

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Faculdade de Ciências e Tecnologia



Utilização da Tecnologia Supercrítica no Isolamento de Ingredientes Biofuncionais

- Aplicação ao Caroço de Azeitona e Refugo de Cereja -

Ana Patrícia Correia Almeida

*Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia*

Orientador: Doutora Catarina Duarte

Co-Orientador: Doutora Ana Matias

Elo de Ligação: Professor Doutor Manuel Nunes da Ponte



Lisboa

2009

Agradecimentos

À Doutora Catarina Duarte pela oportunidade de ingresso no mundo da Tecnologia Supercrítica, por permitir que eu conhecesse o meio da investigação científica. Agradeço sua constante preocupação na minha evolução como cientista.

À Doutora Ana Matias, por estar sempre disponível para ajudar e transmitir conhecimento, pela constante preocupação na evolução do meu trabalho.

À Doutora Raquel Sousa por ter sido a pessoa que me ajudou a dar os primeiros passos a trabalhar com fluidos supercríticos. Obrigado, sempre saberei que primeiro é importante pensar nas consequências que acarreta abrir uma válvula sem prever o que poderá acontecer.

À Teresa Serra por estar sempre disponível para me ajudar e passar o seu conhecimento. O teu trabalho é muito inspirador e faz-me pender para a área dos nutracêuticos.

Aos meus colegas de laboratório, Ana Nunes e Duarte Rego, a vossa ajuda foi sempre preciosa.

Agradeço a colaboração e o apoio técnico que foi vital para a realização desta dissertação disponibilizado pela Doutora Maria Rosário Bronze Investigadora no Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB) responsável pelo grupo de Química Analítica, pelo Professor Doutor João Paulo Crespo Investigador na Faculdade de Ciências e Tecnologia e à Soverna em especial à Engenheira Marina Reis.

Susana Marques, agradeço-te o companheirismo, a compreensão e a disponibilidade para me ajudares. Todas as horas de trabalho de laboratório, assobios, músicas, cantorias, boleias e horas de trânsito que partilhamos foram algo que nunca esquecerei. Nunca pensei que pudesse haver alguém tão chata como eu! ;)

*Aos meus amigos,
Diana, Carla, Zé, Raquel,
Gonçalo, Sofia, Cristina, Lia, Catarina,
Joana, Franklin, Íris....
Obrigado por partilharem os momentos bons e maus...*

*À minha afilhada, Daniela, que por mais cansada que esteja consegue sempre
arrancar-me um sorriso e obrigar-me a fazer desenhos até cair para o lado. Contigo
sinto-me um bocadinho perto daquilo que será um dia o papel de mãe.*

*Ao Mário,
por tudo o que partilhamos e vivemos.
O futuro será aquilo que conseguirmos construir em conjunto.
Por acreditar na ciência e nunca desistir de me transmitir a sua fé!*

*Aos “meus miúdos” e à possibilidade que me dão de lhes passar a fé e os
conhecimentos da vida Cristã. Por todos os sorrisos e lições que as crianças nos
ensinam com toda a sua inocência.*

*À minha mãe, com quem posso contar sempre.
Obrigado por nunca me teres deixado desistir,
ambas sabemos que não foi fácil chegar a este ponto.
Nunca conseguirei retribuir todo o amor que me dás.
Contigo aprendi a ser mulher e quando crescer quero ser uma mãe como tu!*

*Ao meu pai, por sempre me deixar escolher e nunca ter colocado barreiras nenhuma.
Por me ter dado tudo o que eu precisava e não aquilo que eu queria.
Obrigado por nunca desistires de mim e espero estar à altura das tuas expectativas.*

Obrigado Fundação Almeida! Sem ti nada disto seria possível.

*“ O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.*

*Por isso, existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”*

Fernando Pessoa

Objectivos

Este projecto teve como principal objectivo explorar as potencialidades da tecnologia supercrítica, uma tecnologia limpa que permite a extracção selectiva de compostos, no desenvolvimento de ingredientes biofuncionais derivados de matrizes naturais. A extracção supercrítica é apelativa por se tratar de uma operação que conserva as propriedades dos compostos biofuncionais e por se tratar de um tipo de extracção altamente selectivo que não utiliza solventes orgânicos. A utilização desta tecnologia permite contornar os problemas existentes quando se recorre aos processos tradicionais de extracção, como a necessidade de etapas adicionais de purificação/remoção destes solventes que na sua grande maioria são prejudiciais para a saúde.

Numa primeira etapa do estudo pretendeu-se explorar a potencialidade da utilização da tecnologia supercrítica para extracção de compostos bioactivos a partir de sub-produtos de azeitona, o caroço e o bagaço de azeitona, e avaliar a potencialidade da sua utilização na indústria.

Numa segunda etapa, o objectivo foi avaliar a viabilidade de aplicar a extracção supercrítica como um segundo passo num processo integrado de extracção para aumentar a selectividade relativamente aos compostos singulares que apresentam bioactividade. A matriz escolhida foi o refugo de cereja (fruto, caroço e pedúnculos) com o intuito de dar continuidade ao trabalho em curso no laboratório de acolhimento, pretendeu-se obter extractos concentrados em compostos biofuncionais como o álcool perilílico.

Resumo

O projecto que originou esta dissertação encontra-se dividido em duas etapas. Na primeira etapa pretende-se explorar as potencialidades da utilização da tecnologia supercrítica na extracção do caroço de azeitona, um resíduo proveniente da indústria de produção de azeitona de mesa. Esta matriz foi escolhida por se encontrar até à data pouco estudada, utilizou-se o bagaço de azeitona, matriz amplamente estudada, como termo de comparação. Na segunda etapa deste projecto pretende-se estudar a aplicabilidade da extracção supercrítica como um segundo passo num processo integrado de extracção do refugo de cereja para aumentar a selectividade relativamente aos compostos biofuncionais, como o álcool perilílico.

Na primeira etapa do projecto produziram-se extractos de caroço e bagaço de azeitona recorrendo a diferentes metodologias. O caroço e bagaço de azeitona foram extraídos em soxhlet com hexano e com sc-CO₂ em semi-contínuo utilizando uma instalação de alta pressão e foram obtidos extractos lipídicos. Foi determinada a concentração em polifenóis totais e o perfil polifenólico recorrendo a cromatografia líquida (High-performance liquid chromatography) dos extractos lipídicos obtidos. A actividade antioxidante destes extractos foi determinada recorrendo à avaliação da capacidade de resgate do radical livre peroxilo e à avaliação da capacidade de inibição do radical hidroxilo por parte dos extractos. Efectuou-se a identificação e quantificação dos ácidos gordos e esteróis presentes nesses extractos recorrendo a cromatografia gasosa. A estabilidade oxidativa dos extractos foi determinada recorrendo ao teste de rancimat. Verificou-se que a utilização das diferentes metodologias de extracção permitem produzir extractos ricos em compostos que apresentam bioactividade comprovada como o esqualeno e o ácido oleico.

Na segunda etapa deste projecto procedeu-se numa primeira fase à extracção sólido-líquido do refugo de cereja, a qual é o primeiro passo aplicado no processo integrado de tecnologias limpas aqui estudada. Para avaliação do processo global de extracção e das vantagens da utilização da extracção supercrítica como um segundo passo de extracção utilizaram-se os extractos alcoólicos e hidroalcoólicos preparados por extracção convencional sólido-líquido como matriz da extracção supercrítica. A extracção supercrítica dividiu-se em 3 etapas (extracção fraccionada), na primeira fracção a extracção foi efectuada apenas com sc-CO₂, na segunda fracção a extracção foi efectuada com sc-CO₂+10% de etanol e na terceira fracção extraiu-se utilizando a

mesma composição de solvente durante mais 1 hora. A escolha dos parâmetros utilizados para este estudo teve como base trabalhos em curso no laboratório de acolhimento. Foi estudada a composição determinada a quantificação em polifenóis dos extractos obtidos recorrendo ao método de Folin-Ciocalteu. A capacidade antioxidante dos extractos foi avaliada através da capacidade de resgate do radical peróxido e da capacidade de inibição da formação do radical hidroxilo. Foi identificado o álcool perilílico nos extractos recorrendo a cromatografia em camada fina.

Os resultados obtidos com este trabalho são encorajadores e revelam que é possível obter extractos mais concentrados em compostos biofuncionais recorrendo à utilização da extracção supercrítica como um segundo passo de extracção. Os extractos preparados nesta etapa do projecto revelam-se concentrados no monoterpeno álcool perilílico, que possui bioactividade comprovada, e apresentam propriedades anti-proliferativas em linhas celulares humanas.

*Aos meus pais,
por todo o esforço, contribuição e dedicação
na minha formação pessoal e académica.*

Obrigado Fundação Almeida! Sem ti nada disto seria possível.

Abreviaturas

- AAPH – 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorado
- $A_{\max}$ – máximo de absorvância
- BSA – Albumina do Soro Bovino
- BSTFA – N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)
- CAEAC – Capacidade Antioxidante em Equivalentes Ácido Cafeico
- CAET – Capacidade Antioxidante em Equivalentes de Trolox
- EAG – Equivalentes de Ácido Gálico
- GC – Gas Chromatography (Cromatografia Gasosa)
- H_2O_2 – Peróxido de Hidrogénio
- HAT – Hydrogen Atom Transfer
- $HO^\bullet$ – Radical Hidroxilo
- HORAC – Hydroxyl Radical Adverting Capacity
- HPLC-DAD – High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector
- HPLC-ED – High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detector
- IGP – Indicação Geográfica Protegida
- LDL – Low-Density Lipoprotein
- ORAC – Oxigen Radical Absorbance Capacity
- PBS – Phosphate Buffer Saline
- $ROO^\bullet$ – Radical Peroxilo
- ROS – Reactive Oxygen Species
- $sc-CO_2$ – Dióxido de carbono supercrítico
- TI – Tempo de Indução
- TLC – Thin Layer Chromatography
- TMS – chloro-trimethyl-silane
- Trolox – 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Azeitona	4
1.2. Cereja	6
1.3. Fluido Supercrítico	8
1.4. Tecnologia Supercrítica	9
1.5. Extracção Supercrítica	10
1.6. Solubilidade e Transferência de Massa	11
1.7. Efeito da Matriz na Extracção Supercrítica	12
1.8. Efeito das Condições operatórias	12
1.8.1. Pressão e temperatura de extracção	12
1.8.2. Co-Solvente(s)	13
1.8.3. Tempo de extracção	13
1.8.4. Caudal de fluido supercrítico	14
1.8.5. Granulometria	14
1.8.6. Teor de água da matriz	14
1.9. Recolha do Extracto	15
1.9.1. Condições de Recolha	15
Bibliografia	16
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	19
1. EXTRACTOS NATURAIS A PARTIR DE RESÍDUOS DE AZEITONA	21
1.1. Matérias-primas	21
1.2. Processamento das Matérias-primas Para Obtenção dos Extractos Naturais Derivados da Azeitona	21
1.3. Extractos Hidroálcoolicos	22
1.3.1.1. Extractos Lipídicos	22
1.3.1.1.1. Extracção em Soxhlet com Hexano	22
1.3.2. Extracção Supercrítica Utilizando sc-CO ₂	23
1.4. Caracterização dos Extractos Naturais a Partir de Resíduos de Azeitona	25
1.4.1.1. Determinação dos Polifenóis totais	25
1.4.1.1.1. Método de Folin-Ciocalteu	25
1.4.1.2. Determinação do Perfil em Polifenóis Recorrendo a Cromatografia Líquida: HPLC (High- Performance Liquid Chromatography)	26
1.5. Quantificação da Proteína Total Recorrendo ao Método de Bradford	27

1.6.	Avaliação da Capacidade Antioxidante	28
1.6.1.	Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Livre ROO [•]	29
1.6.1.1.	Método de ORAC.....	29
1.6.1.2.	Inibição de Autooxidação Lipídica induzida (LDL)	30
1.6.2.	Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Livre HO [•]	32
1.6.2.1.	Método de HORAC	32
1.7.	Determinação e quantificação dos ácidos gordos	34
1.8.	Determinação da estabilidade oxidativa	35
1.9.	Identificação e Quantificação dos Esteróis Vegetais (Fitoesteróis)	36
2.	EXTRACTOS NATURAIS OBTIDOS A PARTIR DE REFUGO DE CEREJA	37
2.1.	Matérias-primas	37
2.2.	Processamento das Matérias-primas para obtenção dos Extractos Naturais Derivados da Cereja	37
2.3.	Extractos Convencionais	37
2.4.	Extractos Supercríticos.....	38
3.	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRACTOS NATURAIS DE CEREJA	39
3.1.	Determinação dos Polifenóis Totais.....	39
3.1.1.	Quantificação dos Polifenóis Totais Recorrendo ao Método de Folin-Ciocalteu	39
3.1.2.	Determinação do perfil em Polifenóis Recorrendo a Cromatografia Líquida: HPLC (High-Performance Liquid Chromatography).....	40
3.2.	Avaliação da Capacidade Antioxidante	40
3.2.1.	Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Livre ROO [•]	40
3.2.1.1.	Método de ORAC.....	40
3.2.2.	Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Livre HO [•]	40
3.2.2.1.	Método de HORAC	40
3.2.3.	O método utilizado foi o referido anteriormente (1.6.2 Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Livre HO [•]	40
3.3.	Thin Layer Chromatography (TLC) – Identificação do Álcool Perilílico.....	40
Bibliografia		42
Capítulo 3 - Apresentação e Discussão de Resultados		45
ETAPA 1		47
1.	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRACTOS NATURAIS DE CAROÇO E BAGAÇO DE AZEITONA	47
1.1.	Extractos Hidro-alcoólicos	47
1.1.1.	Rendimentos de Extração	47
1.1.2.	Determinação dos Polifenóis Totais.....	47
1.1.2.1.	Método de Folin-Ciocalteu	47

1.1.2.2.	Determinação do perfil em Polifenóis Recorrendo a Cromatografia Líquida: HPLC (High-Performance Liquid Chromatography).....	49
1.1.3.	Quantificação da Proteína Total Recorrendo ao Método de Bradford.....	50
1.1.4.	Avaliação da Capacidade Antioxidante	50
1.1.4.1.	Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Livre ROO [•]	50
1.1.4.1.1.	Método de ORAC.....	50
1.1.4.2.	Avaliação da Capacidade de Inibição da Formação do Radical Livre HO [•]	51
1.1.4.2.1.	Método de HORAC	51
1.2.	Extractos Lipídicos	53
1.2.1.	Rendimentos de Extração	53
1.2.2.	Determinação dos Polifenóis Totais.....	54
1.2.2.1.	Quantificação dos Polifenóis Totais Recorrendo a Cromatografia Líquida: HPLC (High-Performance Liquid Chromatography).....	54
1.3.	Avaliação da Capacidade Antioxidante	55
1.3.1.	Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Livre ROO [•]	55
1.3.1.1.	Método de ORAC.....	55
1.3.1.2.	Ensaio da Inibição da Auto-oxidação Lipídica Induzida (LDL)	56
1.3.2.	Avaliação da Capacidade de Inibição da Formação do Radical Livre HO [•] (Método de HORAC).....	57
1.4.	Determinação e Quantificação dos Ácidos Gordos.....	59
1.5.	Determinação da Estabilidade Oxidativa	60
1.6.	Determinação e Quantificação dos Esteróis Vegetais (Fitoesteróis)	62
ETAPA 2.....		65
2.	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRACTOS NATURAIS DE CEREJA	65
2.1.	Rendimentos de Extração	65
2.2.	Determinação dos Polifenóis Totais.....	67
2.2.1.	Quantificação dos Polifenóis Totais Recorrendo ao Método de Folin-Ciocalteu	67
2.2.2.	Quantificação dos Polifenóis Totais Recorrendo a Cromatografia Líquida: HPLC (High-Performance Liquid Chromatography).....	67
2.2.3.	Determinação do perfil em Polifenóis Recorrendo a Cromatografia Líquida: HPLC (High-Performance Liquid Chromatography).....	68
2.3.	Avaliação da Capacidade Antioxidante	71
2.3.1.	Avaliação da capacidade de resgate do radical livre ROO [•]	71
2.3.1.1.	Método de ORAC.....	71
2.3.2.	Avaliação da capacidade de resgate do radical livre HO [•]	72
2.3.2.1.	Método de HORAC	72
2.4.	Identificação do Álcool Perilílico por Cromatografia em Camada Fina (TLC)	73
Bibliografia.....		76

Capítulo 4 - Caso de Estudo.....	79
ENSAIOS DE BIOACTIVIDADE DOS EXTRACTOS SUPERCRTICOS DE CEREJA	81
1. ENSAIOS IN VITRO EM LINHAS CELULARES HUMANAS.....	81
1.1. Avaliação do efeito Antiproliferativo.....	81
1.2. Avaliação da citotoxicidade.....	82
2. RESULTADOS E CONCLUSÕES	82
Capítulo 5 - Conclusões	85
• SUBPRODUTOS DE AZEITONA	87
• REFUGO DE CEREJA	88
Bibliografia.....	89
Anexos.....	91
ANEXO 1 - ESPECTROS DE HPLC-DAD A 253NM DOS EXTRACTOS CONVENCIONAIS DE CAROÇO E BAGAÇO DE AZEITONA	93
ANEXO 2 - PROTOCOLO PARA PREPARAÇÃO DO PHOSPHATE BUFFER SALINE	97
ANEXO 3 - RENDIMENTO DE EXTRACÇÃO DO CAROÇO DE AZEITONA EM SOXHLET COM HEXANO.....	98
ANEXO 4 - CINÉTICAS DA REACÇÃO DE INIBIÇÃO DA AUTO-OXIDAÇÃO LIPÍDICA INDUZIDA (LDL)	99
ANEXO 5 - IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS PRESENTES NOS EXTRACTOS DE CAROÇO E BAGAÇO DE AZEITONA	100
ANEXO 6 - ESPECTROS DE GC OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS PRESENTES NOS EXTRACTOS LIPÍDICOS DE CAROÇO E BAGAÇO DE AZEITONA	102
ANEXO 7 - IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS PRESENTES NOS EXTRACTOS DE CAROÇO E BAGAÇO DE AZEITONA.....	106
ANEXO 8 - CROMATOGRAMAS DE GC OBTIDOS PARA O ESTUDO COMPARATIVO DOS ÁCIDOS GORDOS EXISTENTES NO ÓLEO DE GIRASSOL QUANDO INCORPORAMOS DIFERENTES PERCENTAGENS DE EXTRACTO SUPERCRTICO DE CAROÇO E BAGAÇO DE AZEITONA ANTES E DEPOIS DE SUJEITOS AO TESTE DE RANCIMAT	109
ANEXO 9 - ESTUDO COMPARATIVO DOS ÁCIDOS GORDOS EXISTENTES NO ÓLEO DE GIRASSOL QUANDO INCORPORAMOS DIFERENTES PERCENTAGENS DE EXTRACTO SUPERCRTICO DE CAROÇO E BAGAÇO DE AZEITONA ANTES E DEPOIS DE SUJEITOS AO TESTE DE RANCIMAT	113
ANEXO 10 - SAPONIFICAÇÃO DE EXTRACTOS LIPÍDICOS DE CAROÇO E BAGAÇO DE AZEITONA E EXTRACÇÃO DOS INSAPONIFICÁVEIS.....	115
✓ PROTOCOLO PARA A SAPONIFICAÇÃO DE EXTRACTOS LIPÍDICOS DE CAROÇO E BAGAÇO DE AZEITONA	115
✓ PROTOCOLO PARA A EXTRACÇÃO DOS INSAPONIFICÁVEIS DOS EXTRACTOS DE CAROÇO E BAGAÇO DE AZEITONA.....	115
ANEXO 11 - IDENTIFICAÇÃO DOS ESTEROIS PRESENTES NOS EXTRACTOS DE CAROÇO E BAGAÇO DE AZEITONA.....	116

ANEXO 12 - ESPECTROS DE GC OBTIDOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS ESTERÓIS PRESENTES NOS EXTRACTOS LIPÍDICOS DE CAROÇO E BAGAÇO DE AZEITONA	118
ANEXO 13 - IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ESTERÓIS PRESENTES NOS EXTRACTOS LIPÍDICOS DE CAROÇO E BAGAÇO DE AZEITONA.....	122
ANEXO 14 - RENDIMENTOS OBTIDOS PARA O PROCESSO GLOBAL DE EXTRACÇÃO DO REFUGO DE CEREJA	124
ANEXO 15 - ESPECTROS DE HPLC-DAD A DOS EXTRACTOS CONVENCIONAIS E SUPERCRÍTICOS DE CEREJA SACO	125
ANEXO 16 - QUANTIFICAÇÃO DOS POLIFENÓIS TOTAIS DOS EXTRACTOS DE CEREJA RECORRENDO A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA: HPLC (HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)	127
ANEXO 17 - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS DE CEREJA – MÉTODO DE ORAC E MÉTODO DE HORAC.....	128
ANEXO 18 - IDENTIFICAÇÃO DO ÁLCOOL PERILÍLICO ATRAVÉS DE TLC	130

