Azeite E Produtores Do Concelho de Mirandela.” *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*.
- Moldão-Martins, M., S. Beirão-da-Costa, C Neves, C. Cavaleiro, L. Salgueiro and M.L. Beirão-da-Costa. 2004. Olive oil flavoured by the essential oils of *Mentha x piperita* and *Thymus mastichina* L. *Food Quality and Preference*, 15(5):447–452.
- Montesano, D., L. Cossignani, G. D’Arco, M.S. Simonetti and P. Damiani. 2006. “Pure Lycopene from Tomato Preserves Extra Virgin Olive Oil from Natural Oxidative Events during Storage.” *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists’ Society* 83(11):933–41.
- Morelló, J.R., M.P Romero and M.J Motilva. 2004. Effect of the maturation of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga, and Morrut cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19):6002–6009.
- Moreno, J.J. and M.T. Mitjavila. 2003. “The Degree of Unsaturation of Dietary Fatty Acids and the Development of Atherosclerosis (Review).” *Journal of Nutritional Biochemistry* 14(4):182–95.
- Naviglio, D., F. Pizzolongo, L. Ferrara, A. Aragón, and A. Santini. 2008. “Perfil de Eficacia Y Seguridad de Echinacea Purpurea En La Prevención de Episodios de Resfriado Común: Estudio Clínico Aleatorizado, Doble Ciego Y Controlado Con Placebo.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 13(2):125–35.
- Nevado, J.J.B., V.R. Robledo, and C.S. Callado. 2012. Monitoring the enrichment of virgin olive oil with

- natural antioxidants by using a new capillary electrophoresis method. *Food Chemistry*, 133(2):497–504.
- Niizu, P.Y. and D.B. Rodriguez-Amaya. 2005. "New Data on the Carotenoid Composition of Raw Salad Vegetables." *Journal of Food Composition and Analysis* 18:739–49.
- Niki, E.. 2010. "Free Radical Biology & Medicine Assessment of Antioxidant Capacity in Vitro and in Vivo." *Free Radical Biology and Medicine* 49(4):503–15. Disponível: (<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016>).
- NP (Norma Portuguesa) 1419:1987. Frutos, produtos hortícolas e seus derivados. Determinação de açúcares totais, dos açúcares redutores e dos açúcares não redutores (sacarose). Técnica de Munson e Walker. Método de referência.
- Pellegrini, N., F. Visioli, S. Buratti, and F. Brighenti. 2001. "Direct Analysis of Total Antioxidant Activity of Olive Oil and Studies on the Influence of Heating." *Journal of agricultural and food chemistry* 49(5):2532–38.
- Periago, M.J., F. Rincón, M.D. Agüera, and G. Ros. 2004. "Mixture Approach for Optimizing Lycopene Extraction from Tomato and Tomato Products." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(19):5796–5802.
- Petrakis, C. "Olive Oil Extraction" in: Boskou, D. 2006. *Olive Oil - Chemistry and Technology*. Disponível: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598039>).
- Phinney, D.M., J.C. Frelka, J.L. Cooperstone, S.J. Schwartz, D.R. Heldman. 2017. Effect of solvent addition sequence on lycopene extraction efficiency from membrane neutralized caustic peeled tomato waste. *Food Chemistry*, 215:354–361. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.178>.
- Prior, H.D. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:1841–1856.
- Rajendran, P., N. Nandakumar, T. Rengarajan, R. Palaniswami, E.N. Gnanadhas, U. Lakshminarasaiah, J. Gopas and I. Nishigaki. 2014. Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*, 436:332–347. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>.
- Ranveer, R.C., S.N. Patil and A.K Sahoo. 2013. Effect of different parameters on enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste. *Food and Bioprocess Processing*, 91(4):370–375. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.01.006>.
- Rao, A.V. and L.G. Rao. 2007. "Carotenoids and Human Health." *Pharmacological Research* 55(3):207–16.
- Rath, S. 2007. "Lycopene Extract from Tomato Is a Lycopene-Rich Extract Prepared from the Ripe Fruits of Tomato (CTA)." *Fao* (9):1–9. Disponível: (http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/71/lycopene_extract_from_tomato.pdf)
- REGULAMENTO (CE) nº1234/2007 DO CONSELHO de 22 de outubro de 2007 que estabelece uma organização comum dos mercados agrícolas e disposições específicas para certos produtos agrícolas. *Jornal Oficial da União Europeia*. L299/1-149.
- Regulamento (CE) nº1989/2003 da Comissão, de 6 de novembro de 2003 - Relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona. *Jornal Oficial da União Europeia*. L161/11-27.

- Regulamento (CE) nº510/2006 do Conselho, de 20 de março de 2006 - Relativo à protecção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*. L93/12-25.
- Regulamento de Execução (UE) nº1348/2013, da Comissão de 16 de dezembro de 2013 - Relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial da União Europeia* L338/31-67.
- Regulamento (UE) nº652/2014 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de maio - Estabelece disposições para a gestão das despesas relacionadas com a cadeia alimentar, a saúde e o bem-estar animal, a fitossanidade e o material de reprodução vegetal. *Jornal Oficial da União Europeia* L189.
- El Riachy, M., F. Priego-Capote, L. León, L. Rallo, and M.L.L. de Castro. 2011. "Hydrophilic Antioxidants of Virgin Olive Oil. Part 1: Hydrophilic Phenols: A Key Factor for Virgin Olive Oil Quality." *European Journal of Lipid Science and Technology* 113(6):678–91.
- Rosón, Juan Carlos Ávila and Jorge F. .. Fernández. Sánchez. 2010. "Ayer Y Hoy Del Olivo Y de La Producción de Aceite." *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía* 432.
- Rozzi, N.L., R.K. Singh, R.A. Vierling, and B.A. Watkins. 2002. "Supercritical Fluid Extraction of Lycopene from Tomato Processing Byproducts." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(9):2638–43.
- Sanchez, C., A.B. Baranda and I.M. Marañón. 2014. "The Effect of High Pressure and High Temperature Processing on Carotenoids and Chlorophylls Content in Some Vegetables." *Food Chemistry* 163:37–45.
- Servili, M., S. Esposito, R. Fabiani, S. Urbani, A. Taticchi, F. Mariucci, R. Selvaggini and G.F. Montedoro. 2009. "Phenolic Compounds in Olive Oil: Antioxidant, Health and Organoleptic Activities according to Their Chemical Structure." *Inflammopharmacology* 17(2):76–84.
- Servili, M. and G.F. Montedoro. 2002. "Contribution of Phenolic Compounds to Virgin Olive Oil Quality." *European Journal of Lipid Science and Technology* 104(9-10):602–13.
- Shi, J. & M. Le Maguer. 2000. "Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing". *Food Science and Nutrition* 40:(1)1-42
- Silva-Beltrán, N.P., S. Ruiz-Cruz, L.A. Cira-Chávez, M.L. Estrada-Alvarado, J.J. Ornelas-Paz, M.C. López-Mata, C.L. Del-Toro-Sánchez, J.F. Ayala-Zavala,5 and E. Márquez-Ríos4. 2015. "Tomatine Contents and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Extracts of Tomato Plant". *International Journal of Analytical Chemistry*.
- Simopoulos, A.P. 2002. "The Importance of the Ratio of Omega-6/omega-3 Essential Fatty Acids." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 56(8):365–79.
- Simopoulos, A. P., A. Leaf, and N. Salem Jr. 2000. "Workshop Statement on the Essentiality of and Recommended Dietary Intakes for Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids." *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 63(3):119–21.
- Singleton, V.L., R. Orthofer and R.M. Lamuela-Raventós. 1998. "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent". *Methods in Enzymology*, 299(1974), pp.152–178.
- Singh, P. and G.K. Goyal. 2008. "Dietary Lycopene: Its Properties and Anticarcinogenic Effects." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7(3):255–70.