Índice de Figuras

Capítulo 1 - Introdução

Figura 1.1 - A área geográfica correspondente à produção da Cereja Cova da Beira abrange cerca de 1 374 km² e compreende os seguintes concelhos do distrito de Castelo Branco: Fundão - com maior representatividade nas freguesias de Alconqosta, Alcaide, Souto da Casa, Aldeia de Joanes, Alpedrinha e Castelo Novo; Covilhã - com maior representatividade nas freguesias de Ferro, Peraboa, Tortosendo e Dominguiso; Belmont (Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Centro, 2008).6

Figura 1.2 – Estrutura química do álcool perilílico.8

Figura 1.3 – Diagrama de fases onde se observa o ponto crítico e a zona onde um composto puro se encontram no estado supercrítico (Brunner, 2005).....8

Figura 1.4 – Diagrama pressão – densidade para o dióxido de carbono. A área a sombreado corresponde ao domínio experimental correspondente à fase supercrítica (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007)10

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

Figura 2.1 – As matrizes em estudo após o processamento para obtenção de extractos naturais: a) Carço de Azeitona e b) Bagaço de azeitona.....21

Figura 2.2 – Montagem utilizada para a extracção do carço e do bagaço de azeitona em soxhlet com hexano.23

Figura 2.3 - Esquema da montagem utilizada para a extracção supercrítica do carço e do bagaço de azeitona: 1 – garrafa de CO₂; 2, 6, 10 – Válvula de agulha; 3 – Banho de arrefecimento do CO₂; 4 – Bomba de líquidos; 5, 7 – Manómetro; 8 – Forno termostatizado, 9 – Extractor; 11 – Caudalímetro; 12 – Vaso de recolha24

Figura 2.4 – Fotografia do extractor utilizada para proceder à extracção supercrítica do carço e do bagaço de azeitona.24

Figura 2.5 - Esquema do enchimento do extractor.25

Figura 2. 6- Esquema de reacções ocorridas no ensaio de ORAC no qual o AAPH, por termodegradação, produz radicais peróxido que reagem com a Fluoresceína (FLH). Na presença de um antioxidante, AH, este resgata o radical, dando origem a compostos não reactivos, ROOH e ROOA. Adaptado de Bisby, Brooke, & Suppiah (Bisby, Brooke, & Suppiah, 2008).29

Figura 2.7 – Esquema da reacção do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em presença de iões metálicos ($M(II)$). A reacção gera o radical hidroxilo $HO^\bullet$. Este radical é muito reactivo e ao reagir com espécies antioxidantes presentes nos extractos ($R-H$) capta um hidrogénio originando uma espécie com um electrão desemparelhado ($R^\bullet$). Por sua vez esta espécie reage com o O_2 molecular formando o radical peroxilo $ROO^\bullet$ adaptado de (Ou, Hampsch-Woodill, Flanagan, Deemer, Prior, & Huang, 2002).33

Figura 2.8 – Aparelho Rancimat 873 utilizado para o teste de rancimat e exemplo da aquisição de dados efectuada e respectivas curvas de condutividade em função do tempo.36

Figura 2.9 - A matriz em estudo após o processamento para obtenção de extractos naturais a partir de refugo de cereja Saco.37

Figura 2.10 - Esquema da montagem utilizada para a extracção supercrítica do refugo de cereja: 1 – garrafa de CO_2 ; 2, 6, 10, 13 – Válvula de agulha; 3 – Banho de arrefecimento do CO_2 ; 4, 14 – Bomba de líquidos; 5, 7 – Manómetro; 8 – Forno termostaticado, 9 – Extractor; 11 – Caudalímetro; 12 – Vaso de recolha, 15 – Vaso do Co-Solvente.38

Capítulo 3 - Apresentação e Discussão de Resultados

Figura 3.1– Rendimento em g extracto obtido por g de matriz (caroço e bagaço de azeitona) utilizando água, etanol ou etanol:água 80:20 (v/v) como solvente.....47

Figura 3.2– Estudo comparativo para os polifenóis totais na extracção do caroço e do bagaço de azeitona com solventes convencionais (água, etanol e etanol:água na proporção 80:20 (v/v)) em polifenóis totais extraídos em cada grama de extracto.48

Figura 3.3 - Quantificação do hidroxitol (ppm) existente nos diferentes extractos em estudo, ou seja extracção do caroço e do bagaço de azeitona com solventes convencionais (água, etanol e etanol:água na proporção 80:20 (v/v))......48

Figura 3.4 - Perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD do extracto de caroço EtOH: H_2O 80:20 (caroço C3) aos comprimentos de onda (c.d.o.) de 254(a)), 280(b)) e 360nm(c))......49

Figura 3.5 – Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto de caroço EtOH: H_2O 80:20(v/v) (Caroço C3 – a)) e extracto de bagaço de azeitona EtOH: H_2O 80:20(v/v) diluído na proporção 1:5 (Bagaço B3 – b)).49

Figura 3.6 – Quantificação da Proteína total (g_{BSA} / g de extracto) existente nos diferentes extractos em estudo, , ou seja extracção do caroço e do bagaço de azeitona com solventes convencionais (água, etanol e etanol:água na proporção 80:20 (v/v))......50

- Figura 3.7 – Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante dos extractos convencionais de caroço em $\mu\text{mol CAET/g}$ de extracto, nomeadamente a capacidade de resgate do radical peróxido determinada pelo método de ORAC.....51
- Figura 3.8 – Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante dos extractos convencionais de caroço em $\mu\text{mol de CAEAC/g}$ extracto, nomeadamente a capacidade de resgate do radical hidroxilo determinada pelo método de HORAC.51
- Figura 3.9 – Rendimento em gramas de extracto por grama de matriz (caroço de azeitona e bagaço de azeitona) obtidos ao longo do tempo utilizando como solvente o hexano (caroço de azeitona hexano e bagaço de azeitona hexano) e rendimento em gramas de extracto por gramas de matriz obtidos ao longo do tempo utilizando o sc-CO_2 (caroço de azeitona extracção supercrítica e bagaço de azeitona extracção supercrítica).53
- Figura 3.10 – Estudo comparativo para os polifenóis totais na extracção supercrítica do caroço e do bagaço de azeitona durante 1 e 3 horas em miligramas de polifenóis totais existente por grama extracto (mg EAG/g extracto).54
- Figura 3.11 - Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 280nm do extractos obtidos recorrendo à tecnologia supercrítica: extracto supercrítico de caroço obtido ao fim de 1 hora (sc-Car 1H – a)); extracto supercrítico de caroço obtido ao fim de 3 horas (sc-Car 3H – b)) ; extracto supercrítico de bagaço obtido ao fim de 1 hora (sc-Bag 1H – c)) e extracto supercrítico de bagaço obtido ao fim de 3 horas (sc-Bag 3H – d)).55
- Figura 3.12 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante ($\mu\text{mol de CAET/g}$ de extracto) dos extractos de caroço e bagaço de azeitona obtidos em soxhlet com hexano ao fim de 3 horas (Caroço hexano 3H e Bagaço hexano 3H, respectivamente) e extractos de caroço e bagaço de azeitona obtidos utilizando sc-CO_2 por 1 e 3 horas (Ext. Supercrítico Caroço 1H, Ext. Supercrítico Caroço 3H, Ext. Bagaço Supercrítico 1H e Ext. Supercrítico 3H, respectivamente), nomeadamente a capacidade de resgate do radical peróxido determinada pelo método de ORAC.....56
- Figura 3.13 – Estudo da inibição da oxidação da LDL por parte dos extractos lipídicos de caroço e bagaço de azeitona em % do aumento do tempo de latência na oxidação da LDL: na presença de AAPH (controlo) e dos extractos de caroço e bagaço de azeitona obtidos em soxhlet com hexano ao fim de 3 horas (Caroço hexano 3H e Bagaço hexano 3H, respectivamente) e extractos de caroço e bagaço de azeitona obtidos utilizando sc-CO_2 por 1 e 3 horas (Ext. Supercrítico Caroço 1H, Ext. Supercrítico Caroço 3H, Ext. Bagaço Supercrítico 1H e Ext. Supercrítico 3H, respectivamente).57
- Figura 3.14 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante ($\mu\text{mol de CAEAC/g}$ de extracto) dos extractos de caroço e bagaço de azeitona obtidos em soxhlet com hexano ao fim de 3 horas (Caroço hexano 3H e Bagaço hexano 3H, respectivamente) e extractos de caroço e bagaço de azeitona obtidos utilizando sc-CO_2 por 1 e 3 horas (Ext. Supercrítico Caroço 1H, Ext. Supercrítico Caroço 3H, Ext.

Bagaço Supercrítico 1H e Ext. Supercrítico 3H, respectivamente), nomeadamente o capacidade de inibição de formação do radical hidroxilo determinada pelo método de HORAC.58

Figura 3.15 – Estudo comparativo do perfil dos ácidos gordos (g de Ácido Gordo/g de extracto) presentes nos extractos lipídicos de Caroço e Bagaço de Azeitona obtidos em soxhlet com hexano (Caroço Hexano 1H, Caroço Hexano 3H, Bagaço Hexano 1H e Bagaço Hexano 3H) e extractos lipídicos de Caroço e Bagaço de Azeitona obtidos usando sc-CO₂ (Ext. SC Caroço 1H, Ext. SC Caroço 3H, Ext. SC Bagaço 1H e Ext. SC Bagaço 3H).59

Figura 3.16 – a) Estudo comparativo da estabilidade oxidativa, ou seja do tempo de indução do óleo de girassol, óleo de girassol com 0,05% (m/m) de extracto supercrítico de Caroço de Azeitona de 1H (óleo de girassol+ 0,05% SC-Caroço1H) e óleo de girassol com 0,05% (m/m) de extracto supercrítico de Caroço de Azeitona de 3H (óleo de girassol+ 0,05% SC-Caroço 3H); b) Estudo comparativo da estabilidade oxidativa, ou seja do tempo de indução do óleo de girassol, óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Caroço de Azeitona de 3H (óleo de girassol + 0,1% SC-Caroço 3H), óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3H (óleo de girassol + 0,1% SC-Bagaço 3H), óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Caroço de Azeitona de 3H (óleo de girassol + 1% SC-Caroço 3H) e óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3H (óleo de girassol + 0,1% SC-Bagaço 3H).61

Figura 3.17 - Estudo comparativo do perfil de esteróis (mg de esterol /g de extracto) presentes nos extractos lipídicos de Caroço e Bagaço de Azeitona obtidos em soxhlet com hexano (Caroço hexano 1H, Caroço hexano 3H, Bagaço hexano 1H e Bagaço hexano 3H) e extractos lipídicos de Caroço e Bagaço de Azeitona obtidos usando sc-CO₂ (Ext. SC Caroço 1H, Ext. SC Caroço 3H, Ext. SC Bagaço 1H e Ext. SC Bagaço 3H).62

Figura 3.18 – Rendimento global do processo de extracção de cereja em % de g de extracto/ g de cereja.66

Figura 3.19 – Estudo comparativo para os polifenóis totais na extracção da cereja com solventes convencionais: etanol:água na proporção 50:50 (v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100% EtOH e 100%MetOH) em mg de EAG/g de extracto à esquerda e em mg EAG/g matriz à direita.67

Figura 3.20 - Estudo comparativo para os polifenóis totais extraídos para o processo global de extracção da cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente) em mg de EAG/g de cereja à esquerda e mg de EAG/ g extracto à direita.68

Figura 3.21- Perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD no c.d.o 280nm recorrendo ao HPLC-DAD do extracto de cereja saco EtOH:água 50:50 (a)), extracto de cereja saco 100% EtOH(b)) e extracto de cereja 100% MetOH(c)).69

Figura 3.22– Perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD no c.d.o 280nm dos extractos supercríticos: extracção da cereja com sc-CO₂ durante 1 hora – Etapa 1 (a)), extracção da cereja com sc-CO₂ + 10% etanol durante 1,5 horas – Etapa 2 (b)), extracção do extracto EtOH:H₂O 50:50 (v/v) com sc-CO₂ durante 1 hora – Etapa 1 (c)), extracção do extracto EtOH:H₂O 50:50 (v/v) com sc-CO₂ durante 1,5 horas – Etapa 2 (d)), extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO₂ durante 1 hora – Etapa 1 (e)).69

Figura 3.23 - Perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD no c.d.o 280nm dos extractos supercríticos: extracção do extracto EtOH:H₂O 50:50 (v/v) com sc-CO₂ durante 1 horas – Etapa 3 (a)), extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO₂ durante 1 hora – Etapa 1 (b)), extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO₂ + 10%EtOH durante 1,5 horas – Etapa 2 (c)), extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO₂ + 10%EtOH durante 1 hora – Etapa 3 (e)), extracção do extracto 100% MetOH com sc-CO₂ durante 1 hora – Etapa 1 (f)), extracção do extracto 100% MetOH com sc-CO₂ + 10% EtOH durante 1,5 horas – Etapa 2 (g)). 70

Figura 3.24 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante (μmol de CAET/ g de extracto) para extracção da cereja com solventes convencionais: etanol:água na proporção 50:50 (v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100% EtOH e 100%MetOH), nomeadamente a capacidade de resgate do radical peroxilo determinada pelo método de ORAC. 71

Figura 3.25 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante (μmol de CAET/ g de extracto) dos extractos supercríticos de cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente), nomeadamente a capacidade de resgate do radical peroxilo determinada pelo método de ORAC. 71

Figura 3.26 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante (μmol de CAEAC/ g de extracto) para extracção da cereja com solventes convencionais: etanol:água na proporção 50:50 (v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100% EtOH e 100%MetOH)), nomeadamente a capacidade de resgate do radical peroxilo determinada pelo método de HORAC..... 72

Figura 3.27 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante (μmol de CAEAC/ μL de cereja, à esquerda e μmol de CAEAC/ μL de extracto, à direita) dos extractos supercríticos de cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente), nomeadamente a capacidade de resgate do radical peroxilo determinada pelo método de HORAC..... 72

Figura 3.28 - Esquema do TLC para os extractos supercríticos do extracto de cereja 100%MetOH onde: 1 – álcool perillílico (padrão), 2 – Fracção 1: extracto obtido utilizando sc-CO₂, 3 – Fracção 2: extracto obtido utilizando CO₂+10%EtOH durante 1h30 e 4 – Fracção 3: extracto obtido utilizando CO₂+10%EtOH após extracção durante mais 1h..... 74

Figura 3.29 – Estudo comparativo das % da massa de ácido gordo/ massa de ácido gordo total existentes na amostra: óleo de girassol quando incorporamos diferentes percentagens (m/m) de extracto supercrítico de Caroço e Bagaço de Azeitona(óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de

Caroço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 0,1% sc-Caroço 3H), óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Caroço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 1% sc-Caroço 3H), óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 0,1% sc-Bagaço 3H) e óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 1% sc-Bagaço 3H)) antes e depois do teste de Rancimat. 113

Capítulo 4 - Caso de Estudo

Figura 4.1 – Efeito da incubação do extracto obtido na fracção 2 da extracção supercrítica quando se utiliza como matriz o extracto 100% MetOH na proliferação das células cancerígenas HT29 e efeito citotóxico do mesmo extracto nas células humanas do cancro do cólon Caco2. 83

Anexos

Figura A.1- Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto aquoso de caroço (Caroço C1 – a)) e extracto aquoso de bagaço de azeitona (Bagaço B1 (Dil1:5) – b)). 93

Figura A.2- Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto aquoso de caroço (Caroço C1 – a)) e extracto aquoso de bagaço de azeitona (Bagaço B1 (Dil1:5) – b)) – Ampliação 1..... 93

Figura A.3- Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto aquoso de caroço (Caroço C1 – a)) e extracto aquoso de bagaço de azeitona (Bagaço B1 (Dil1:5) – b)) – Ampliação 2..... 94

Figura A.4 - Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto com etanólico de caroço (Caroço C2 – b)) e extracto etanólico etanol de bagaço de azeitona (Bagaço B1 (Dil1:5) – a) 94

Figura A.5 – Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto com etanólico de caroço (Caroço C2 – b)) e extracto etanólico etanol de bagaço de azeitona (Bagaço B1 (Dil1:5) – a)) – Ampliação 1. 95

Figura A.6 - Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto com etanólico de caroço (Caroço C2 – b)) e extracto etanólico etanol de bagaço de azeitona (Bagaço B1 (Dil1:5) – a)) - Ampliação 2. 95

Figura A.7 - Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto EtOH:H₂O 80:20(v/v) de caroço (Caroço C3 – a)) e extracto EtOH:H₂O 80:20(v/v) de bagaço de azeitona (Bagaço B1 (Dil1:5) – b)) – Ampliação 1..... 96

Figura A.8 - Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto EtOH:H₂O 80:20(v/v) de caroço (Caroço C3 - a)) e extracto EtOH:H₂O 80:20(v/v) de bagaço de azeitona (Bagaço B1 (Dil1:5) - b)) - Ampliação 2..... 96

Figura A.9 - Rendimento em gramas de extracto por grama de caroço de azeitona (matriz) obtidos para diferentes tempos de extracção em soxhlet com hexano..... 98

Figura A.10 - Perfil da cinética de oxidação da LDL: na presença de AAPH (controlo) e do extracto de bagaço de azeitona obtido em soxhlet com hexano ao fim de 3 horas (Bagaço hexano 3H) e extractos de bagaço de azeitona obtidos utilizando sc-CO₂ por 1 e 3 horas (Ext. Bagaço Supercrítico 1H e Ext. Supercrítico 3H, respectivamente)..... 99

Figura A. 11 - Perfil da cinética de oxidação da LDL: na presença de AAPH (controlo) e do extracto de caroço de azeitona obtido em soxhlet com hexano ao fim de 3 horas (Caroço hexano 3H) e extractos de caroço de azeitona obtidos utilizando sc-CO₂ por 1 e 3 horas (Ext. Supercrítico Caroço 1H, Ext. Supercrítico Caroço 3H, respectivamente). 99

Figura A.12 - Espectro de GC obtido para o extracto de sc-Caroço 1H: RT=5.79 - C14:0; RT=8.5 - C16:0; RT=8.95 - C16:1; RT=10.33 - C17:0; RT=12.83 - C18:0; RT=13.66 - C18:1; RT=14.62 - C18:2, RT=16.42 - C18:3; RT=18.6 - C20:0; RT=19.29 - C20:1; RT=24.14 - C22:0; RT=25 - C22:1; RT=31.35 - C24:0; RT=32.21 - C24:1.....102

Figura A.13 - Espectro de GC obtido para o extracto de sc-Caroço 3H: RT=5.79 - C14:0; RT=8.52 - C16:0; RT=8.95 - C16:1; RT=10.34 - C17:0; RT=12.87 - C18:0; RT=13.7 - C18:1; RT=14.64 - C18:2, RT=16.43 - C18:3; RT=18.62 - C20:0; RT=19.3 - C20:1; RT=24.16 - C22:0; RT=25 - C22:1; RT=31.34 - C24:0; RT=32.18 - C24:1..... 102

Figura A.14 - Espectro de GC obtido para o extracto de Caroço hexano 1H: RT=8.42 - C16:0; RT=9.03 - C16:1; RT=10.32 - C17:0; RT=12.65 - C18:0; RT=13.25 - C18:1; RT=14.47 - C18:2, RT=16.36 - C18:3; RT=18.58 - C20:0; RT=19.29 - C20:1.....103

Figura A.15 - Espectro de GC obtido para o extracto de Caroço hexano 3H: RT=5.6 - C14:0; RT=8.39 - C16:0; RT=8.89 - C16:1; RT=10.27 - C17:0; RT=12.62 - C18:0; RT=13.28 - C18:1; RT=14.45 - C18:2, RT=16.33 - C18:3; RT=18.52 - C20:0; RT=19.22 - C20:1; RT=24.29 - C22:0; RT=31.00 - C24:0.....103

Figura A.16 - Espectro de GC obtido para o extracto de sc-Bagaço 1H: RT=3.61 - C16:0; RT=3.76 - C16:1; RT= 4.16 - C17:0; RT=4.77 - C18:0; RT=4.92 - C18:1; RT=5.21 - C18:2, RT=5.63 - C18:3; RT=6.11 - C20:0; RT=6.27 - C20:1; RT=7.76 - C22:0; RT=7.88 - C22:1; RT=10.18 - C24:0.....104

Figura A. 17 - Espectro de GC obtido para o extracto de sc-Bagaço 3H: RT=3.61 - C16:0; RT=3.76 - C16:1; RT=4.77 - C18:0; RT=4.92 - C18:1; RT=5.21 - C18:2, RT=5.63 - C18:3; RT=6.02 - C20:0; RT=6.27 - C20:1; RT=7.82 - C22:0; RT=10.2 - C24:0..... 104