- Smallwood, I.M. (Ed.) 1996. "Handbook of Organic Solvent Properties." *Arnold*. Sidney ISBN 0 340 64578 4 149–51. Disponível: (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080523781500591>).
- Sousa, A., S. Casal, R. Melheiro, H. Lmas, A. Bento and J.A. Pereira. 2015. "Aromatized olive oils: Influence of flavouring in quality, composition, stability, antioxidants, and antiradical potential". *LWT - Food Science and Technology*, 60(1):22–28
- Storniolo, C.E., J. Roselló-Catafu, X. Pintó, M.T. Mitjavila, J.J. Moreno. 2014. "Polyphenol fraction of extra virgin olive oil protects against endothelial dysfunction induced by high glucose and free fatty acids through modulation of nitric oxide and endothelin-1". *Redox Biology*, 2(1):971–977. Disponível: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.07.001>.
- Story, E.N., R.E. Kopec, S.J. Schwartz and G.K.Harris. 2010. "An Update on the Health Effects of Tomato Lycopene." *Food Science and Technology* 1–24.
- Strati, I.F. and V. Oreopoulou. 2011. "Effect of Extraction Parameters on the Carotenoid Recovery from Tomato Waste." *International Journal of Food Science and Technology* 46(1):23–29.
- Tang, G., R.M. Russel. 2009 "Carotenoids as Provitamin A" in: Britton, G., S. Jensen Liaaen, and H. Pfander. 2009. *Carotenoids - Volume 5: Nutrition and Health*.
- Tonucci, Lh et al. 1995. "Carotenoid Content of Thermally Processed Tomato-Based Food Products." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(3):579–86. Disponível: (<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00051a005>).
- Topal, U., M. Sasaki, M. Goto and K. Hayakawa. 2006. "Extraction of Lycopene from Tomato Skin with Supercritical Carbon Dioxide : Effect of Operating Conditions and Solubility Analysis Extraction of Lycopene from Tomato Skin with Supercritical Carbon Dioxide : Effect of Operating Conditions and Solubility An." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 5604–10.
- Unlu, N.Z. et al., 2007. Lycopene from heat-induced cis-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-trans-rich tomato sauce in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 98(1), pp.140–146.
- Velasco, J. & Dobarganes, C., 2002. Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9–10), pp.661–676.
- Vignoli, J.A., Bassoli, D.G. & Benassi, M. de T., 2012. Atividade antioxidante de caf??s torrado e solúvel: Padronização e validação de métodos. *Coffee Science*, 7(1), pp.68–75.
- Visioli, F. and C. Galli. 2002. "Biological Properties of Olive Oil Phytochemicals." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42(3):209–21. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12058980).
- Vossen, Paul. 2007. "Olive Oil: History, Production, and Characteristics of the World's Classic Oils." *HortScience* 42(5):1093–1100.
- Zechmeister, L., A. L. LeRosen, W. A. Schroeder, A. Prolgár, and L. Pauling. 1943. "Spectral Characteristics and Configuration of Some Stereoisomeric Carotenoids Including Prolycopene and pro-Y-Carotene." *Journal of the American Chemical Society* 65(10):1940–51. Retrieved (<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0001526488&partnerID=40>).

Fontes Eletrónicas

Casa do Azeite, 2016. *Como se produz...* [Online] Disponível em: <http://www.casadoazeite.pt/Azeite/Como-se-produz> [Acedido em 18 Maio 2016].

⁽¹⁾COI, Concelho Oleícola Internacional, 2015. *Designations and definitions of olive oils*. [Online] Disponível em: <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/83-designations-and-definitions-of-olive-oils> [Acedido em 19 Maio 2016].

FAOSTAT, 2015 *"Production Crops Processed - Olive Oil"* [Online] Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/636/DesktopDefault.aspx?PageID=636#ancor> [Acedido em 20 Abril 2016].

Olive Oil Emporium, n.d.. *Olive Oil Process*. [Online] Disponível em: <http://www.oliveoilemporium.com/OriginsoftheOlive/OliveOilProcess.aspx> [Acedido em 25 Maio 2016].

Olives 2000, 2016. *Processing Stages*. [Online] Disponível em: <http://www.olives2000.com/the-process> [Acedido em 2 Junho 2016].

Probeira, n.d.. *Azeite*. [Online] Disponível em: <http://www.probeira.pt/azeiteprocesso.htm> [Acedido em 21 Fevereiro 2016].

Prolagar, 2011. *Obtenção de Azeite*. [Online] Disponível em: <http://www.prolagar.pt/pt/index.php/tudo-sobre-o-azeite/2-caracteristicas-do-azeite/10-obtencao-de-azeite.html> [Acedido em 3 Junho 2016].