Figura A. 18 - Espectro de GC obtido para o extracto de Bagaço hexano 1H: RT=2.71 – C14:0; RT=3.57 – C16:0; RT=3.76 – C16:1; RT=4.71 – C18:0; RT=4.92 – C18:1; RT=5.21 – C18:2, RT=5.63 – C18:3; RT=6.02 – C20:0; RT=10.2 – C24:0.....105

Figura A. 19 - Espectro de GC obtido para o extracto de Bagaço hexano 3H: RT=2.27 – C14:0; RT=3.58 – C16:0; RT=3.77 – C16:1; RT=4.72 – C18:0; RT=4.92 – C18:1; RT=5.21 – C18:2, RT=5.63 – C18:3; RT=6.04 – C20:0; RT=6.27 – C20:1.....105

Figura A.20 - Estudo comparativo do perfil dos ácidos gordos (g Ácido Gordo/ g de matriz) presentes nos extractos lipídicos de Caroço e Bagaço de Azeitona obtidos em soxhlet com hexano (Caroço hexano 1H, Caroço hexano 3H, Bagaço hexano 1H e Bagaço hexano 3H) e extractos lipídicos de Caroço e Bagaço de Azeitona obtidos usando sc-CO₂ (Ext. SC Caroço 1H, Ext. SC Caroço 3H, Ext. SC Bagaço 1H e Ext. SC Bagaço 3H).....106

Figura A.21 - Espectro de GC obtido para o óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Caroço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 0,1% sc-Caroço 3H) antes do teste de rancimat: RT=2.74 – C14:0; RT=3.63 – C16:0; RT=3.77 – C16:1; RT=4.09 – C17:0; RT=4.83 – C18:1; RT=5.65 – C18:3; RT=6.02 – C20:0; RT=6.2 – C20:1.109

Figura A.22 - Espectro de GC obtido para o óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Caroço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 0,1% sc-Caroço 3H) depois do teste de rancimat: RT=2.73 – C14:0; RT=3.63 – C16:0; RT=3.77 – C16:1; RT=4.17 – C17:0; RT=4.69 – C18:0; RT=4.96 – C18:1; RT=5.27 – C18:2, RT=5.59 – C18:3; RT=6.01 – C20:0; RT=6.28 – C20:1; RT=7.87 – C22:0; RT=8.2 – C22:1; RT=10.19 – C24:0.109

Figura A.23 - Espectro de GC obtido para o óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Caroço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 1% sc-Caroço 3H) antes do teste de rancimat: RT=2.73 – C14:0; RT=3.63 – C16:0; RT=3.77 – C16:1; RT=4.08 – C17:0; RT=4.83 – C18:1; RT=5.6 – C18:3; RT=6.01 – C20:0; RT=6.2 – C20:1; RT=7.83 – C22:0.....110

Figura A.24 - Espectro de GC obtido para o óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Caroço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 1% sc-Caroço 3H) depois do teste de rancimat: RT=2.74 – C14:0; RT=3.63 – C16:0; RT=3.77 – C16:1; RT=4.25 – C17:0; RT=4.68 – C18:0; RT=4.96 – C18:1; RT=5.27 – C18:2; RT=5.59 – C18:3; RT=6.13 – C20:0; RT=6.28 – C20:1; RT=7.87 – C22:0; RT=8.21 – C22:1; RT=10.21 – C24:0.....110

Figura A.25 - Espectro de GC obtido para o óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 0,1% sc-Bagaço 3H) antes do teste de rancimat: RT=2.73 – C14:0; RT=3.63 – C16:0; RT=3.77 – C16:1; RT=4.08 – C17:0; RT=4.82 – C18:1; RT=5.6 – C18:3; RT=6.01 – C20:0; RT=6.19 – C20:1.....111

Figura A.26 - Espectro de GC obtido para o óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 0,1% sc-Bagaço 3H) depois do teste de rancimat: RT=2.73 - C14:0; RT=3.63 - C16:0; RT=3.77 - C16:1; RT=4.24 - C17:0; RT=4.66 - C18:0; RT=4.96 - C18:1; RT=5.27 - C18:2; RT=5.59 - C18:3; RT=6.01 - C20:0; RT=6.28 - C20:1; RT=7.87 - C22:0; RT=10.21 - C24:0.....111

Figura A.27 - Espectro de GC obtido para o óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 1% sc-Bagaço 3H) antes do teste de rancimat: RT=2.74 - C14:0; RT=3.63 - C16:0; RT=3.77 - C16:1; RT=4.09 - C17:0; RT=4.82 - C18:1; RT=5.6 - C18:3; RT=6.01 - C20:0; RT=6.2 - C20:1; RT=10.21 - C24:0112

Figura A.28 - Espectro de GC obtido para o óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 1% sc-Bagaço 3H) depois do teste de rancimat: RT=2.73 - C14:0; RT=3.63 - C16:0; RT=3.77 - C16:1; RT=4.26 - C17:0; RT=4.67 - C18:0; RT=4.96 - C18:1; RT=5.27 - C18:2; RT=5.59 - C18:3; RT=6.01 - C20:0; RT=6.28 - C20:1; RT=7.87 - C22:0; RT=8.2 - C22:1; RT=10.19 - C24:0.....112

Figura A.29 - Espectro de GC obtido para o extracto de Caroço hexano 1H: TR=2.41 - Glicerol; TR=20.86 - Esqualeno; TR=22.49 - δ -tocoferol; TR=25.40 - γ -tocoferol; TR=30.25 - Colesterol; TR=31.59 - β -sitosterol; TR=35.57 - Esterol; TR=37.09 - HDS.....118

Figura A.30 - Espectro de GC obtido para o extracto de Caroço hexano 3H: TR=2.77 - Glicerol; TR=20.79 - Monoleína; TR=22.36 - Esqualeno; TR=23.03 - β -tocoferol; TR=25.19 - Colesterol; TR=29.80 - Campesterol; TR=30.16 - Stigmasterol; TR=31.07 - β -Sitosterol; TR=32.06 - Esterol; TR=32.83 - Esterol; TR=33.99 - Esterol; TR=35.29 - Esterol e TR=36.71 - HDS.....118

Figura A.31 - Espectro de GC obtido para o extracto de sc-Caroço 1H: TR=2.68 - Glicerol; TR=19.29 - Monoleína; TR=20.51 - Esqualeno; TR=21.94 - β -tocoferol; TR=22.52 - δ -tocoferol; TR=24.26 - γ -tocoferol; TR=25.00 - Colesterol; TR=26.26 - Campesterol; TR=28.68 - β -Sitosterol; TR=30.02 - Esterol; TR=30.84 - Esterol; TR=31.47 - Esterol; TR=32.28 - Esterol; TR=32.52 - Esterol e TR=33.13 - HDS.119

Figura A.32 - Espectro de GC obtido para o extracto de sc-Caroço 3H: TR=2.70 - Glicerol; TR=19.23 - Monoleína; TR=20.61 - Esqualeno; TR=21.85 - β -tocoferol; TR=22.68 - δ -tocoferol; TR=23.31 - γ -tocoferol; TR=24.71 - Colesterol; TR=25.14 - Campesterol; TR=29.09 - β -Sitosterol; TR=30.24 - Esterol; TR=30.98 - Esterol; TR=31.58 - Esterol; TR=32.62 - Esterol e TR=33.19 - HDS.....119

Figura A.33 - Espectro de GC obtido para o extracto de Bagaço Hexano 1H:TR=2.64 - Glicerol; TR=19.38 - Monoleína; TR=22.02 - β -Tocoferol; TR=24.18 - Colesterol; TR=24.85 - Campesterol; TR=26.07 - Stigmasterol; TR=28.41 - β -sitosterol; TR=29.77 - Esterol; TR=31.29 - Esterol; TR=31.95 - Esterol; TR=32.53 - Esterol e TR=33.14 - HDS.....120

Figura A.34 – Espectro de GC obtido para o extracto de Bagaço hexano 3H: TR=2.67 – Glicerol; TR=19.36 – Monoleína; TR=20.14 – Esqualeno; TR=21.92 – β -Tocoferol; TR=22.42 – δ -Tocoferol; TR=23.18 – γ -Tocoferol; TR=24.17 – Colesterol; TR=24.84 – Campesterol, TR=26.07 – Stigmasterol; TR=28.23 – β -sitosterol; TR=29.77 – Esterol; TR=30.83 – Esterol; TR=31.29 – Esterol; TR=31.93 – Esterol; TR=32.52 – Esterol e TR=33.13 – HDS.....120

Figura A.35 – Espectro de GC obtido para o extracto de sc-Bagaço 1H: TR=2.66 – Glicerol; TR=19.43 – Monoleína; TR=20.27 – Esqualeno; TR=22.06 – β -Tocoferol; TR=22.63 – δ -Tocoferol; TR=23.20 – γ -Tocoferol; TR=25.08 – Colesterol; TR=28.72 – β -Sitosterol; TR=30.11 – Esterol; TR=30.89 – Esterol; TR=31.37 – Esterol; TR=32.30 – Esterol; TR=32.57 – Esterol e TR=33.16 – HDS.....121

Figura A.36 – Espectro de GC obtido para o extracto de sc-Bagaço 1H: TR=2.68 – Glicerol; TR=19.60 – Monoleína; TR=20.42 – Esqualeno; TR=22.27 – β -Tocoferol; TR=23.58 – Colesterol; TR=25.52 – Campesterol; TR=29.32 – β -Sitosterol; TR=30.51 – Esterol; TR=31.58 – Esterol; TR=32.68 – Esterol e TR=33.28 – HDS.....121

Figura A.37 - Estudo comparativo do perfil de esteróis (mg de esterol /g de matriz) presentes nos extractos lipídicos de Carço e Bagaço de Azeitona obtidos em soxhlet com hexano (Carço hexano 1H, Carço hexano 3H, Bagaço hexano 1H e Bagaço hexano 3H) e extractos lipídicos de Carço e Bagaço de Azeitona obtidos usando sc-CO₂ (Ext. SC Carço 1H, Ext. SC Carço 3H, Ext. SC Bagaço 1H e Ext. SC Bagaço 3H).....122

Figura A.38 - Perfis cromatográficos determinado por HPLC-DAD no c.d.o 360nm do extracto de cereja saco EtOH:água 50:50 (v/v)(c)), extracto de cereja saco 100% EtOH (b)) e extracto de cereja 100% MetOH (a)).....125

Figura A.39- Perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD no c.d.o 360nm dos extractos supercríticos: extracção da cereja com sc-CO₂ durante 1 hora – Fracção 1 (e)), extracção da cereja com sc-CO₂ + 10% etanol durante 1,5 horas – Fracção 2 (a)), extracção do extracto EtOH:H₂O 50:50 (v/v) com sc-CO₂ durante 1 hora –Fracção 1 (c)), extracção do extracto EtOH:H₂O 50:50 (v/v) com sc-CO₂ durante 1,5 horas – Fracção 2 (b)), extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO₂ durante 1 hora –Fracção 1 (d)).....125

Figura A.40 - Perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD no c.d.o 360nm dos extractos supercríticos: extracção do extracto EtOH:H₂O 50:50 (v/v) com sc-CO₂ durante 1 horas – Fracção 3 (e)), extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO₂ durante 1 hora – Fracção 1 (d)), extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO₂ + 10%EtOH durante 1,5 horas – Fracção 2 (c)), extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO₂ + 10%EtOH durante 1 hora – Fracção 3 (b)), extracção do extracto 100% MetOH com sc-CO₂ durante 1 hora – Fracção 1 (a)).....126

Figura A.41 – Perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD no c.d.o 360nm dos extractos supercríticos: extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO₂ + 10%EtOH durante 1,5 horas – Fracção 2

(a)), extracção do extracto 100% MetOH com sc-CO₂ + 10%EtOH durante 1,5 horas – Fracção 2 (b)), extracção do extracto 100% MetOH com sc-CO₂ durante 1 hora – Fracção 3 (c)).....126

Figura A. 42 – Esquema do TLC para os extractos supercríticos de cereja onde: 1 – álcool perillíco (padrão), 2 – extracto de cereja obtido sc-CO₂ e 3 – extracto de cereja obtido após a extracção com sc-CO₂ utilizando sc-CO₂+10%EtOH.....130

Figura A. 43 - Esquema do TLC para os extractos supercríticos do extracto de cereja EtOH:H₂O 50:50 onde: 1 – álcool perillíco (padrão), 2 – extracto obtido utilizando sc-CO₂, 3 – extracto obtido utilizando CO₂+10%EtOH durante 1h30 e 4 - extracto obtido utilizando CO₂+10%EtOH após extracção durante mais 1h.130

Figura A. 44 - Esquema do TLC para os extractos supercríticos do extracto de cereja 100%EtOH onde: 1 – álcool perillíco (padrão), 2 – extracto obtido utilizando sc-CO₂, 3 – extracto obtido utilizando CO₂+10%EtOH durante 1h30 e 4 - extracto obtido utilizando CO₂+10%EtOH após extracção durante mais 1h.....130

Índice de Tabelas

Capítulo 1 -Introdução

Tabela 1.1– Valores característicos de um gás, líquido e estado supercrítico: densidade, difusividade e viscosidade(Brunner, 2005).9

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

Tabela 2.1 – Amostras preparadas para realizar o teste de rancimat e avaliar a influência da adição dos extractos supercríticos de caroço e bagaço de azeitona ao óleo de girassol na estabilidade oxidativa....35

Capítulo 3 - Apresentação e Discussão de Resultados

Tabela 3.1 – Metodologia aplicada no processo de extracção supercrítica65

Capítulo 4 - Caso de Estudo

Tabela 4.1– Valores de ED50 em mg extracto/ml dos diferentes extractos supercríticos de cereja testados.....82

Anexos

Tabela A.1 – Massas dos compostos necessários para preparar 1 litro de PBS (75mM, pH 7.4).97

Tabela A.2 – Gramas de ácido gordo existentes por gramas de extracto de Bagaço de Azeitona (g Ac. Gordo/g exgtracto) obtidos utilizando metodologias diferentes: a extracção em soxhlet com hexano durante 1 hora e 3 horas (Bagaço Hexano 1H e Bagaço Hexano 3H, respectivamente) e extracção com sc-CO2 durante 1 hora e 3 horas (Ext. SC Bagaço 1H e Ext. SC Bagaço 3H, respectivamente). 107

Tabela A.3 - Gramas de ácido gordo existentes por gramas de matriz (Bagaço de Azeitona) (g Ac. Gordo/g matriz)) utilizando metodologias diferentes: a extracção em soxhlet com hexano durante 1 hora e 3 horas (Bagaço Hexano 1H e Bagaço Hexano 3H, respectivamente) e extracção com sc-CO2 durante 1 hora e 3 horas (Ext. SC Bagaço 1H e Ext. SC Bagaço 3H, respectivamente) ¹. 107

Tabela A.4 - Gramas de ácido gordo existentes por gramas de extracto de Caroço de Azeitona (g Ac. Gordo/g de extracto) obtidos utilizando metodologias diferentes: a extracção em soxhlet com hexano durante 1 hora e 3 horas (Caroço Hexano 1H e Caroço Hexano 3H, respectivamente) e extracção com sc-CO2 durante 1 hora e 3 horas (Ext. SC Caroço 1H e Ext. SC Caroço 3H, respectivamente). 108

Tabela A.5 - Gramas de ácido gordo existentes por gramas de matriz (Caroço de Azeitona) (g Ac. Gordo/g matriz) utilizando metodologias diferentes: a extracção em soxhlet com hexano durante 1 hora e 3 horas (Caroço Hexano 1H e Caroço Hexano 3H, respectivamente) e extracção com sc-CO2 durante 1 hora e 3 horas (Ext. SC Caroço 1H e Ext. SC Caroço 3H, respectivamente) ¹. 108

Tabela A.6 – Estudo comparativo da % da massa de ácido gordo/ massa de ácido gordo total existentes no óleo de girassol quando incorporamos diferentes percentagens (m/m) de extracto supercrítico de Caroço de Azeitona: óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Caroço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 0,1% sc-Caroço 3H) e óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Caroço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 1% sc-Caroço 3H) antes e depois do teste de rancimat. 114

Tabela A.7 - Estudo comparativo % da massa de ácido gordo/ massa de ácido gordo total existentes no óleo de girassol quando incorporamos diferentes percentagens (m/m) de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona: óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 1 hora (óleo de girassol + 0,1% sc-Bagaço 1H), óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol +0,1% sc-Bagaço 3H) e óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol +1% sc-Bagaço 3H) antes e depois do teste de rancimat. 114

Tabela A. 8 – Quantificação dos esteróis presentes nos extractos de bagaço de azeitona em miligramas de esterol existentes por gramas de extracto (mg de esterol/ g de extracto) e em miligramas de esterol por grama de matriz (Bagaço de Azeitona) (mg esterol/ g matriz) utilizando metodologias diferentes: a extracção em soxhlet com hexano durante 1 hora e 3 horas (Bagaço Hexano 1H e Bagaço Hexano 3H, respectivamente) e extracção com sc-CO2 durante 1 hora e 3 horas (Ext. SC Bagaço 1H e Ext. SC Bagaço 3H, respectivamente). 123

Tabela A.9 - Quantificação dos esteróis presentes nos extractos de Caroço de azeitona em miligramas de esterol existentes por gramas de extracto (mg de esterol/ g de extracto) e em miligramas de esterol por grama de matriz (Caroço de Azeitona) (mg esterol/ g matriz) utilizando metodologias diferentes: a extracção em soxhlet com hexano durante 1 hora e 3 horas (Caroço Hexano 1H e Caroço Hexano 3H, respectivamente) e extracção com sc-CO₂ durante 1 hora e 3 horas (Ext. SC Caroço 1H e Ext. SC Caroço 3H, respectivamente)¹..... 123

Tabela A. 10 – Rendimentos em % (g extracto/ g de matéria no extractor) obtidos para a extracção supercrítica da cereja e dos extractos de cereja (segundo passo do processo global de extracção) obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente)..... 124

Tabela A. 11 - Rendimentos em % (g extracto/ g de cereja) obtidos para o processo global de extracção da cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente)..... 124

Tabela A. 12 - Polifenóis totais extraídos para o processo global de extracção da cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente) em mg de EAG/ g extracto. 127

Tabela A. 13 - Polifenóis totais extraídos para o processo global de extracção da cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente) em mg de EAG/ g cereja. 127

Tabela A. 14 - Capacidade Antioxidante (μmol de CAET/ g de matriz) dos extractos supercríticos de cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente), nomeadamente o capacidade de resgate do radical peroxilo determinada pelo método de ORAC. 128

Tabela A. 15 - Capacidade Antioxidante (μmol de CAET/ g de extracto) dos extractos supercríticos de cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente), nomeadamente o capacidade de resgate do radical peroxilo determinada pelo método de ORAC. 128

Tabela A.16 - Capacidade Antioxidante (μmol de CAEAC/ g de matriz) dos extractos supercríticos de cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente), nomeadamente o capacidade de resgate do radical hidroxilo determinada pelo método de HORAC..... 129

Tabela A.17 -Capacidade Antioxidante (μmol de CAEAC/ g de extracto) dos extractos supercríticos de cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente), nomeadamente o capacidade de resgate do radical hidroxilo determinada pelo método de HORAC..... 129

Capítulo 1 - Introdução

Introdução

Historicamente, os frutos e outros vegetais, para além do seu valor alimentar, têm sido utilizados como agentes medicinais. Especialmente nas últimas duas décadas, a comunidade científica começou a reconhecer o valor destes alimentos para além da sua contribuição mineral e do seu papel na prevenção de deficiências vitamínicas. Um elevado número de fitoquímicos (compostos bioactivos não nutrientes das plantas) foram identificados nos frutos e outros vegetais, e têm sido relacionados com a redução do risco de doenças crónicas, especialmente as do foro oncológico. Para além disso, são reconhecidos outros efeitos benéficos na saúde, ligados à prevenção de doenças coronárias, à manutenção de uma boa estrutura óssea e ao controlo saudável do peso corporal. Julga-se que estes benefícios estejam associados ao efeito sinérgico dos diversos constituintes presentes, tanto nos frutos como nos vegetais em geral (Gonçalves, et al., 2007).

Os **compostos fenólicos** são componentes importantes de muitas frutas, vegetais e bebidas, contribuindo para a sua coloração e propriedades sensoriais como o gosto amargo e adstringência. Tem crescido o interesse nas antocianinas devido à sua solubilidade em água, fácil incorporação em sistemas aquosos e aos seus efeitos benéficos para a saúde humana (Mozetic, Trebse, & Hribar, 2002). Estudos epidemiológicos têm mostrado que o consumo de alimentos ricos em polifenóis está correlacionado com a redução da incidência de doenças cardíacas. Encontra-se descrito na literatura que os compostos fenólicos retardam a progressão da arteriosclerose por actuarem como antioxidantes na presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Mozetic, Trebse, & Hribar, 2002).

Segundo vários autores um **antioxidante** é uma substância que existe no alimento que diminui significativamente os efeitos adversos das **espécies reactivas de oxigénio** (ROS – *Reactive Oxygen Species*) e/ou das espécies reactivas de azoto na função fisiológica normal no homem (Umberto Cornelli, 2009). As ROS e as espécies reactivas de azoto são geradas a partir de processos fisiológicos de produção de energia e metabolitos para gerar defesas contra microrganismos invasivos (Umberto Cornelli, 2009). As principais espécies reactivas de oxigénio responsáveis por danos oxidativos no organismo humano, o stress oxidativo, são o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$), o singleto de oxigénio (1O_2) e o peróxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (Huang, Ou, & L. Prior, 2005).

Introdução

O stress oxidativo pode ocorrer em caso de falta de defesa antioxidante ou caso aumentem os processos oxidativos no corpo. O stress oxidativo tem que ser uma condição temporária, porque caso este se torne permanente pode determinar o aparecimento de uma doença. Estão reportadas muitas doenças relacionadas com a existência de stress oxidativo, tais como doenças cardiovasculares, cancro, desordens neurológicas e endocrinologias (Umberto Cornelli, 2009).

Um equilíbrio apropriado entre a oxidação e os antioxidantes é fundamental para a vida. A relação entre os antioxidantes e a sua influência no stress oxidativo só pode ser compreendida com o conhecimento dos mecanismos que geram a oxidação, a actividade dos antioxidantes endógenos e os que são fornecidos através dos alimentos ou suplementos (Umberto Cornelli, 2009).

Alguns dos alimentos que são reconhecidos pelas suas propriedades benéficas para a saúde humana são as azeitonas e as cerejas, frutos utilizados no projecto que deu origem a esta dissertação.

1.1. Azeitona

O **azeite** é a principal gordura consumida em países de dieta normalmente reconhecida como dieta mediterrânea. A dieta mediterrânea identifica-se por ser rica em frutas, vegetais, peixe e, em particular, associada ao consumo regular de azeite (Matias, 2008). O azeite é, por si só, considerado como um alimento funcional, já que a sua composição reúne um elevado teor de gordura insaturada (MUFAS), nomeadamente ácido oleico, e compostos de menor peso molecular com propriedades biológicas já conhecidas (Visioli, Bogani, Grande, & Galli, 2004), (Matias, 2008). O conteúdo nesses compostos de menor peso molecular, com natural actividade antioxidante, varia consoante o tipo de cultivar da azeitona, o clima a que esteve sujeita a oliveira, o grau de maturação da azeitona na altura da colheita e o processo de extracção/ produção de azeite (Visioli, Bogani, Grande, & Galli, 2004).

Os compostos de menor peso molecular dividem-se em duas fracções distintas, a fracção insaponificável e a fracção saponificável. A fracção saponificável é constituída por compostos fenólicos, responsáveis por conferir características específicas ao azeite, tais como, sabor, aroma e protecção da oxidação (Morello, Vuorela, Romero, Motilva, & Heinonen, 2008). A fracção insaponificável é construída por compostos fenólicos hidrofílicos, com coeficientes de partição (azeite/ água) muito baixos, existindo em concentrações muito reduzidas na matriz lipídica (Visioli, Bogani, Grande, & Galli,

Introdução

2004). As azeitonas constituem uma grande parte da dieta mediterrânea e a sua produção mundial chegou a um total de 1,762,000 toneladas em 2005/2006 (López-López, Montañó, Ruíz-Méndez, & Garrido-Fernández, 2008).

Com o aparecimento no mercado de cada vez mais variedades de produtos derivados de azeitona, como as azeitonas recheadas, as indústrias de produção de azeitona de mesa procuram encontrar uma alternativa para a utilização do caroço de azeitona e valorizar o resíduo. Os resíduos de azeitona utilizados neste trabalho eram da variedade **hojiblanca**. O nome desta variedade vem da cor da sua folha que apresenta um aspecto prateado a distância, principalmente com os raios do sol da manhã. Variedade de fácil enraizamento e resistente a solos calcários é considerada rústica pela resistência à seca e tolerância ao frio invernal. Os frutos apresentam elevada resistência ao desprendimento, o que dificulta a colheita mecanizada (Sovena Group, 2008) (Revista Digital De Gastronomía Mediterránea, 2009). A *hojiblanca* é a terceira variedade mais comum em Espanha, depois das variedades *picual* e *cornicabra*. A superfície de cultivo alcança 220.000 ha. A sua área de influência estende-se pela Andaluzia, mais especificamente na região de Sevilha, a sul de Córdoba e todo o norte de Málaga. Cerca de 16% das oliveiras da Andaluzia são da variedade Hojiblanca, sendo que esta é usada tanto para azeitona de mesa, por possuir uma polpa de textura firme, como para a produção de azeite. O rendimento em azeite é baixo, mas muito apreciado pela sua qualidade, embora de baixa estabilidade (Revista Digital De Gastronomía Mediterránea, 2009).

Dados os efeitos benéficos na saúde, os compostos antioxidantes presentes nos óleos vegetais, como o azeite, têm recebido uma enorme atenção por parte da comunidade científica. Os principais antioxidantes presentes nos óleos são os tocoferóis e os compostos fenólicos. Os polifenóis são reconhecidos por desempenharem um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares, doenças oncológicas e envelhecimento prematuro (Gomes, Delcuratolo, & Paradiso, 2008). O azeite possui quantidades de tocoferol inferiores aos outros óleos vegetais, no entanto possui outros antioxidantes em grande quantidade como o esqualeno (Owen, Mier, Giavosa, Hull, Spiegelhalder, & Bartsch, 2000).

Estudos clínicos demonstraram que o consumo de **esteróis vegetais**, também chamados de fitoesteróis, como parte de uma dieta normal ou na forma de suplementos pode diminuir os níveis de colesterol no sangue por inibição da sua absorção no intestino. Os fitoesteróis têm também sido reconhecidos pelas suas propriedades

Introdução

preventivas do aparecimento de cancro, no entanto este facto ainda se encontra em estudo (López-López, Montanõ, Ruíz-Méndez, & Garrido-Fernández, 2008).

1.2. Cereja

A produção da **Cereja** Cova da Beira – IGP (*Indicação Geográfica Protegida*) desenvolve-se entre as Serras da Gardunha, da Estrela e da Malcata, na Cova da Beira, região com excelentes condições climáticas para a fruticultura, e solos de condições ideais para o desenvolvimento da cerejeira. A Cereja Cova da Beira é uma das espécies fruteiras de maior peso na economia agrícola regional da Cova da Beira. De entre as muitas variedades de cerejeiras, existem algumas autóctones, como a “De Saco” ou “Saco da Cova da Beira” (Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Centro, 2008).

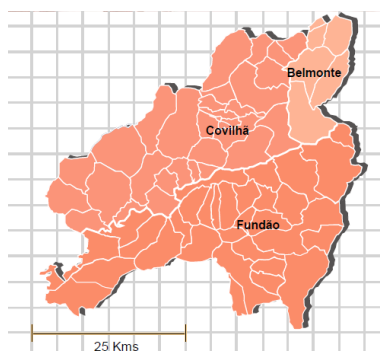


Figura 1.1 - A área geográfica correspondente à produção da Cereja Cova da Beira abrange cerca de 1 374 km² e compreende os seguintes concelhos do distrito de Castelo Branco: Fundão - com maior representatividade nas freguesias de Alcongesta, Alcaide, Souto da Casa, Aldeia de Joanes, Alpedrinha e Castelo Novo; Covilhã - com maior representatividade nas freguesias de Ferro, Peraboa, Tortosendo e Dominguiso; Belmonte (Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Centro, 2008).

A Cereja Cova da Beira – IGP é de consistência firme e carnuda e sabor muito doce, cuja coloração vai do vermelho vivo ao vermelho-púrpura, podendo no caso de algumas variedades ser do vermelho ao alaranjado. O uso da Indicação Geográfica Protegida obriga a que a cereja seja produzida de acordo com as regras estipuladas no caderno de especificações, o qual inclui, designadamente, as condições de produção, colheita e embalamento do produto (Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Centro, 2008). Estas regras levam ao aparecimento de excedentes de produção como o refugo, cereja que não cumpre os requisitos para ser comercializada. Com este trabalho pretende-se encontrar uma forma viável para a utilização deste excedente de forma a valorizar um subproduto da produção de cereja.

A cereja é um fruto especialmente atractivo para o consumidor pelos seus atributos cromático e de sabor, bem como pela riqueza nalguns nutrientes com forte impacto no bem-

Introdução

estar e na saúde humano. De facto, o consumo de frutos e vegetais está associado à redução do risco de várias patologias, tais como o cancro, doenças cardiovasculares e arteriosclerose, atribuída à existência de múltiplos constituintes antioxidantes, tais como vitaminas, carotenoides e compostos fenólicos (ácidos hidrocínâmicos) e flavonóides (antocianinas) (Gonçalves, et al., 2007).

As cerejas são fontes importantes de ácidos fenólicos e Bourne e Rice-Evans (1999) constataram que os ácidos hidroxicínâmicos e os flavonoides de uma grande diversidade de frutos, incluindo a cereja, são facilmente absorvidos. Existem estudos que revelaram que a presença de rutina e de outros fenólicos, como a catequina, epicatequina e antocianinas, na cereja que fazem deste fruto uma fonte importante de antioxidantes para a saúde. Estes autores verificaram ainda que os compostos fenólicos dos extractos das cerejas inibiram a oxidação das LDL *in vitro*, em que 20µM de equivalentes de ácido gálico bloqueou completamente a oxidação das LDL. Observou-se também que a concentração de compostos fenólicos foi positivamente correlacionada com a actividade antioxidante (Gonçalves, et al., 2007).

As cerejas são consideradas como a maior fonte de compostos fenólicos, que são responsáveis pela sua coloração e gosto e provavelmente também pelas suas propriedades antioxidantes (Gonçalves, et al., 2004). O maior grupo de compostos fenólicos presentes nas cerejas são antocianinas, especialmente nas cerejas que possuem uma coloração vermelho escuro (Mozetic, Trebse, & Hribar, 2002), (Gonçalves, et al., 2004). Uma vez que os compostos fenólicos não são sintetizados pelo organismo humano, sendo representativos da parte não energética da nossa dieta, têm de ser obtidos através da ingestão de certos alimentos ou da introdução na dieta alimentar de suplementos nutritivos (Gonçalves, et al., 2007).

Um grande número de compostos existentes nos produtos naturais têm se mostrado muito úteis para utilização como fitofármacos no tratamento de várias doenças, um bom exemplo destes compostos é o **álcool perilílico**, NSC-641066, um monoterpene cíclico, derivado do *d*-limoneno, um aditivo alimentar aprovado pela *Food and Drug Administration* (Lee, Lee, Kim, Lee, & row, 2000).

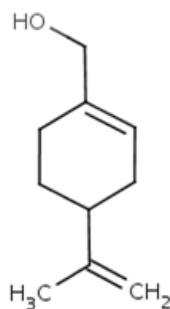


Figura 1.2 – Estrutura química do álcool perilílico.

Os monoterpenos são um dos grupo de compostos mais simples presente nos produtos naturais provenientes das plantas, reconhecidos por possuírem efeitos quimioprotectores contra o cancro da mama, fígado e pulmões. Vários estudos demonstraram que a inclusão de frutos e vegetais na dieta, principais fontes de fitoquímicos e micronutrientes, pode reduzir o risco de desenvolver cancro (Jung & Row, 1998).

O álcool perilílico encontra-se presente em várias plantas, como a menta, lavanda, limão, cerejas e amoras, e pode ser utilizado como fragrância em perfumes, sabonetes, detergentes, loções e cremes este composto é referido em diversos estudos possuidor de potencial para prevenir e tratar uma grande variedade de cancros, nomeadamente o cancro de mama (Lee, Lee, Kim, Lee, & row, 2000) (Satomi, Miyamoto, & Gould, 1999), (Matos, et al., 2008).

1.3. Fluido Supercrítico

Um componente puro está no estado supercrítico quando a sua temperatura e pressão são superiores aos seus valores críticos (T_c e p_c , respectivamente). No estado supercrítico não há variações súbitas das propriedades do componente (Brunner, 2005).

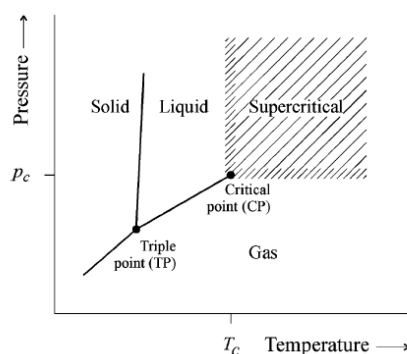


Figura 1.3 – Diagrama de fases onde se observa o ponto crítico e a zona onde um composto puro se encontram no estado supercrítico (Brunner, 2005).

Introdução

No estado supercrítico as substâncias apresentam densidades aproximadas às do estado líquido, por sua vez a viscosidade encontra-se próxima à dos gases e a difusividade é aproximadamente duas ordens de grandeza superior à de um líquido, tal como se pode verificar pela tabela seguinte (Brunner, 2005).

Tabela 1.1– Valores característicos de um gás, líquido e estado supercrítico: densidade, difusividade e viscosidade (Brunner, 2005).

State of the fluid	Density (g/cm ³)	Diffusivity (cm ² /s)	Viscosity (g/cm/s)
<i>Gas</i> $p = 1 \text{ atm}, T = 15\text{--}30^\circ\text{C}$	$(0.6\text{--}2.0) \times 10^{-3}$	0.1–0.4	$(0.6\text{--}2.0) \times 10^{-4}$
<i>Liquid</i> $p = 1 \text{ atm}, T = 15\text{--}30^\circ\text{C}$	0.6–1.6	$(0.2\text{--}2.0) \times 10^{-5}$	$(0.2\text{--}3.0) \times 10^{-2}$
<i>Supercritical fluid</i> $p = p_c, T \approx T_c$	0.2–0.5	0.7×10^{-3}	$(1\text{--}3) \times 10^{-4}$
$p = 4p_c, T \approx T_c$	0.4–0.9	0.2×10^{-3}	$(3\text{--}9) \times 10^{-4}$

1.4. Tecnologia Supercrítica

Os fluidos supercríticos têm sido utilizados como solventes numa grande variedade de aplicações tais como a extracção de óleos essenciais, extracção de cationes metálicos, síntese de polímeros e formação de partículas (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007). No final da década de sessenta, surgiram várias patentes de processos usando fluidos supercríticos como solventes de extracção de aromas e lipídios. A aplicação comercial da extracção supercrítica foi iniciada em 1978, com a extracção da cafeína do café (Bernardo-Gil, Ribeiro, & Esquível).

As propriedades dos fluidos supercríticos que possuem maior influência na extracção são a densidade, a viscosidade e o coeficiente de difusão. A densidade toma valores que se aproximam aos dos líquidos, por sua vez a viscosidade e do coeficiente de difusão tomam valores próximos aos dos gases. Estas propriedades, em particular a densidade, podem ser alteradas com pequenas variações de pressão e/ou temperatura, permitindo desta forma conseguir o fraccionamento do extracto. Na zona próxima do ponto crítico é onde se produzem, com pequenas alterações de pressão e temperatura, as maiores variações da densidade do fluido supercrítico, e por consequência do seu poder solvente (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007).

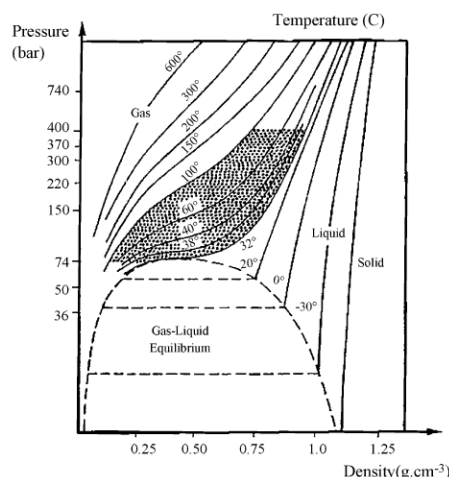


Figura 1.4 – Diagrama pressão – densidade para o dióxido de carbono. A área a sombreado corresponde ao domínio experimental correspondente à fase supercrítica (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007) .

1.5. Extração Supercrítica

Mais de 90% de todas as extracções supercríticas são realizadas utilizando dióxido de carbono (CO_2) este solvente apresenta várias vantagens: não cria problemas ambientais, não é tóxico nas quantidades utilizadas, o que o torna adequado para a utilização na indústria alimentar, não é inflamável e é praticamente inerte sob o ponto de vista químico. Quando se recorre ao sc-CO_2 para a extração de ingredientes biofuncionais não são, normalmente, necessários processos subsequentes de limpeza dos extractos pois o CO_2 é facilmente separado do produto que se pretende extrair através da alteração das condições de pressão e temperatura. Este solvente pode ser utilizado a temperaturas moderadas, geralmente inferiores a $50\text{ }^\circ\text{C}$, sendo apropriado quando existe perigo de degradação térmica dos compostos que pretendemos extrair. A utilização deste solvente permite que o oxigénio seja eficientemente eliminado da matriz do soluto, prevenindo, assim, oxidações e reacções de auto-oxidação que levariam à degradação dos compostos a extrair (Perretti, Montanari, & Fantozzi, 2006), (Adil, Í. H.; Yener, M. E.; Bayindirh, 2008), (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007).

A extração supercrítica com dióxido de carbono no estado supercrítico (sc-CO_2) é uma alternativa aos métodos convencionais, apresentando-se por tudo o que já foi referido anteriormente como uma tecnologia limpa que permite ajustar a selectividade dos compostos e obter extractos ricos em compostos biofuncionais (Perretti, Montanari, & Fantozzi, 2006), (Adil, Í. H.; Yener, M. E.; Bayindirh, 2008).

A utilização desta tecnologia apresenta algumas desvantagens, por exemplo o equilíbrio de fases entre o solvente supercrítico e o soluto pode ser muito complexo. A adição de

co-solventes permite alterar a polaridade do CO₂, mas podem ficar resíduos desses solventes no extracto, sendo necessário um processo subsequente de eliminação dessas impurezas, esta adição de co-solventes altera o diagrama de equilíbrio de fases, complicando a realização do ‘scale-up’, o que prejuzifica economicamente o processo. As altas pressões há dificuldade de introdução contínua de sólidos no extractor e todo o equipamento tem que ser muito bem otimizado, os custos operatórios são elevados, o que torna não rentável a substituição da maior parte dos processos de extracção existentes realizados recorrendo a solventes orgânicos, sendo, sobretudo na extracção de produtos de alto valor acrescentado (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007), (Adil, Í. H.; Yener, M. E.; Bayindirh, 2008), (Perretti, Montanari, & Fantozzi, 2006).

Os fluidos supercríticos sendo muito selectivos são altamente eficientes para a extracção de matrizes complexas, e estão cada vez mais a ser reconhecidos como os melhores substitutos dos solventes orgânicos nas operações de extracção. Os fluidos supercríticos podem ser utilizados como solventes alternativos para a extracção de matrizes naturais, como a azeitona e a cereja porque apresentam elevada difusividade e baixa viscosidade que facilitam a difusão destes através da matriz e como consequência o processo de extracção é facilitado (Demirbas, 2000).

A extracção supercrítica também pode ser usada como uma técnica preparativa para análise quantitativa, particularmente em cromatografia permitindo separar e depois determinar quantitativamente um determinado composto numa amostra metodologia que é muito comum na indústria alimentar (Perretti, Montanari, & Fantozzi, 2006).

1.6. Solubilidade e Transferência de Massa

Para a escolha das condições de extracção é importante, numa primeira fase, estudar a solubilidade dos compostos a extrair no fluído supercrítico escolhido. Este parâmetro pode ser investigado recorrendo ao enriquecimento de um meio inerte, normalmente utiliza-se a celite, com o composto de interesse, este procedimento além de fornecer uma indicação da solubilidade do composto no fluído supercrítico, fornece informação adicional relativamente à eficiência da recolha do deste após despressurização. Devido à morosidade deste tipo de experiências inúmeros investigadores têm proposto fundamentos, teorias e equações de estado que permitem estimar a solubilidade de vários compostos (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007).

O efeito da temperatura na solubilidade é complexo, devido à combinação de duas variáveis, densidade e pressão de vapor. A pressão de vapor do soluto aumenta com a

Introdução

temperatura, levando ao aumento da solubilidade. No entanto, a diminuição da densidade do solvente pode levar à diminuição da solubilidade do solvente. O efeito dominante vai depender da magnitude de cada efeito no sistema em estudo e da temperatura escolhida para o processo de extracção (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007).

Para a optimização de processos de extracção que incluem fluidos supercríticos é necessário não só o conhecimento de parâmetros termodinâmicos (solubilidade e selectividade) mas também a taxa de transferência de massa (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007).