Anexo I – Retas de Calibração

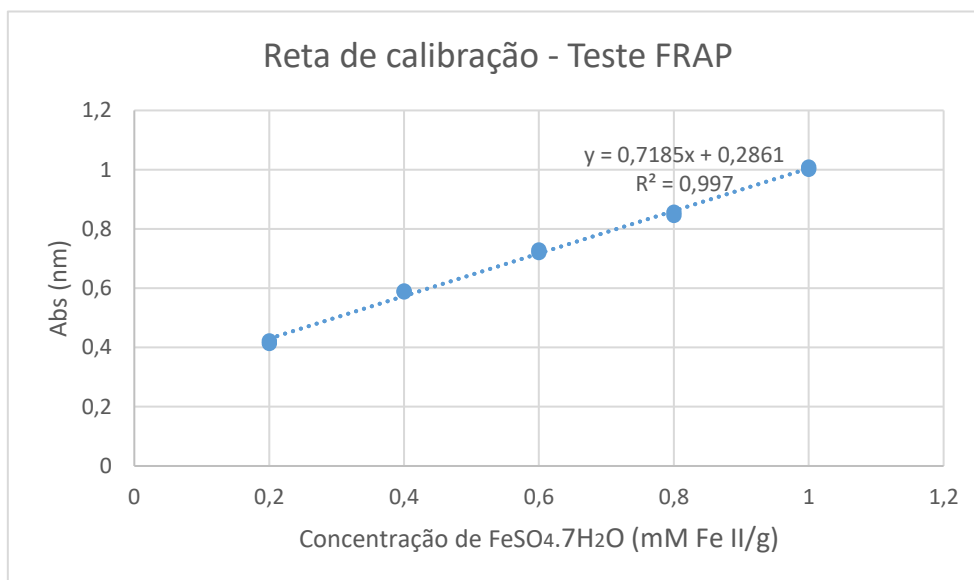


Figura A1.1 – Reta de calibração utilizada para o teste FRAP dos extratos de licopeno.

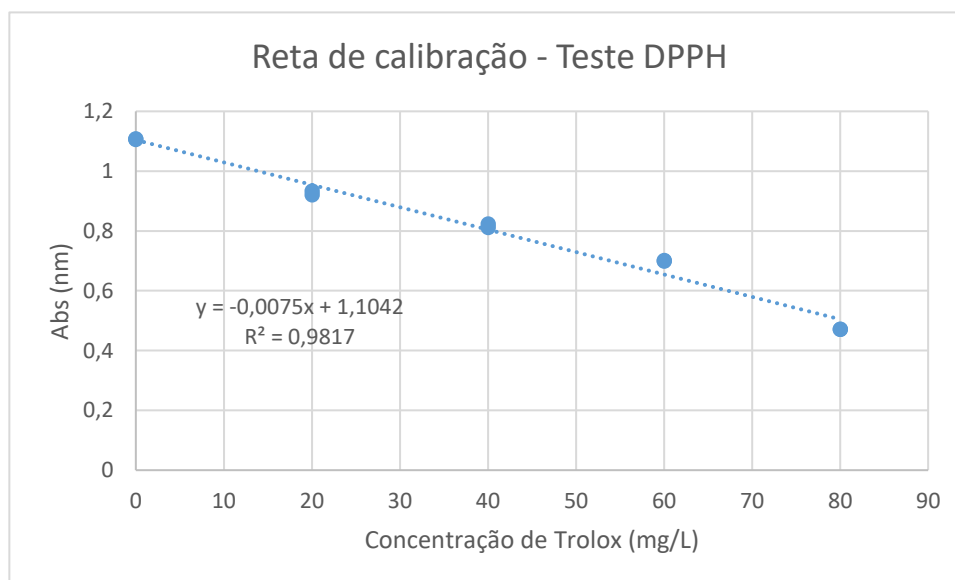


Figura A1.2 – Reta de calibração utilizada para o teste DPPH dos extratos de licopeno

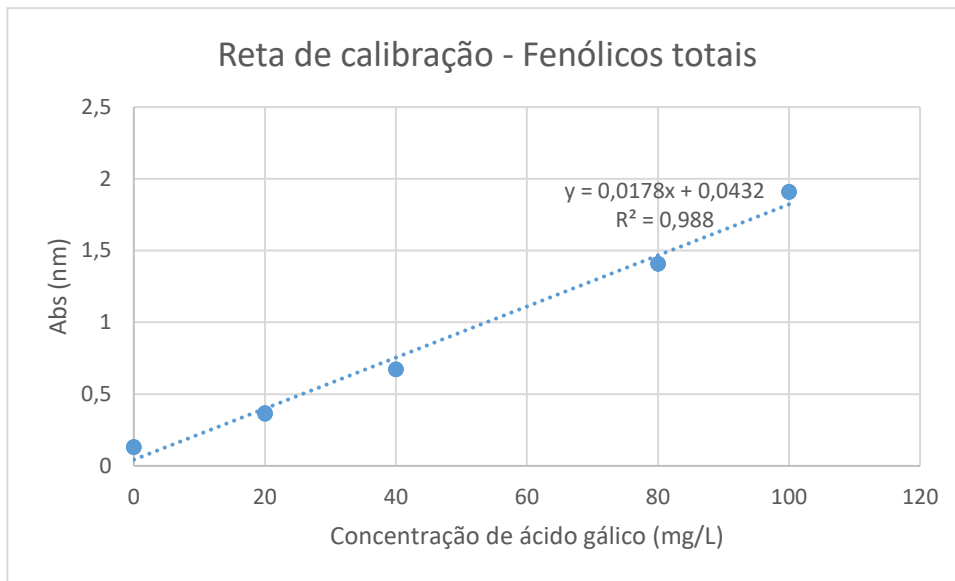


Figura A1.3 - Reta de calibração utilizada para o teste Folin do azeite sem fortificação e do azeite fortificado com extrato de licopeno.