1.7. Efeito da Matriz na Extracção Supercrítica

O tamanho das partículas, forma, área superficial, porosidade, humidade, nível de solutos passíveis de ser extraídos e a natureza da matriz são parâmetros que influenciam os resultados da extracção supercrítica. O sucesso da extracção supercrítica não depende apenas do passo de extracção em si (isto é, natureza do fluido supercrítico e escolha dos parâmetros de extracção) mas também da matriz considerada assim como do sistema de recolha/aprisionamento do composto a extrair (Camel, 1997), (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007).

A extracção supercrítica deve ser vista como um processo de 4 etapas: (1) desorção do composto da matriz com (2) consequente difusão na matriz, (3) solubilização do composto no fluido supercrítico, e (4) arrastamento do composto pelo fluido supercrítico. Cada etapa do processo tem que ser optimizada cuidadosamente para se obter extracções reproduzíveis. Na maioria dos casos, a etapa (1) é a mais difícil de prever. A estrutura física da matriz tem uma importância crítica, pois a eficiência da extracção está relacionada com a capacidade de difusão do fluido supercrítico na matriz. A diminuição do tamanho das partículas da matriz sólida leva ao aumento da área superficial, tornando desta forma a extracção mais eficiente (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007).

1.8. Efeito das Condições operatórias**1.8.1. Pressão e temperatura de extracção**

Existem quatro parâmetros muito importantes para compreender o comportamento do soluto no meio supercrítico para execução bem sucedida de extracções supercríticas: (i) a miscibilidade, (ii) a pressão em que o soluto atinge o máximo de solubilidade, (iii)

Introdução

intervalo de pressão de fraccionamento, que corresponde à pressão entre o máximo de solubilidade e miscibilidade (neste intervalo é possível extrair selectivamente um soluto através da escolha da pressão correcta) e (iv) o conhecimento das propriedades físicas do soluto, em particular o ponto de fusão (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007), (Temelli, 2009).

A pressão do fluido é o parâmetro principal que influencia a eficiência da extracção, um aumento nesta pressão a uma dada temperatura resulta no aumento na densidade do fluido o que significa que há também um aumento na solubilidade dos solutos (Temelli, 2009). A uma pressão constante, a densidade do CO₂ diminui quando a temperatura aumenta. Através da observação da Figura 1.4 verifica-se que este efeito torna-se mais pronunciado quando aumentamos a compressibilidade do fluído.

1.8.2. Co-Solvente(s)

A solubilidade dos compostos no fluído supercrítico pode ser aumentada através da utilização de um modificador de fase ou co-solvente e escolha deste depende da natureza do soluto a extrair. Este tem a capacidade de melhorar a solubilidade de um soluto devido ao aumento da densidade do solvente e/ou a existencia de interacções intermoleculares entre o co-solvente e o soluto (Güçlü-Üstündag & Temelli, 2006). Um ponto de partida razoável consiste na selecção de um modificador que seja um bom solvente no seu estado líquido para o analito alvo. É importante ter em conta que a adição de grandes quantidades de co-solvente pode modificar os parametros críticos da temperatura (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007). Co-solventes orgânicos, como o etanol e o metanol são utilizados porque permitem aumentar a polaridade do CO₂ e desta forma promover o aumento do rendimento de extracção de compostos fenólicos polares. Quando um co-solvente é adicionado ao CO₂, a temperatura crítica da mistura aumenta enquanto a pressão crítica diminui (Adil, Í. H.; Yener, M. E.; Bayindirh, 2008). O etanol (5-30%) é o co-solvente utilizado para aumentar a solubilidade dos polifenóis em CO₂, como tal a extracção de compostos fenólicos tem que ser efectuada a uma temperatura subcrítica entre os 40-60°C (Adil, Í. H.; Yener, M. E.; Bayindirh, 2008).

1.8.3. Tempo de extracção

É importante maximizar o contacto do fluido supercrítico com a amostra para promover o aumento da eficiência da extracção supercrítica. Entre as variáveis que influenciam o

contacto do solvente com a amostra encontram-se o caudal e o tempo de extracção (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007).

1.8.4. Caudal de fluído supercrítico

O caudal de fluído supercrítico através do extractor tem uma grande influência na eficiência da extracção. Quanto menor a velocidade de passagem do solvente maior a penetração deste na matriz e maior o rendimento de extracção.

1.8.5. Granulometria

A diminuição do tamanho das partículas da matriz na extracção supercrítica cria uma área superficial maior e favorece o processo de extracção, mas também pode prejudicar a extracção caso os analitos voltem a reabsorver na superfície da matriz. No entanto este problema pode ser contornado recorrendo a um caudal superior diminuindo a partição existente entre os analitos e matriz (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007).

1.8.6. Teor de água da matriz

A existencia de água na amostra afecta a extracção supercrítica, como tal esta deve ser removida ou controlada antes de efectuar a extracção. A água pode ajudar o processo de extracção, dependendo da quantidade existente leva à formação de poros ou ao inchamento da matriz permitindo um acesso facilitado do fluído aos analitos. Apesar da água ser apenas 0,3% solúvel no sc-CO₂ permite aumentar a polaridade deste e obter recuperações maiores de compostos polares. No entanto se a água existir em excesso no extractor os compostos que são hidrofílicos vão preferir a a fase aquosa e o rendimento da extracção supercrítica será baixo. No caso do composto a extrair ser hidrofóbico a existencia de água pode promover a sua precipitação e a criação de uma barreira à transferencia do composto da matriz para o fluído supercrítico prejudicando desta forma a eficiência do processo de extracção. A remoção da água existente é conseguida, normalmente, recorrendo ao processo de liofilização porque o processo de remoção de água através do aumento da temperatura pode levar à degradação da amostra e à volatilização dos compostos de interesse. Alternativamente recorre-se à adição de agentes secantes à amostra a extrair, este tratamento é simples e atractivo porque favorece a dispersão dos compostos na matriz e a homogenização da amostra (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007).

1.9. Recolha do Extracto

O desenvolvimento de um sistema de recolha apropriado para os compostos obtidos depois da extracção supercrítica é muito importante. As duas abordagens mais utilizadas são a recolha em solvente líquido e a recolha em fase sólida, sendo também utilizada a recolha directamente para um vazo vazio, por exemplo no caso de extractos lipídicos (Lucas, Martinez de la Ossa, Rincón, Blanco, & Gracia, 2002).

1.9.1. Condições de Recolha

A recolha em solvente líquido é mecanicamente simples e tem sido a técnica mais utilizada para matrizes naturais. A recolha pode ser feita recorrendo a dois métodos diferentes, colocando um frasco de recolha com o solvente eleito no final do sistema de extracção e a mistura extracto-CO₂ é borbulhada no solvente ou a mistura extracto-CO₂ é despressurizada para um vazo de recolha antes de entrar em contacto com o solvente. Para o último sistema a eficiência da recolha depende da eficiência da transferência dos compostos extraídos da fase gasosa para o solvente (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007).

Existem vários sistemas de recolha em fase sólida utilizados na extracção supercrítica. A recolha em fase sólida é normalmente efectuada despressurizando o CO₂ e o extracto obtido num compartimento que contém por exemplo esferas de vidro ou metal onde os compostos extraídos ficam adsorvidos. Após este passo utilizam-se solventes líquidos para recuperar o extracto (Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2007).

Bibliografia

- Adil, Í. H.; et. al. (2008). Extraction of Total Phenolics of Sour Cherry Pomace by High Pressure Solvent and Subcritical Fluid and Determination of the Antioxidant Activities of the Extracts. *Separation Science and Technology* , 43, 1091–1110.
- Bernardo-Gil, M. G., Ribeiro, M. A., & Esquível, M. M. (s.d.). Produção de extractos para a indústria alimentar: uso de fluidos supercríticos. *Boletim de Biotecnologia* , 14-21.
- Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering* , 67, 21-33.
- Camel, V. (1997). The determination of pesticide residues and metabolites using supercritical fluid extraction. *Trends in Analytical Chemistry* , 16, 351-369.
- Demirbas, A. (2000). Liquefaction of olive husk by supercritical fluid extraction. *Energy conversion & management* , 41, 1875-1883.
- Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Centro. (2008). *Produtos Tradicionais de Qualidade na Região Centro*. Obtido em 4 de Setembro de 2009, de http://ptqc.drapc.min-agricultura.pt/documentos/cereja_cova_beira.pdf
- Gomes, T., Delcuratolo, D., & Paradiso, V. M. (2008). Pro-oxidant action of polar triglyceride oligopolymers in edible vegetable oils. *Eur Food Res Technol* , 226, 1409–1414.
- Gonçalves, B., landbo, A.-K., Knudsen, D., Silva, A. P., Moutinho-Pereira, J., Rosa, E., et al. (2004). Effect of ripness and postharvest storage on the phenolic profiles of cherries (*Prunus avium* L.). *J. Agric. Food Chem.* , 52, 523-530.
- Gonçalves, B., Pereira, J. M., Santos, A., Bacelar, E., correia, C., Carvalheiro, J., et al. (2007). Qualidade da cereja e seus reflexos na saúde humana. *Revista da APH* , 90, 14-19.
- Güçlü-Üstündag, Ö., & Temelli, F. (2006). Solubility behavior of ternary systems of lipids in supercritical carbon dioxide. *Journal of supercritical fluids* , 38, 275-288.
- Huang, D., Ou, B., & L. Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* , 53, 1841-1856.
- Jung, Y. A., & Row, K. H. (1998). Extraction and purification of perillyl alcohol from Korean orange peel by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* , 828 , 445–449.

Introdução

- Lee, Y.-W., Lee, C. H., Kim, J.-D., Lee, Y. Y., & row, K. H. (2000). Extraction of Perillyl alcohol in Korean Orage Peel by Supercritical CO₂. *Separation Science and Technology* , 35 (2), 1069-1076.
- López-López, A., Montanõ, A., Ruíz-Méndez, M. V., & Garrido-Fernández, A. (2008). Sterols, Fatty Alcohols, and Triperpenic Alcohols in Commercial Table Olives. *J. Am. Oil Chem. Soc* , 85, 253-262.
- Lucas, A., Martinez de la Ossa, E., Rincón, J., Blanco, M., & Gracia, I. (2002). Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. *Journal of Supercritical Fluids* , 22, 221–228.
- Matias, A. (2008). Desenvolvimento de Óleos Alimentares Funcionais, da Ciência à Aplicação - Dissertação apresentada para obtenção do grau de doutor em Engenharia Química pelo Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa. Oeiras.
- Matos, J. M., Schmidt, C. M., Thomas, H. J., Cummings, O. W., Wiebke, E. A., Madura, J. A., et al. (2008). A Pilot Study of Perillyl Alcohol in Pancreatic Cancer. *Journal of Surgical Research* , 147, 194–199.
- Morelloa, J.-R., Vuorela, S., Romero, M.-P., Motilva, M.-J., & Heinonen, M. (2008). Antioxidant Activity of Olive Pulp and Olive Oil Phenol Compounds of the Arbequina Cultivar. *J. Agric. Food Chem.* , 53, 2002-2008.
- Mozetic, B., Trebse, P., & Hribar, J. (2002). Determination and Quantification of Anthocyanins and Hydricinnamic Acids in Different Cultivars of Sweet Cherries (*Prunus avium* L.) from Nova Gorica Region (Slovenia). *Food Technol. Biotechnol.* , 40 (3), 207-212.
- Owen, R. W., Mier, W., Giavosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000). Phenolic compounds and squaleno in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology* , 38, 647-659.
- Perretti, G., Montanari, L., & Fantozzi, P. (2006). Lipid Extraction from *Olea Europea* L. by Supercritical Carbon Dioxide for Analytical Use. *International Journal of Food Engineering* , Volume 2, Issue 2.
- Pourmortazavi, S., & Hajimirsadeghi, S. S. (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A* , 1163, 2–24.

Introdução

Revista Digital De Gastronomía Mediterránea. (2009). *Variedades De Aceituna Españolas*. Obtido em 1 de Agosto de 2009, de SaborMediterraneo: http://www.sabormediterraneo.com/aceites/variedades_aceituna.htm

Satomi, Y., Miyamoto, S., & Gould, M. N. (1999). Induction of AP-1 activity by perillyl alcohol in breast cancer cells. *Carcinogenesis* , 20 (1), 1957-1961.

Sovena Group. (2008). *Sovena*. Obtido em 1 de Agosto de 2009, de Tipos de Azeitona: http://www.sovenagroup.com/sovena_produtos_azeite_tipos_pag8.php

Temelli, F. (2009). Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. *J. of Supercritical Fluids* , 47, 583–590.

Umberto Cornelli, M. (2009). Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in Dermatology* , 27, 175–194.

Visioli, F., Bogani, P., Grande, S., & Galli, C. (2004). Olive oil and oxidative stress. *Grasas y Aceites* , Vol. 55. Fasc. 1, 66-75.

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

1. Extractos Naturais a Partir de Resíduos de Azeitona

1.1. Matérias-primas

As matérias-primas em estudo para obtenção de extractos naturais foram o resíduo de caroço de azeitona da variedade *Hojiblanca* proveniente da indústria da azeitona de mesa e o bagaço de azeitona seco proveniente da indústria de produção de azeite.

O resíduo de caroço de azeitona é proveniente da produção de azeitona de mesa recheada, encontra-se por isso com alguns resíduos de polpa e pedúnculos, no entanto é referido ao longo do presente estudo apenas como caroço de azeitona pois este representa a maior percentagem da matriz.

Do processo de extracção de azeite de duas fases resulta o bagaço de azeitona húmido, mas parte deste resíduo é utilizado posteriormente para extracção de óleo de bagaço, mas antes do processo de extracção de óleo de bagaço (processo com hexano) é necessário secar todo o resíduo. Este resíduo de bagaço seco foi utilizado como matéria prima para obtenção de extractos ao longo deste trabalho.

1.2. Processamento das Matérias-primas Para Obtenção dos Extractos Naturais Derivados da Azeitona

O processamento dos caroços de azeitona envolveu numa primeira fase a diminuição da granulometria (quebrar os caroços e homogeneizar) e numa segunda fase a liofilização durante 72 horas (*Edwards Modulyo, UK*), com o objectivo de lhes retirar a água.

Por sua vez para o bagaço de azeitona não foi necessário proceder ao passo de liofilização, apenas foi necessário ajustar a granulometria pois esta matriz encontra-se livre de água devido ao processo de secagem a que foi submetido, tal como já foi referido anteriormente, na indústria de produção de azeite de onde foi obtido.

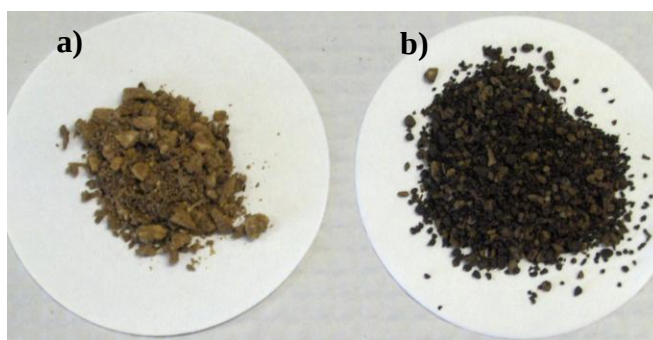


Figura 2.1 – As matrizes em estudo após o processamento para obtenção de extractos naturais: a) Caroço de Azeitona e b) Bagaço de azeitona.

1.3. Extractos Hidroálcoolicos

Preparam-se extractos convencionais das duas matrizes seleccionadas, para caracterização dos compostos fenólicos e avaliação da actividade antioxidante.

Procedeu-se à extracção das duas matrizes com dois solventes em diferentes proporções: água (100%), etanol (100%) e etanol:água (80:20 v/v) (Bianchi, 2003).

A escolha das condições de operação das extracções aquosas foi realizada com base em trabalhos realizados anteriormente no laboratório de acolhimento (Matias, 2008). As condições óptimas seleccionadas foram razão 2 (m/m) matriz/solvente, agitação com agitador mecânico (*IKA – RW20.n, IKA Works, Germany*) em reactor batch a 700rpm durante 30 minutos à temperatura ambiente e a separação dos sólidos foi efectuada por filtração em bückner.

Os rendimentos de extracção obtidos para as matrizes em estudo em g extracto/ g de matriz encontram-se no *Capítulo 3 – Secção 1.1.1*.

1.3.1.1. Extractos Lipídicos

1.3.1.1.1. Extracção em Soxhlet com Hexano

A determinação do conteúdo em lipídios pode estabelecer a qualidade comercial de um fruto ou semente, e/ou verificar o estado de maturação destes; é também um primeiro passo de avaliação qualitativa do óleo extraído (análise preparativa). Os lipídios apresentam baixa solubilidade em água e álcool e uma elevada solubilidade em éter etílico, éter petróleo e outros solventes polares semelhantes. Num grande número de estudos publicados os lipídios são extraídos dos alimentos usando etil-éter pois este foi o primeiro solvente utilizado no início do século 20 (Perretti, Montanari, & Fantozzi, 2006).

Nesta etapa do presente trabalho pretendeu-se estudar as condições de extracção e as fracções lipídicas obtidas, com intuito de identificar qual o melhor processamento para a obtenção de um extracto natural rico em compostos lipídicos com bioactividade reconhecida. Procedeu-se à extracção do caroço e do bagaço de azeitona em soxhlet com hexano (*Sigma, Germany*) (Lopes & Bernardo-Gil, 2005), (López-López, Montañó, Ruíz-Méndez, & Garrido-Fernández, 2008), recorrendo a uma instalação igual à que se encontra na figura seguinte (Figura 2.2).

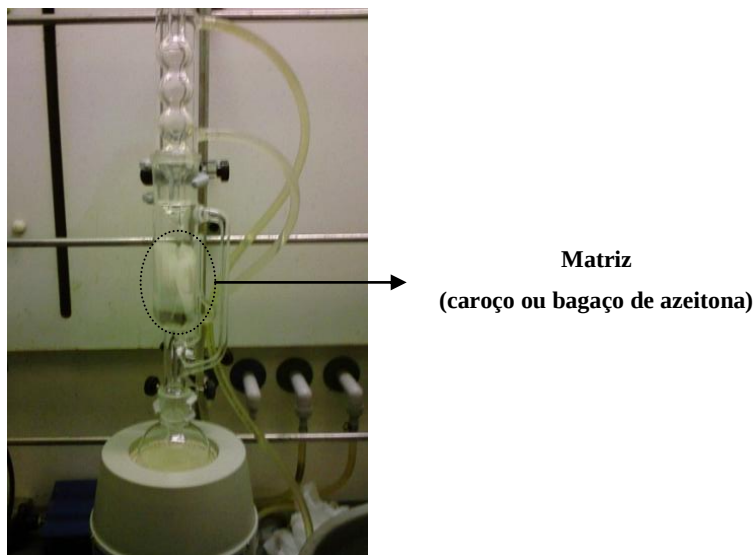


Figura 2.2 – Montagem utilizada para a extracção do caroço e do bagaço de azeitona em soxhlet com hexano.

Recorrendo à instalação referida, soxhlet, extraíram-se 5 g de matriz (caroço ou bagaço de azeitona liofilizados) com 200mL de hexano durante 1, 2, 3 e 6 horas. O extracto foi filtrado e evaporado o solvente recorrendo a um rotavapor (*Rotavapor R-114, waterbath B480 – Büchi, Switzerland*) e a massa de extracto lipídico contabilizada. Os rendimentos de extracção obtidos para os extractos de caroço e bagaço de azeitona encontram-se no *Capítulo 3 – Secção 1.2.1* expressos em %(g de extracto/ g de matriz).

1.3.2. **Extracção Supercrítica Utilizando sc-CO₂**

O objectivo deste estudo foi avaliar a potencialidade de obtenção de um extracto lipídico com propriedades antioxidantes recorrendo à tecnologia supercrítica.

A extracção foi feita utilizando sc-CO₂ em batch semi-contínuo e a instalação utilizada está de acordo com a apresentada na figura seguinte (Figura 2.3) que foi construída através da adaptação uma instalação existente no laboratório de acolhimento.

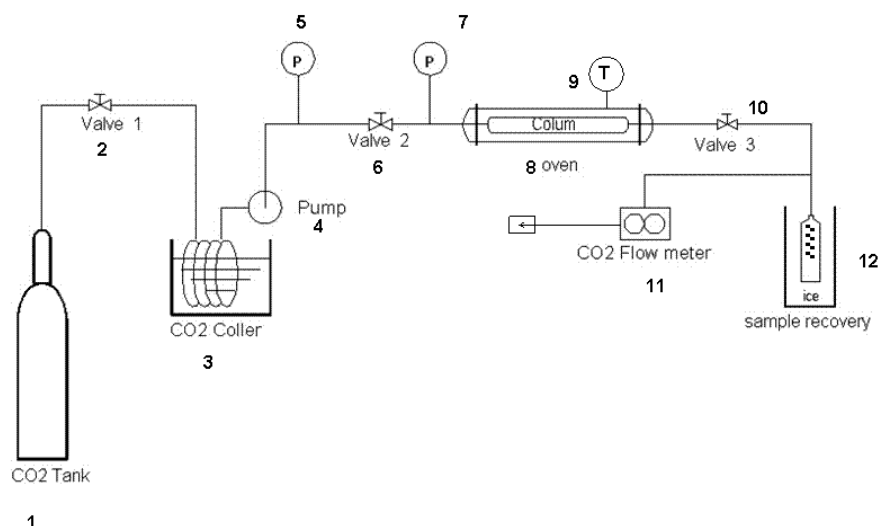


Figura 2.3 - Esquema da montagem utilizada para a extração supercrítica do caroço e do bagaço de azeitona:
 1 – garrafa de CO₂; 2, 6, 10 – Válvula de agulha; 3 – Banho de arrefecimento do CO₂; 4 – Bomba de líquidos;
 5, 7 – Manómetro; 8 – Forno termostaticado, 9 – Extractor; 11 – Caudalímetro; 12 – Vaso de recolha .

O forno que contém o extractor (célula de aço inoxidável de alta pressão) é termostaticado inicialmente a 40°C, só depois se pressuriza a instalação. O dióxido de carbono é liquefeito, por redução da temperatura à saída da garrafa, e pressurizado lentamente com uma bomba de líquidos até à pressão de 25MPa. A instalação permanece a 40°C e 25MPa durante 30 minutos para que o CO₂ pressurizado se vá difundindo lentamente através da matriz que se encontra dentro do extractor, ver Figura 2.4.



Figura 2.4 – Fotografia do extractor utilizada para proceder à extração supercrítica do caroço e do bagaço de azeitona.

As matrizes (caroço e bagaço de azeitona) foram introduzidas num extractor (célula de aço inoxidável de alta pressão) de acordo com o esquema que se segue Figura 2.5.

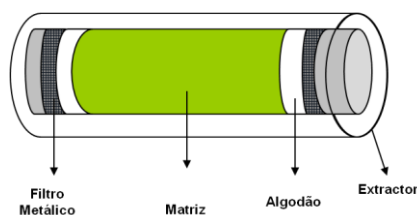


Figura 2.5 - Esquema do enchimento do extractor.

Após os 30 minutos de estabilização abre-se a válvula à saída do extractor (Figura 2.3 (10)) e recolhe-se o extracto no vaso de recolha (Figura 2.3 (12)) que se encontra em gelo para garantir que se conseguem recuperar os compostos voláteis que se está a extrair. Procedeu-se à extracção do caroço e do bagaço de azeitona durante 1 e 3 horas, garantindo que o caudal de CO₂ à saída (Figura 2.3 (11)) foi de 2,5±0,5ml/min. A cinética de extracção foi acompanhada e o estudo comparativo dos rendimentos de extracção (g de extracto/g de matriz) ao longo do tempo encontra-se no *Capítulo 3 – Secção 1.2.1*.

As condições de extracção foram escolhidas tendo em conta o estudo efectuado por Temelli, tendo em conta o impacto das propriedades do soluto na solubilidade. A pressão de extracção escolhida permitiu trabalhar nas condições em que a solubilidade do ácido oleico em sc-CO₂ é mais elevada (Temelli, 2009).

1.4. Caracterização dos Extractos Naturais a Partir de Resíduos de Azeitona

1.4.1.1. Determinação dos Polifenóis totais

1.4.1.1.1. Método de Folin-Ciocalteu

Os compostos fenólicos têm-se tornado reconhecidos por possuírem benefícios para saúde e podem ser obtidos a partir de um grande leque de alimentos como a fruta e os vegetais (Bisby, Brooke, & Suppiah, 2008).

A concentração de polifenóis totais presentes nos extractos hidroalcoólicos de caroço e bagaço de azeitona foi estimada recorrendo a uma versão modificada do teste de Folin-Ciocalteu (Singleton, 1965). Este método tem como base a capacidade dos compostos fenólicos existentes na amostra reduzirem o reagente de Folin-Ciocalteu quando se encontram em condições básicas. Durante a reacção, ocorre a dissociação de protões dos compostos fenólicos que levam à formação do anião fenolato, o qual é capaz de reduzir

os compostos presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, alterando a cor dos mesmos para azul (Halliwell, 2004).

Em resumo, a 20µL de amostra adiciona-se água (1580µL), posteriormente adicionam-se 100µL de reagente de Folin-Ciocalteu (*Merck, Germany*) e 300µL de uma solução saturada de Na₂CO₃ (*Pronalab, Portugal*) e esta mistura é mantida a 40°C na estufa (*Binder; Germany*) durante 30 minutos. Utiliza-se o ácido gálico (*Fluka; Germany*) para determinação da curva padrão (0-1000mM) e os resultados são reportados em equivalentes de ácido gálico (EAG), a absorvância é lida a 765nm num espectrofotómetro (*Thermo Espectronic, Genesys10uv; U.S.A*).

Os resultados do conteúdo total em polifenóis para os extractos estudados encontram-se no *Capítulo 3 – Secção 1.1.2* e no *Anexo 1*, para os extractos convencionais, e no *Capítulo 3 – Secção 1.2.2*, para os extractos lipídicos de caroço e bagaço de azeitona. Os valores apresentados são a média de ensaios independentes (n≥3) ± desvio padrão.

1.4.1.2. Determinação do Perfil em Polifenóis Recorrendo a Cromatografia Líquida: HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

As análises de HPLC foram efectuadas através de colaboração com o Grupo de Química Analítica do Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB), com contribuição especial da Doutora Maria Rosário Bronze.

Os perfis cromatográficos dos Polifenóis dos extractos em estudo foram obtidos por HPLC acoplado a um detector de díodos (*Surveyor, Thermo Finnigan, San José, C.A., USA*). As separações foram efectuadas a 35°C com uma pré-coluna LiChrospher (5m, d.i. 250mm x 4mm) RP-18 da *Merck* com uma pré-coluna com o mesmo enchimento. O injector de amostras foi mantido a 12°C e utilizou-se um *loop* de injeção de 20µL para efectuar a injeção das amostras. A fase móvel consiste numa mistura de gradiente do eluente A (ácido fosfórico 0,1%) com o eluente B (ácido fosfórico – acetonitrilo – água 1:400:595, v/v/v), com um caudal de 700µL/min. O programa de gradiente utilizado foi desenvolvido de acordo com trabalhos prévios efectuados no laboratório (M.N. Bravo, 2006).

Para a confirmação da presença de hidroxitirosol nos extractos foi acoplado, em série, ao HPLC-DAD um detector electroquímico, este composto foi quantificado recorrendo a um software de aquisição e tratamento de dados: *Chromquest (versão 4.0 - Thermo*

Finnigan, San José, C.A., USA). As concentrações de hidroxitirosol nos extractos convencionais de caroço e bagaço de azeitona encontram-se expressas em ppm (mg/L) no Capítulo 3 – Figura 3.3.

1.5. Quantificação da Proteína Total Recorrendo ao Método de Bradford

O método utilizado na determinação do teor em proteínas existente nos diferentes extractos foi o método de Bradford. Este método constitui um ensaio rápido e livre das interferências químicas que limitam outros métodos semelhantes; no entanto apresenta desvantagens como a susceptibilidade à interferência de detergentes e a necessidade de um controlo do pH das soluções a analisar. A não observância destes factores pode conduzir à obtenção de resultados falseados por alterarem os valores de absorvância medidos (Zaia, Zaia, & Lichtig, 1998), (Bradford, 1976).

Este método tem como base a ligação de um corante sintético (Azul brilhante de Coomassie G250) às proteínas, através das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, através de ligações iónicas e hidrofóbicas. A forma protonada do corante exhibe uma coloração vermelha, com um máximo de absorvância a 465nm. Ao ligar-se às proteínas, as interacções hidrofóbica e iónica estabilizam a forma aniónica do corante, de cor azul, exibindo uma alteração do máximo de absorção da radiação electromagnética de um comprimento de onda de 465nm para um comprimento de onda de 595nm. Esta reacção em geral é rápida, aproximadamente 5 minutos, mantendo-se o complexo corante-proteína estável durante uma hora. O método é aplicável a todas as proteínas, embora a quantidade de corante que se liga varie de proteína para proteína, apresentando a albumina de soro bovino (*BSA – Bovine Serum Albumin*) uma grande afinidade com este corante. Esta variação de absorção está relacionada com a proporção de resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos na proteína em questão. Assim, é importante utilizar como proteína padrão uma proteína com composição semelhante à proteína a dosear.

Através da representação gráfica dos valores das absorvâncias lidas, em função da concentração em proteína das soluções padrão, é possível obter uma curva de calibração. Através de interpolação gráfica pode-se determinar a concentração da proteína em que a curva de calibração seja aproximadamente linear, e as concentrações suficientemente baixas, de forma a garantir a aplicabilidade da Lei de Lambert-Beer (Zaia, Zaia, & Lichtig, 1998), (Bradford, 1976).

Em resumo, adicionar 1,5mL de reagente de Bradford (*Sigma, Germany*) a 50µL de extracto, agitar bem a solução, aguardar entre 5 a 40 minutos e ler a absorvância a

935nm num espectrofotómetro (*Thermo Espectronic, Genesys10uv; U.S.A.*). Foi escolhida a BSA (*Sigma, Germany*) para elaboração da recta de calibração, sendo os resultados apresentados em $\text{g}_{\text{BSA}}/\text{g}$ de extracto e encontram-se no *Capítulo 3 – Secção 1.1.3.*

1.6. Avaliação da Capacidade Antioxidante

Existe cada vez mais o interesse de conhecer a capacidade antioxidante de produtos alimentares, pois esta medida pode fornecer uma grande variedade de informações, tal como a resistência à oxidação, contribuição quantitativa das substâncias antioxidantes, ou a actividade antioxidante que estas podem possuir no organismo quando ingeridas (Zulueta, Esteves, & Frígola, 2009).

A capacidade antioxidante dos extractos naturais depende das sinergias existentes entre os diferentes compostos presentes, desta forma é perceptível que podem existir diferentes mecanismos de actuação num mesmo extracto sobre os radicais livres. Tendo em conta a possibilidade de ocorrência de sinergias é fundamental a combinação de mais de dois métodos de determinação da capacidade antioxidante *in vitro* (Huang, Ou, & L. Prior, 2005).

A actividade antioxidante dos extractos foi estudada recorrendo à avaliação da capacidade de resgate do radical livre peroxilo ($\text{ROO}^\bullet$) e à avaliação da capacidade de inibição de produção do radical hidroxilo ($\text{HO}^\bullet$). A capacidade de resgate do radical livre peroxilo foi determinada pelo método de ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) e pelo ensaio de Inibição de Autooxidação Lipídica Induzida (LDL - *Low-Density Lipoprotein*). Ambos os métodos têm como base a medição da capacidade que determinados compostos presentes na amostra têm em doar um átomo de hidrogénio à espécie reactiva. Estes métodos inserem-se no grupo de ensaios já anteriormente referidos (*Capítulo 1*), HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) como sendo os mais relevantes na avaliação da influência dos antioxidantes na quebra das reacções radicalares, que ocorrem *in vivo* (Bisby, Brooke, & Suppiah, 2008) (Matias, 2008).

Por sua vez a capacidade dos extractos em inibir a produção do radical hidroxilo foi determinada recorrendo ao método de HORAC (*Hydroxyl Radical Advertising Capacity*), que fornece uma medida indirecta da actividade antioxidante contra a quebra de radicais hidroxilo.

1.6.1. Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Livre ROO•

1.6.1.1. Método de ORAC

O método de ORAC mede a capacidade de resgate do radical peróxido (ROO•) produzido pelo AAPH (*Fluka*, 98%; *Germany*) a 37°C via um mecanismo clássico de transferência do átomo de hidrogénio. A fonte de oxidação dos radicais peróxido nestes ensaios é normalmente um iniciador “azo” como o 2,2’azobis(2-amidinopropano) dihidroclorado (AAPH). Quando sujeitos a termólise estes iniciadores geram radicais de carbono que reagem com o oxigénio e dão origem a espécies reactivas de radicais de peróxido, estes radicais são representativos dos envolvidos em auto-oxidações bioquímicas e podem ser utilizados a pH fisiológico (Cao, Alissiodagger, & Cutler, 1993), (Bisby, Brooke, & Suppiah, 2008).

A capacidade de resgate é medida através da cinética da reacção de oxidação de um fluoróforo, neste caso a fluoresceína diacetato, na presença do AAPH o iniciador. Neste método mede-se a redução na fluorescência da solução e avalia-se a capacidade protectora das amostras testadas. Na figura seguinte encontram-se esquematizadas as reacções que ocorrem durante o ensaio de ORAC (Cao, Alissiodagger, & Cutler, 1993).

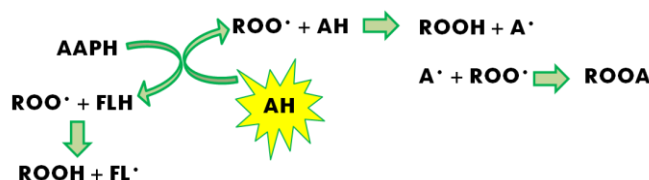


Figura 2. 6- Esquema de reacções ocorridas no ensaio de ORAC no qual o AAPH, por termodegradação, produz radicais peróxido que reagem com a Fluoresceína (FLH). Na presença de um antioxidante, AH, este resgata o radical, dando origem a compostos não reactivos, ROOH e ROOA. Adaptado de Bisby, Brooke, & Suppiah (Bisby, Brooke, & Suppiah, 2008).

Recorrendo a uma modificação deste método, avaliou-se a capacidade dos compostos presentes nos extractos de caroço e bagaço de azeitona resgatarem o radical peróxido e como consequência, os radicais formados diminuem a fluorescência da fluoresceína ao longo do tempo. Os antioxidantes existentes nos extractos em estudo bloqueiam a oxidação desta até que toda a actividade antioxidante da amostra se esgote. A área abaixo da curva de fluorescência (AUC) é utilizada para quantificar a actividade antioxidante total do radical peróxido na amostra. A actividade antioxidante é determinada através da comparação desta curva com a curva padrão obtida, usando

várias concentrações de Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid), análogo à vitamina E (Zulueta, Esteves, & Frígola, 2009).

Em resumo, numa placa de 96 poços adiciona-se 25µL de amostra (ou PBS – Branco), 150µL de uma solução de fluoresceína diacetato (4×10^{-6} mM) e incuba-se a 37°C durante 10 minutos. Após incubação, adicionar 25µL de AAPH (41,4g/L) a cada um dos poços. A fluorescência da mistura reaccional é medida a cada 1 minuto, ao longo de 30 minutos à temperatura de 37°C ($\lambda_{em}=515$ nm, $\lambda_{ex}=493$ nm). Todas as soluções são preparadas em PBS (75mM, pH 7.4)¹.

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

Os valores obtidos para a capacidade antioxidante (µmol de CAET/ g de extracto, µmol de CAET/ g de matriz) dos extractos em estudo encontram-se no *Capítulo 3 – secção 1.1.4.1* (extractos convencionais de caroço e bagaço de azeitona) e na *secção 1.3.1.1* (extractos lipídicos de caroço e bagaço de azeitona).

1.6.1.2. Inibição de Autooxidação Lipídica induzida (LDL)

Existe um grande interesse por parte dos consumidores e nutricionistas em quantificar as propriedades antioxidantes dos alimentos (Číž, Čížová, Denev, Kratchanova, Slavov, & Lojek, 2009). Existem estudos que comprovam que a terapia com antioxidantes, como os polifenóis, é eficaz nos primeiros estados da arteriosclerose pois estes compostos previnem a oxidação da LDL (LDL – Low-Density Lipoprotein) alterando desta forma os mecanismos de desenvolvimento da doença (Kaliora, Dedoussis, & Schmidt, 2006).

Recorreu-se ao método de inibição de autooxidação lipídica induzida para avaliar a capacidade de resgate do radical peroxilo ($ROO^{\bullet}$) dos compostos existentes nos extractos em estudo em substrato lipídico. Este método induz artificialmente a autooxidação do ácido linoleico ou da LDL recorrendo ao Cu(II) ou a um iniciador azo que no nosso caso é o AAPH. O seguimento da reacção de autooxidação é conseguido

¹ Protocolo de preparação do PBS 75mM, pH 7.4 consultar Anexo 2

através da absorvância a 234nm, lida num espectrofotómetro (*Thermo Espectronic, Genesys10uv; U.S.A*), $A_{\max}$ (máximo de absorvância) correspondente aos dienos conjugados formados na reacção de oxidação (Huang, Ou, & L. Prior, 2005).

O ensaio de controlo determinado a partir da incubação da lipoproteína com um agente oxidante (AAPH) e os ensaios com antioxidantes foi determinado a partir da incubação da lipoproteína com um agente oxidante e 10µL da amostra (Diluída 1:100). Dado que o declive da curva da fase de latência e o andamento da oxidação depende da concentração de antioxidante em contacto com a lipoproteína (Huang, Ou, & L. Prior, 2005), todos os ensaios foram realizados utilizando a mesma concentração de extracto em contacto com a LDL. Os extractos testados foram: extracto de caroço de azeitona obtido em soxhlet com hexano (Caroço Hexano 3H), extracto de caroço de azeitona obtido com sc-CO₂ (sc-Caroço 1H e sc-Caroço 3H), extracto de bagaço de azeitona obtido em soxhlet com hexano (Bagaço Hexano 3H), extracto de bagaço de azeitona obtido com sc-CO₂ (sc-Bagaço 1H e sc-Bagaço 3H) e as curvas obtidas para a inibição de autooxidação lipídica induzida encontram-se no *Anexo 4*.

A capacidade de inibição da autooxidação induzida da LDL é realizada por espectrofotometria através da adaptação do método descrito por Esterbauer et al. (Esterbauer H, et al., 1989) e a percentagem de diminuição do tempo de latência na oxidação da LDL encontra-se no *Capítulo 3 – secção 1.3.1.2*.

A LDL, adquirida à *Applichem, Biochemica*, é isolada do plasma humano e antes de se iniciar o ensaio é necessário proceder à diálise em colunas *PD-10 Dessalting* para remoção do agente quelante. A quantidade de proteína é depois quantificada recorrendo ao método de Bradford já descrito previamente (1.5.Quantificação da Proteína Total Recorrendo ao Método de Bradford). O método da inibição da auto-oxidação da LDL consiste na incubação de 0,1mg/L de proteína com a amostra e com o agente indutor AAPH (500µM) a 37°C. A absorvância da mistura final é lida a 234nm de 5 em 5 minutos ao longo de 10 horas.

A capacidade que cada extracto possui para inibir a oxidação da LDL é determinada pelo prolongamento da fase latência relativamente ao controlo (LDL+AAPH) e expressa em percentagem (%) de inibição, calculada a partir da seguinte equação (Eq. 2.1)

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{t_{\text{amostra}} - t_{\text{controlo}}}{t_{\text{amostra}}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 2.1})$$

Onde,

$t_{controlo}$ - Tempo de latência do Controlo

$t_{amostra}$ - Tempo de latência com amostra

Note-se que uma das desvantagens deste método é o facto da mistura testada durante o ensaio ser muito complexa (LDL+Extracto) facto que pode alterar o comportamento da curva de oxidação na fase de latência de ensaio para ensaio (Prior, R.L., et. al, 2005).

1.6.2. Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Livre HO[•]

1.6.2.1. Método de HORAC

O radical hidroxilo (HO[•]) é o ROS ROS – *Reactive Oxygen Species*) mais reactivo formado através de reduções sucessivas do oxigénio molecular (O₂) no metabolismo celular, é responsável por efeitos citotóxicos observados em organismos aeróbios desde as bactérias até às plantas e animais (Bektaşoğlu, Çelik, Özyürek, Güçlü, & Apak, 2006).

As células possuem mecanismos biológicos de defesa, como as enzimas, que convertem as ROS em espécies inofensivas para o organismo, no entanto a maior parte da defesa depende de uma variedade de antioxidantes não-enzimáticos, tal como as vitaminas C e E e muitos fitoquímicos que têm propriedades de resgate de oxidantes e radicais livres. O radical hidroxilo tem sido o ROS mais utilizado nos métodos de avaliação da capacidade antioxidante pois é um radical chave na autooxidação e pode ser gerado através de decomposição térmica de compostos “azo”. Biologicamente o radical hidroxilo é gerado quando o peróxido de hidrogénio reage com Fe(II) (reacção de Fenton). No entanto, a utilização da mistura Fe(II)/H₂O₂ para determinação da capacidade antioxidante apresenta como desvantagem o facto de muitos antioxidantes serem também metais-quelantes, tornando-se impossível distinguir se os antioxidantes são apenas bons metais-quelantes ou se resgatam o radical HO[•] (Huang, Ou, & L. Prior, 2005).