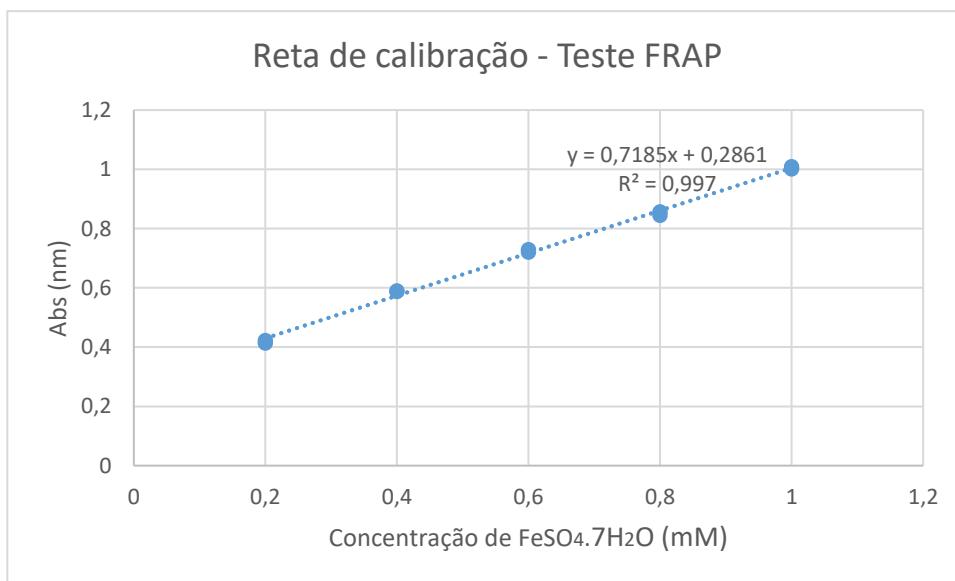


Figura A1.4- Reta de calibração utilizada para o teste FRAP do azeite sem fortificação e do azeite fortificado com extrato de licopeno.

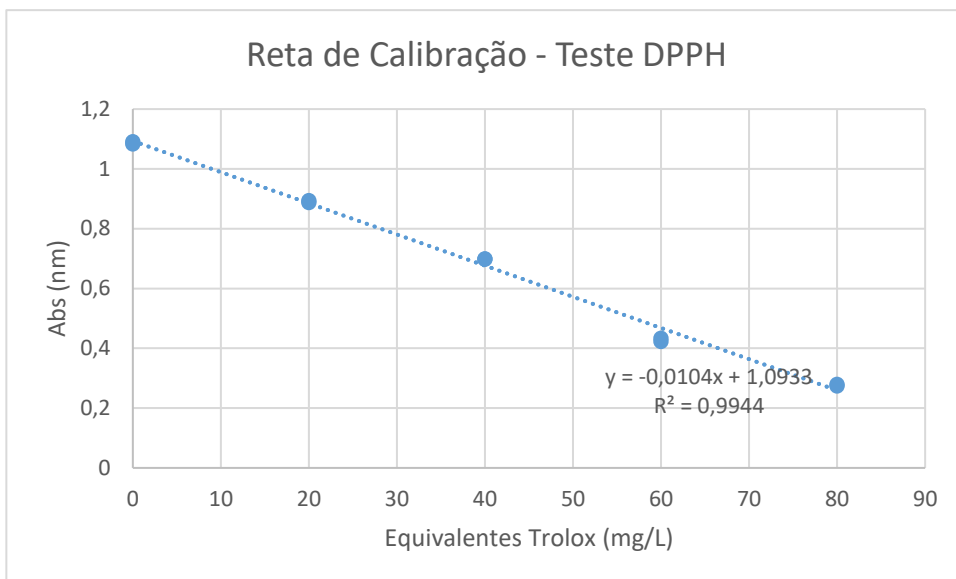


Figura A1 5- Reta de calibração utilizada para o teste DPPH do azeite sem fortificação e do azeite fortificado com extrato de licopeno.