No trabalho apresentado, a capacidade de resgate/inibição de geração dos radicais HO[•] foi quantificada recorrendo ao método de HORAC (*Hidroxyl Radical Averting Capacity*). Este método permite quantificar a capacidade que os extractos naturais têm para quelar iões metálicos reactivos, catalisadores de reacções de oxidação. De forma indirecta, é possível determinar a capacidade dos extractos em inibir a formação de radicais livres de hidroxilo recorrendo a uma reacção do “Tipo Fenton” entre um metal,

Co(II), e o peróxido de hidrogénio, H_2O_2 . O Co(II) e H_2O_2 ao reagirem formam espécies reactivas que oxidam o fluoróforo com o qual entram em contacto, neste caso a fluoresceína que na sua forma oxidada se torna incolor (Ou, Hampsch-Woodill, Flanagan, Deemer, Prior, & Huang, 2002), (Matias, 2008). Tal como no método de ORAC, é possível acompanhar a cinética da reacção de oxidação medindo a redução da fluorescência da solução e, dessa forma, quantificar a capacidade protectora dos extractos testados.

A figura seguinte, Figura 2.7, esquematiza as reacções que ocorrem durante o ensaio de HORAC e que permitem avaliar se o extracto em estudo possui capacidade antioxidante.

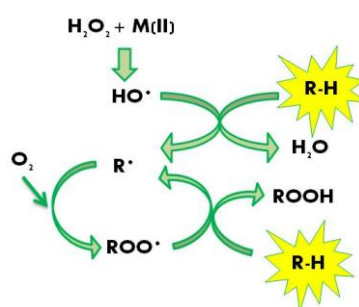
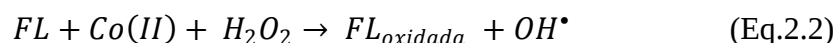


Figura 2.7 – Esquema da reacção do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em presença de iões metálicos ($M(II)$). A reacção gera o radical hidroxilo $HO\cdot$. Este radical é muito reactivo e ao reagir com espécies antioxidantes presentes nos extractos ($R-H$) capta um hidrogénio originando uma espécie com um electrão desemparelhado ($R\cdot$). Por sua vez esta espécie reage com o O_2 molecular formando o radical peróxido $ROO\cdot$ adaptado de (Ou, Hampsch-Woodill, Flanagan, Deemer, Prior, & Huang, 2002).

O método baseia-se na capacidade de determinados compostos presentes nos extractos em estudo, inibirem a oxidação da fluoresceína induzida pelos iões metálicos gerados pela reacção iniciada pelo Co(II) (Eq.2.2) (Mazzotti, Mazzotti, Pantusa, Sportelli, & Sindona, 2006).



Esta reacção origina a formação de radicais hidroxilo, que não são produzidos se o ião metálico não reagir com o peróxido de hidrogénio.

Em resumo, numa placa de 96 poços adiciona-se 10 μ L de amostra (ou PBS – Branco), 180 μ L de uma solução de fluoresceína (4×10^{-6} mM) e incuba-se a 37°C durante 10 minutos e adiciona-se 5 μ L de H_2O_2 (1,1M). Após incubação, adicionar 5 μ L de CoF_2 a cada um dos poços. A fluorescência da mistura reaccional é medida a cada 1 minuto, ao

longo de 30 minutos à temperatura de 37°C ($\lambda_{em}=515nm$, $\lambda_{ex}=493nm$). Todas as soluções são preparadas em PBS (75mM, pH 7.4)¹.

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

Os valores obtidos de HORAC (μmol de CAEAC/ g de extracto, μmol de CAEAC/ g de matriz) encontram-se no *Capítulo 3 – Secção 1.1.4.2.1* (extractos hidroalcoólicos de caroço e bagaço de azeitona) e na *Secção 1.3.2* (extractos lipídicos de caroço e bagaço de azeitona).

1.7. Determinação e quantificação dos ácidos gordos

As análises de determinação e quantificação foram efectuadas através de colaboração com o Grupo Sovena, com contribuição especial da Engenheira Marina Reis.

A identificação e quantificação dos ácidos gordos presentes nos extractos em estudo foram efectuada recorrendo a análise através de Cromatografia Gasosa (GC – Gas Chromatography). Os extractos foram sujeitos a derivatização, utilizando KOH(9.1%) e n-Heptano, para obtenção dos metil-esters. As análises cromatográficas foram feitas recorrendo a um GC (*Thermo, Trace GC Ultra*) equipado com uma coluna capilar Termo TR Wax 30mx0,25mm com uma espessura de filme de 0,25 μm ; um injector PTV a 523K e um detector ionizador de chama a 523K. O gás de arraste utilizado foi hélio a 1.2mL/min. O programa de análise foi: 5min a 473K, 1,5K/min até aos 503K, depois mantém a 623K durante 0,5min. A identificação dos ácidos gordos foi feita com base a padrões de externos utilizando compostos de referência (*Altech – K107 FAME Mix, AOCS mix 3*).

A identificação e quantificação dos ácidos gordos (g de ácido gordo/ g de extracto) presentes nos extractos em estudo encontram-se no *Capítulo 3 – Secção 1.4* e nos *Anexo 5, Anexo 6 e Anexo 7*.

¹ Protocolo de preparação do PBS 75mM, pH 7.4 consultar Anexo 2

1.8. Determinação da estabilidade oxidativa

As análises de Rancimat foram efectuadas através de colaboração com o Grupo Sovena, com contribuição especial da Engenheira Marina Reis.

Pretendeu-se avaliar a influência da adição de diferentes percentagens de extracto supercrítico de caroço e bagaço de azeitona na estabilidade oxidativa do óleo de girassol, para tal recorreu-se ao método de Rancimat (Gomes, Delcuratolo, & Paradiso, 2008). Este método tem como base a determinação automática do tempo necessário (tempo de indução – TI) para se atingir a fase exponencial da oxidação, ponto de mudança da velocidade da reacção, isto é, entrada na etapa de propagação no mecanismo radicalar de oxidação lipídica (Matias, 2008),(Gomes, Delcuratolo, & Paradiso, 2008).

As diferentes percentagens de extracto supercrítico de caroço e bagaço de azeitona foram adicionadas ao óleo de girassol de acordo com o esquematizado na tabela seguinte (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Amostras preparadas para realizar o teste de rancimat e avaliar a influência da adição dos extractos supercríticos de caroço e bagaço de azeitona ao óleo de girassol na estabilidade oxidativa.

	% Extracto (g)		
	sc-Caroço 1H	sc-Caroço 3H	sc-Bagaço 3H
Óleo de girassol	0,05	0,05	-
		0,1	0,1
		1	1

Foram pesadas $3 \pm 0,1$ g de cada amostra (óleo de girassol + extracto) e colocadas em recipientes conectados ao Rancimat 873 (Metrohm, Herisau, Switzerland) e sujeitas a aquecimento 110°C (Figura 2.8). O TI é determinado pelo aumento da condutividade da água desionizada, na qual ao longo do tempo de ensaio, vai borbulhando ar quente (20L/h) que transporta os compostos voláteis provenientes do processo de aquecimento a que as amostras são sujeitas. Para todas as amostras foram efectuadas duas réplicas determinadas o erro associado.

O ponto correspondente ao TI é determinado matematicamente como o máximo da segunda derivada da condutividade da água em função do tempo (ver Figura 2.8) estes valores, apresentados no Capítulo 3 – Secção 1.5 foram determinados recorrendo ao software do equipamento.

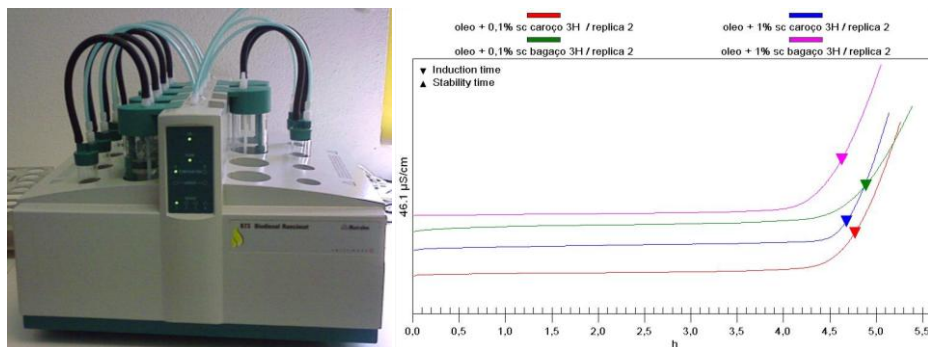


Figura 2.8 – Aparelho Rancimat 873 utilizado para o teste de rancimat e exemplo da aquisição de dados efectuada e respectivas curvas de condutividade em função do tempo.

Efectuou-se a identificação e quantificação dos ácidos gordos existentes nas amostras antes e depois do teste de rancimat (óleo de girassol + extracto), com o intuito de avaliar se ocorreu alguma alteração na composição destas durante o processo de aquecimento a que foram sujeitas. Estas análises foram feitas de acordo com método já referido anteriormente neste capítulo (1.7.Determinação e quantificação dos ácidos gordos).

1.9. Identificação e Quantificação dos Esteróis Vegetais (Fitoesteróis)

As análises de identificação e quantificação foram efectuadas através de colaboração com o Grupo do Professor Doutor João Paulo Crespo na Faculdade de Ciências e Tecnologia, com contribuição especial da sua colaboradora Andreia Teixeira.

A determinação e quantificação dos fitoesteróis presentes nos extractos em estudo foram conseguidas recorrendo a cromatografia gasosa (GC) (Mäeorga, E; et. al, 2007). Foi necessário proceder à saponificação¹ dos extractos lipídicos de caroço e bagaço de azeitona, posteriormente à extracção dos insaponificáveis² e derivatização para que seja possível a análise por GC. A derivatização foi efectuada recorrendo a 50µL de piridina, 100µL de BSTFA (*N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) com 1% de TMS (*chloro-trimethyl-silane*) e incubação a 70°C durante 60 minutos, após o qual se adicionou 5µL de padrão interno (HDS).

As análises cromatográficas foram feitas recorrendo a um GC (*Chrompack CP 9001, Gas chromatograph*) equipado com uma coluna capilar Zobron ZB-5MS (*Phenomenex, U.S.A.*) com 15mx0,25mm, com uma espessura de filme de 0,25µm; a injeção é feita

¹ Consultar Anexo 7 para consultar protocolo da saponificação.

² Consultar Anexo 7 para consultar protocolo da extracção dos insaponificáveis.

on-Colun, e o detector de ionizador de chama encontra-se a 523K. O gás de arraste utilizado foi hélio a 150Kpa. O programa de análise foi: 1min a 333K, 303K/min até aos 3,66min, depois sobe a 278K/min até aos 22,65min, mantém a temperatura até aos 29,65min, depois sobre a 278K/min até aos 50,7min e mantém a temperatura a 58min. A identificação dos ácidos gordos foi feita com base a padrões de externos utilizando uma mistura de compostos de referência. Os cromatogramas obtidos para a análise de GC dos extractos encontram-se no Anexo 12.

2. Extractos Naturais Obtidos a Partir de Refugo de Cereja

2.1. Matérias-primas

Considera-se refugo de cereja, a cereja que não possui calibre para ser comercializada. O refugo é constituído por pedúnculo, polpa e semente. A variedade estudada *Saco* é uma variedade tradicional Portuguesa da zona do Fundão.



Figura 2.9 - A matriz em estudo após o processamento para obtenção de extractos naturais a partir de refugo de cereja *Saco*.

2.2. Processamento das Matérias-primas para obtenção dos Extractos Naturais Derivados da Cereja

O processamento dos do refugo de cereja envolveu numa primeira fase separação das diferentes partes, pedúnculo, polpa e semente. Posteriormente estas são liofilizadas separadamente durante 72 horas (*Edwards Modulyo, UK*). Após a etapa de liofilização procedeu-se à diminuição da granulometria.

2.3. Extractos Convencionais

A extracção sólido-líquido, utilizada para caracterização das matrizes seleccionadas, é também o primeiro passo aplicado no processo integrado de tecnologias limpas aqui estudada. A escolha das condições de operação da extracção aquosas foi realizada com

base em resultados já obtidos em trabalhos realizados anteriormente no laboratório de acolhimento.

As condições óptimas seleccionadas foram razão 20 (m/m) matriz/solvente, agitação em reactor batch a 700rpm durante 60 minutos à temperatura ambiente recorrendo a um agitador mecânico (*IKA – RW20.n, IKA Works, Germany*), a separação dos sólidos foi efectuada por filtração em bückner. Procedeu-se à extracção do refugo de cereja com dois solventes em diferentes proporções: Etanol (100%), Etanol:água 50:50 (v/v) e Metanol (100%), estes solventes encontram-se reportados como os mais indicados para extrair compostos com propriedades antioxidantes como os polifenóis e as antocianinas (Adil, Yener, & Bayindirh, 2008).

2.4. Extractos Supercríticos

Depois da adaptação da instalação de alta pressão para extracção com sc-CO₂, para que fosse possível a utilização de um co-solvente procedeu-se às extracções supercríticas fraccionadas do refugo de cereja. Segue-se o esquema da instalação utilizada para a extracção supercrítica:

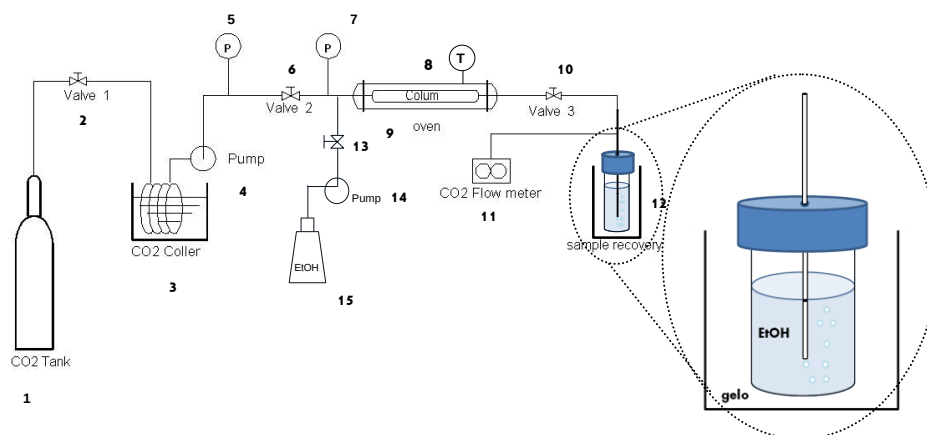


Figura 2.10 - Esquema da montagem utilizada para a extracção supercrítica do refugo de cereja: 1 – garrafa de CO₂; 2, 6, 10, 13 – Válvula de agulha; 3 – Banho de arrefecimento do CO₂; 4, 14 – Bomba de líquidos; 5, 7 – Manómetro; 8 – Forno termostaticado, 9 – Extractor; 11 – Caudalímetro; 12 – Vaso de recolha, 15 – Vaso do Co-Solvente.

As condições de extracção foram escolhidas com base em trabalhos previamente efectuados no laboratório de acolhimento e de acordo com vários estudos publicados (Adil, Yener, & Bayindirh, 2008). O forno que contém o extractor é termostaticado a 50°C, só depois se pressuriza a instalação com CO₂. O dióxido de carbono é liquefeito, por redução da temperatura à saída da garrafa, e pressurizado lentamente com uma bomba de líquidos até à pressão de 25MPa. A instalação permanece a 50°C e 25MPa durante 30 minutos para que o CO₂ pressurizado se vá difundindo lentamente na

matriz. O enchimento da célula do extractor foi efectuado de acordo com o esquema da Figura 2.5. Após os 30 minutos de estabilização abre-se a válvula (Figura 2.10(10)) á saída do extractor e recolhe-se o extracto no vaso de recolha que contém etanol (Figura 2.10(12) e que se encontra em gelo para garantir que conseguimos recolher os compostos voláteis que estamos a extrair.

Para avaliação do processo global de extracção e das vantagens da utilização da extracção supercrítica como um segundo passo de extracção utilizaram-se os extractos alcoólicos e hidroalcoólicos preparados por extracção convencional sólido-líquido como matriz. Para se efectuar este segundo passo de extracção, e de forma a facilitar o manuseamento, foi necessário adicionar aos extractos de cereja maltodextrina (*Sigma, Germany*) (30% m/m) antes de se proceder à sua liofilização.

A extracção supercrítica dividiu-se em 3 etapas (extracção fraccionada), na primeira etapa a extracção foi efectuada apenas com sc-CO₂ durante 1 hora (Fracção 1 – sc-CO₂), na segunda etapa a extracção foi efectuada com sc-CO₂ + 10% de etanol durante 1,5 horas (Fracção 2 – sc-CO₂+10%EtOH (1,5h)) e na terceira etapa extraiu-se utilizando a mesma composição de solvente durante 1 hora (Fracção 3 – sc-CO₂+10%EtOH (+1h)), garantindo sempre que o caudal de CO₂ á saída do extractor foi de 2,3±0,5mL/min. As extracções foram efectuadas sequencialmente e os extractos recolhidos separadamente¹. Os rendimentos de extracção obtidos para as matrizes em estudo em g extracto/ g de matriz encontram-se no *Capítulo 3 – Secção 2.1*.

3. Caracterização dos Extractos Naturais de Cereja

3.1. Determinação dos Polifenóis Totais

3.1.1. Quantificação dos Polifenóis Totais Recorrendo ao Método de Folin-Ciocalteu

A determinação dos polifenóis totais dos extractos convencionais de cereja foi efectuada recorrendo ao método de Folin-Ciocalteu de acordo com o referido anteriormente (1.4.1.1 Método de Folin-Ciocalteu).

¹ Quando se efectuou a extracção supercrítica do refugo de cereja não se efectuou a Etapa 3 – sc-CO₂+10%EtOH (+1h).

3.1.2. Determinação do perfil em Polifenóis Recorrendo a Cromatografia Líquida: HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

A determinação dos polifenóis totais dos extractos de cereja (convencionais e supercríticos) foi efectuada de acordo com o referido anteriormente neste trabalho (1.4.1.2. Determinação do Perfil em Polifenóis Recorrendo a Cromatografia Líquida: HPLC (High-Performance Liquid Chromatography). Os cromatogramas obtidos encontram-se no *Capítulo 3 – secção 2.2.2.* e no *Anexo 15.*

3.2. Avaliação da Capacidade Antioxidante

3.2.1. Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Livre ROO•

3.2.1.1. Método de ORAC

O método utilizado foi o referido anteriormente (1.6.1.

Método de ORAC). Os valores obtidos para a capacidade antioxidante dos extractos em estudo encontram-se no *Capítulo 3 – Secção 2.3.1.1.* Os valores apresentados são a média de ensaios independentes ($n \geq 3$) $\pm$ desvio padrão.

3.2.2. Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Livre HO•

3.2.2.1. Método de HORAC

3.2.3. O método utilizado foi o referido anteriormente (1.6.2 Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Livre HO•

Método de HORAC). Os valores obtidos de HORAC (μmol de CAEAC/ g de extracto, μmol de CAEAC/ g de matriz) encontram-se no *Capítulo 3 – Secção 2.3.2.1*(extractos convencionais e supercríticos de cereja). Os valores apresentados são a média de ensaios independentes ($n \geq 3$) $\pm$ desvio padrão.

3.3. Thin Layer Chromatography (TLC) – Identificação do Álcool Perilílico

A identificação da presença do álcool perilílico nos extractos supercríticos de cereja foi feita recorrendo a cromatografia em camada fina (TLC – Thin Layer Chromatography). Utilizaram-se placas de alumínio cobertas com sílica 0.20mm (Fase Estacionária) (Alugram[®] SilG/ UV₂₅₄, Macherey-Nagel, Germany) e clorofórmio (fase Móvel) (Merck, Germany) para eluir os compostos presentes nos extractos. Os cromatogramas

foram revelados recorrendo a vapores de iodo e observados recorrendo a uma lâmpada de UV a 254nm (Lee, Lee, Kim, Lee, & row, 2000).

Os esquemas dos cromatogramas obtidos encontram-se no *Capítulo 3 – Secção 2.4* e no *Anexo 18*. Os resultados apresentados são resultado de ensaios efectuados em triplicado.

Bibliografia

- Adil, Í. H., Yener, M. E., & Bayindirh. (2008). Extraction of Total Phenolics of Sour Cherry Pomace by High Pressure Solvent and Subcritical Fluid and Determination of Antioxidant Activities of the Extracts. *Separation Science and Technology* , 43, 1091-1110.
- Bektaşoğlu, B., Çelik, S. E., Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2006). Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 345, 1194–1200.
- Bianchi, G. (2003). Lipids and phenols in table olives. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* , 105 , 229–242.
- Bisby, R. H., Brooke, R., & Suppiah, N. (2008). Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food Chemistry* , 108, 1002–1007.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* , 72, 248-254.
- Cao, G., Alissiodagger, H., & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-Radical Absorbance Capacity Assay for Antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* , 14, 303-311.
- Číž, M., Čížová, H., Denev, P., Kratchanova, M., Slavov, A., & Lojek, A. (2009). Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control* .
- Esterbauer H, et al. (1989). Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* , 67.
- Gomes, T., Delcuratolo, D., & Paradiso, V. M. (2008). Pro-oxidant action of polar triglyceride oligopolymers in edible vegetable oils. *Eur Food Res Technol* , 226, 1409–1414.
- Halliwell, B. a. (2004). Measuring Reactive Species and Oxidative Damage in Vivo and in Cell Culture: How Should You Do It and What Do the Results Mean? *British Journal of Pharmacology* , 142, 231–255.
- Huang, D., Ou, B., & L. Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* , 53, 1841-1856.

- Kaliora, A., Dedoussis, G., & Schmidt, H. (2006). Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* , 187, 1-17.
- Lee, Y.-W., Lee, C. H., Kim, J.-D., Lee, Y. Y., & row, K. H. (2000). Extraction of Perillyl alcohol in Korean Orange Peel by Supercritical CO₂. *Separation Science and Technology* , 35 (2), 1069-1076.
- Lopes, I., & Bernardo-Gil, M. (2005). Characterisation of acorn oils extracted by hexane and by supercritical carbon dioxide. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* , 107 , 12–19.
- López-López, A., Montañó, A., Ruíz-Méndez, M. V., & Garrido-Fernández, A. (2008). Sterols, Fatty Alcohols, and Triperpenic Alcohols in Commercial Table Olives. *J. Am. Oil Chem. Soc* , 85, 253-262.
- M.N. Bravo, S. S. (2006). Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Analytica Chimica Acta* , 563, 84–92.
- Mäeorga, E; et. al. (2007). Some important aspects of sterol analysis of vegetable oils. *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.* , 56, 59–66.
- Matias, A. (2008). Desenvolvimento de Óleos Alimentares Funcionais, da Ciência à Aplicação - Dissertação apresentada para obtenção do grau de doutor em Engenharia Química pelo Instituto de Tecnologia Química e Biológica da Universidade Nova de Lisboa. Oeiras.
- Mazziotti, A., Mazzotti, F., Pantusa, M., Sportelli, L., & Sindona, G. (2006). Pro-oxidant Activity of Oleuropein Determined in Vitro by Electron Spin Resonance Spin-Trapping Methodology. *J. Agric. Food Chem.* , 54, 7444-7449.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E. K., Prior, R. L., & Huang, D. (2002). Novel Fluorometric Assay for Hydroxyl Radical Prevention Capacity Using Fluorescein as the Probe. *J. Agric. Food Chem.* , 50, 2772-2777.
- Perretti, G., Montanari, L., & Fantozzi, P. (2006). Lipid Extraction from Olea Europea L. by Supercritical Carbon Dioxide for Analytical Use. *International Journal of Food Engineering* , Volume 2, Issue 2.
- Prior, R.L., et. al. (2005). Standardize methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* , 53, 4290-42302.
- Singleton, V. a. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphor-Molybdicphosphotungstic Acid Reagents. *Amer. J. Enol. Vitic.* , 16, 144-158.
- Temelli, F. (2009). Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. *J. of Supercritical Fluids* , 47, 583–590.

Materiais e Métodos

Zaia, D. A., Zaia, C. T., & Lichtig, J. (1998). Determinação De Proteínas Totais Via Espectrofotometria: Vantagens E Desvantagens Dos Métodos Existentes. *Química Nova*, 21.

Zulueta, A., Esteves, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114, 310–316.

Capítulo 3 - Apresentação e Discussão de Resultados

Etapa 1

1. Caracterização dos Extractos Naturais de Caroço e Bagaço de Azeitona

1.1. Extractos Hidro-alcoólicos

1.1.1. Rendimentos de Extração

A selecção do solvente é um critério importante para a extração dos compostos desejados, como tal neste estudo utilizou-se dois solventes em diferentes proporções: água (100%), etanol (100%) e etanol:água (80:20 v/v). Os rendimentos de extração obtidos para caroço e bagaço de azeitona encontram-se na figura seguinte.

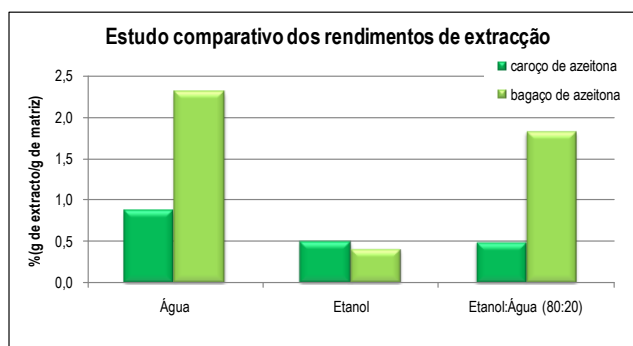


Figura 3.1– Rendimento em g extracto obtido por g de matriz (caroço e bagaço de azeitona) utilizando água, etanol ou etanol:água 80:20 (v/v) como solvente.

Verifica-se que a utilização de água como solvente, nas condições testadas, permite obter rendimentos de extração (% g extracto/g de matriz) mais elevados, sendo o bagaço de azeitona a matriz que permite a obtenção de rendimentos de extração mais elevados para os diferentes solventes estudados.

1.1.2. Determinação dos Polifenóis Totais

1.1.2.1. Método de Folin-Ciocalteu

O estudo dos polifenóis totais foi feito recorrendo ao método de Folin-Ciocalteu que se encontra descrito no *Capítulo 2* e os resultados obtidos são os apresentados de seguida.

Apresentação e Discussão de Resultados

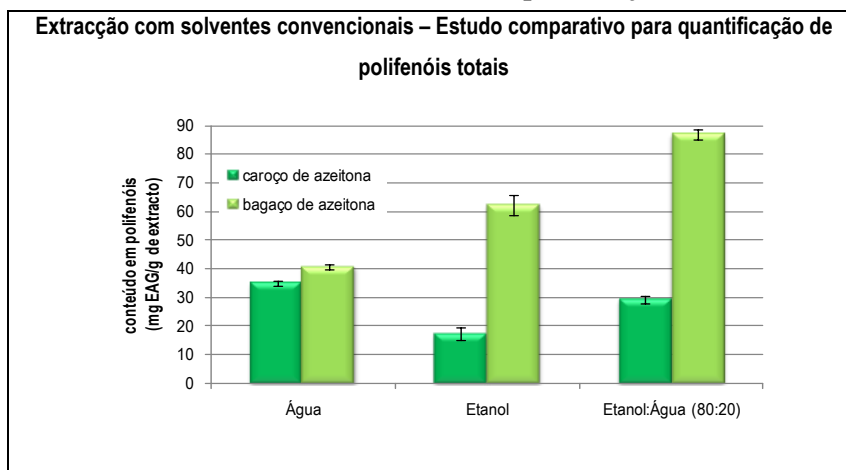


Figura 3.2– Estudo comparativo para os polifenóis totais na extracção do caroço e do bagaço de azeitona com solventes convencionais (água, etanol e etanol:água na proporção 80:20 (v/v)) em polifenóis totais extraídos em cada grama de extracto.

Verifica-se que para o caroço a extracção de polifenóis totais é mais elevada quando utilizamos água (100%) como solvente, no caso do bagaço o melhor solvente é o etanol:água na proporção 80:20(v/v). Os extractos convencionais de caroço de azeitona possuem uma concentração em polifenóis totais inferior aos extractos convencionais de bagaço de azeitona.

Infere-se que o solvente que se revelou mais promissor para a obtenção de um extracto de caroço de azeitona rico em polifenóis é o etanol:água na proporção 80:20 (v/v), ou seja esta é a composição permite seleccionar compostos hidrofílicos e de baixo peso molecular como o tirosol e hidroxitirosol.

Efectuou-se a quantificação do hidroxitirosol nos extractos preparados recorrendo a cromatografia líquida (HPLC) e a uma curva de calibração com hidroxitirosol.

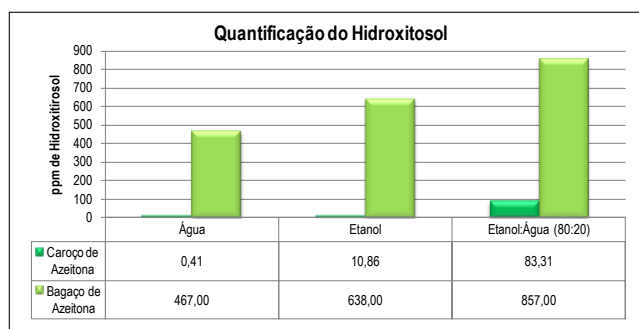


Figura 3.3 - Quantificação do hidroxitirosol (ppm) existente nos diferentes extractos em estudo, ou seja extracção do caroço e do bagaço de azeitona com solventes convencionais (água, etanol e etanol:água na proporção 80:20 (v/v)).

Tal como se pode verificar pela figura anterior os extractos de bagaço de azeitona apresentam uma concentração superior de hidroxitirosol. O solvente mais indicado para

Apresentação e Discussão de Resultados

obter um extracto rico neste polifenol é o etanol:água 80:20 (v/v) para as duas matrizes em estudo devido ao coeficiente de partição deste composto no solvente.

1.1.2.2. Determinação do perfil em Polifenóis Recorrendo a Cromatografia Líquida: HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

Os extractos de caroço e bagaço de azeitona foram analisados por HPLC acoplado com detector de diodos a diferentes comprimentos de onda com o intuito de identificar qual o melhor comprimento de onda para obter o espectro de absorção.

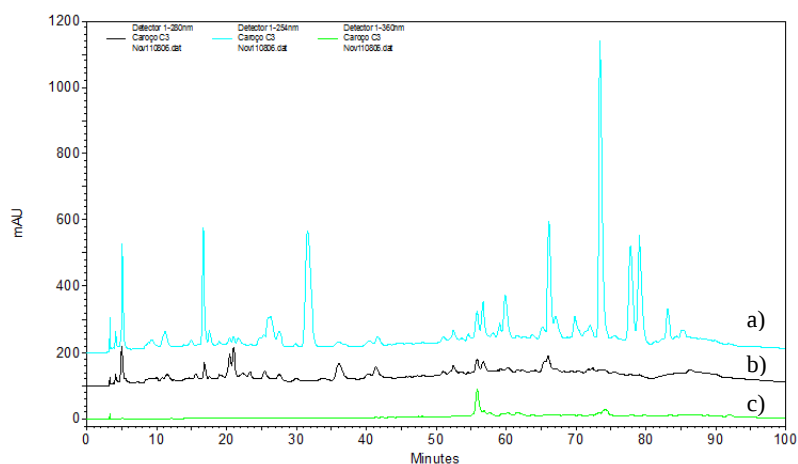


Figura 3.4 - Perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD do extracto de caroço EtOH:H₂O 80:20 (caroço C3) aos comprimentos de onda (c.d.o.) de 254(a)), 280(b)) e 360nm(c)).

A Figura 3.4 mostra que há um maior número de compostos a absorver no comprimento de onda de 254nm. Como tal este foi o comprimento de onda seleccionado para analisar os extractos em estudo.

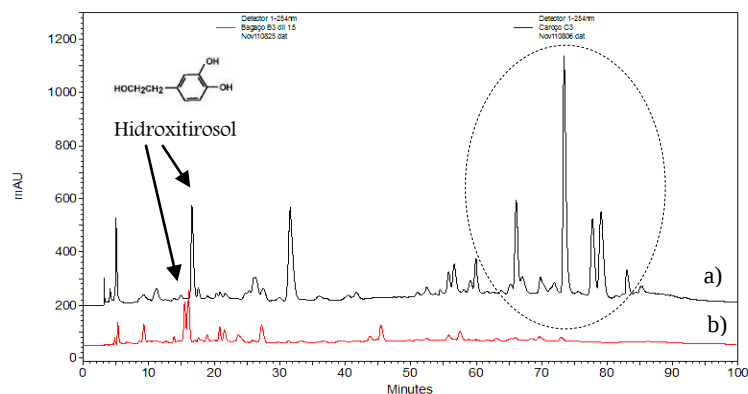


Figura 3.5 – Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto de caroço EtOH:H₂O 80:20(v/v) (Caroço C3 – a)) e extracto de bagaço de azeitona EtOH:H₂O 80:20(v/v) diluído na proporção 1:5 (Bagaço B3 – b)).

Apresentação e Discussão de Resultados

Através da comparação dos perfis cromatográficos dos dois extractos verifica-se a presença de compostos com um tempo de retenção entre os 60 e os 90 minutos apenas no extracto do caroço de azeitona. É de notar que se obtém o mesmo padrão de perfis cromatográficos para todos os extractos de caroço e bagaço de azeitona (ver Anexo 1).

1.1.3. Quantificação da Proteína Total Recorrendo ao Método de Bradford

A quantificação da proteína total existente nos extractos hidro-alcoolicos de caroço e bagaço de azeitona foi determinada recorrendo ao método de Bradford que se encontra descrito no *Capítulo 2*.

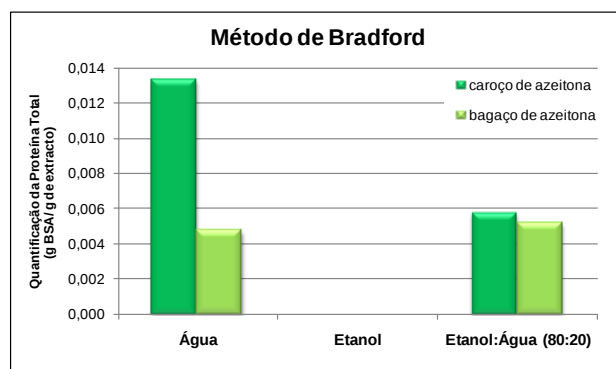


Figura 3.6 – Quantificação da Proteína total (g_{BSA} / g de extracto) existente nos diferentes extractos em estudo, ou seja extracção do caroço e do bagaço de azeitona com solventes convencionais (água, etanol e etanol:água na proporção 80:20 (v/v)).

Verificou-se que o caroço de azeitona é a matriz que permite obter extractos com maiores concentrações de proteína, sendo a água o solvente mais indicado para as extrair. Não foi detectada proteína no extracto com etanol para as duas matrizes em estudo, tal como esperado pois o etanol é responsável pela desnaturação das proteínas.

1.1.4. Avaliação da Capacidade Antioxidante**1.1.4.1. Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Livre $ROO^{\bullet}$** **1.1.4.1.1. Método de ORAC**

A avaliação da actividade antioxidante dos extractos hidro-alcoolicos de caroço e de bagaço de azeitona foi estudada recorrendo ao método de ORAC que se encontra descrito no *Capítulo 2*.

Apresentação e Discussão de Resultados

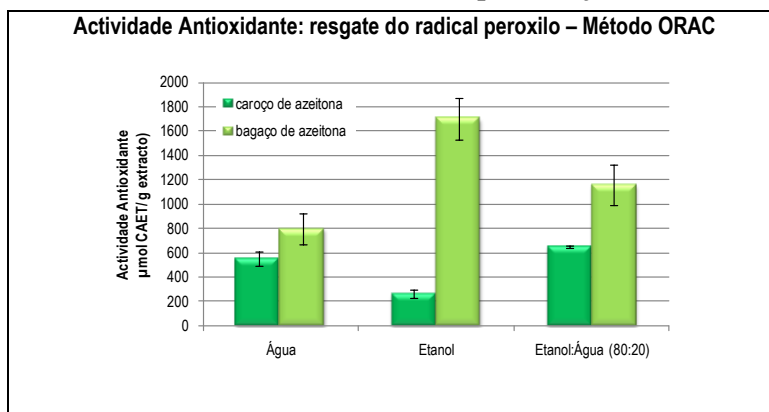


Figura 3.7 – Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante dos extractos convencionais de caroço em $\mu\text{mol CAET/g}$ de extracto, nomeadamente o capacidade de resgate do radical peroxilo determinada pelo método de ORAC.

Os extractos de bagaço de azeitona apresentam capacidade antioxidante mais elevada que os extractos de caroço de azeitona. Verifica-se que o solvente que permite a obtenção de um extracto de bagaço com capacidade de resgate do radical peroxilo mais elevada é o etanol ($\mu\text{mol CAET/g}$ de extracto). O extracto aquoso e o extracto de etanol:água na proporção 80:20 (v/v) de bagaço de azeitona possuem aproximadamente a mesma actividade antioxidante.

1.1.4.2. Avaliação da Capacidade de Inibição da Formação do Radical Livre $\text{HO}^\bullet$

1.1.4.2.1. Método de HORAC

A avaliação da actividade antioxidante dos extractos hidro-alcoolicos de caroço e de bagaço de azeitona em relação ao radical hidroxilo foi estudada recorrendo ao método de HORAC que se encontra descrito no *Capítulo 2*.

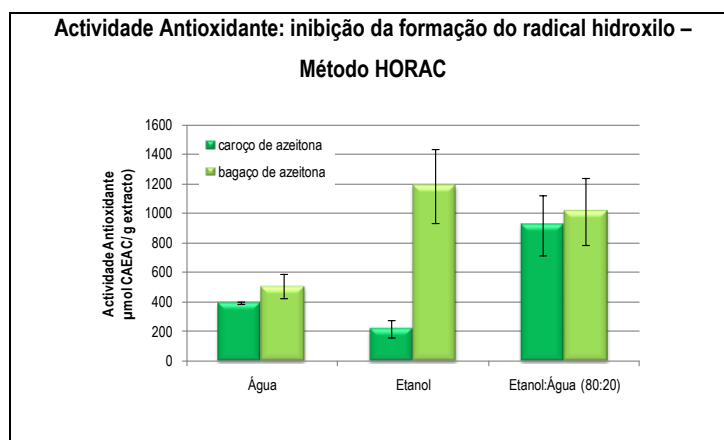


Figura 3.8 – Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante dos extractos convencionais de caroço em $\mu\text{mol de CAEC/g}$ de extracto, nomeadamente a capacidade de resgate do radical hidroxilo determinada pelo método de HORAC.

Apresentação e Discussão de Resultados

O extracto etanólico de bagaço de azeitona possui a capacidade antioxidante mais elevada, no entanto consegue-se obter extractos de caroço e de bagaço de azeitona com actividade antioxidante muito semelhantes quando se utiliza como solvente a água e etanol:água 80:20(v/v).

Os extractos de bagaço de azeitona foram preparados para serem utilizados como ponto de comparação uma vez que esta matriz já encontra amplamente estudada ao contrário do caroço de azeitona. A extracção do bagaço de azeitona permite a obtenção de rendimentos de extracção, concentração em polifenóis no extracto e actividade antioxidante relativamente ao radical peroxilo e hidroxilo mais elevadas que a extracção supercrítica do caroço de azeitona. A utilização de solventes convencionais permite a obtenção extractos de caroço de azeitona ricos em polifenóis, proteína e com actividade antioxidante, relativamente à capacidade de resgate do radical peroxilo e capacidade de inibição de formação do radical hidroxilo.

O solvente que permite a obtenção de um rendimento de extracção do caroço de azeitona mais elevado, água (100%), é também o que permite a obtenção de uma concentração em proteína e polifenóis mais elevada. Por sua vez o extracto etanol:água na proporção 80:20 (v/v) do caroço de azeitona possui uma concentração inferior em polifenóis, mas é o único onde se identificou o hidroxitirosol. É também o extracto que apresenta um valor de ORAC mais elevado, não sendo este muito diferente do obtido para o extracto de caroço de azeitona preparado com água (100%), estes resultados estão relacionados com a concentração semelhante em polifenóis totais existentes nos extractos. O extracto de caroço de azeitona que apresenta um valor de HORAC mais elevado é o obtido utilizando como solvente o etanol:água na proporção 80:20 (v/v) este resultado pode ser relacionado com o facto de este extracto possuir a maior concentração em hidroxitirosol.

Infer-se que o solvente que se revelou mais promissor para a obtenção de um extracto de caroço de azeitona rico em polifenóis, nomeadamente em hidroxitirosol, com propriedades antioxidantes, relativamente aos radicais peroxilo e hidroxilo é o etanol:água na proporção 80:20 (v/v).

A concentração em polifenóis para as duas matrizes em estudo é muito diferente, sendo inferior para o caroço de azeitona, no entanto verificou-se que nos extractos de caroço de azeitona existe um grupo de compostos fenólicos de peso moleculares superiores que não conseguimos encontrar nos extractos de bagaço de azeitona. Os extractos de caroço

Apresentação e Discussão de Resultados

de azeitona podem possuir na sua composição compostos fenólicos de peso molecular elevado como os flavonoides, flavonas e fenóis glucosilados que os extractos de bagaço não possuem (Ou, Hampsch-Woodill, Flanagan, Deemer, Prior, & Huang, 2002). Será interessante em trabalhos futuros tentar identificar e avaliar a sua influência nas características/ actividade antioxidante do extracto em questão.

1.2. Extractos Lipídicos**1.2.1. Rendimentos de Extracção**

Procedeu-se ao estudo comparativo dos rendimentos de extracção da fracção lipídica do caroço e do bagaço de azeitona ao longo do tempo para os dois métodos: i) a extracção em soxhlet com hexano e ii) a extracção supercrítica com sc-CO₂ como solvente, efectuadas de acordo com o procedimento que se encontra descrito no *Capítulo 2*.

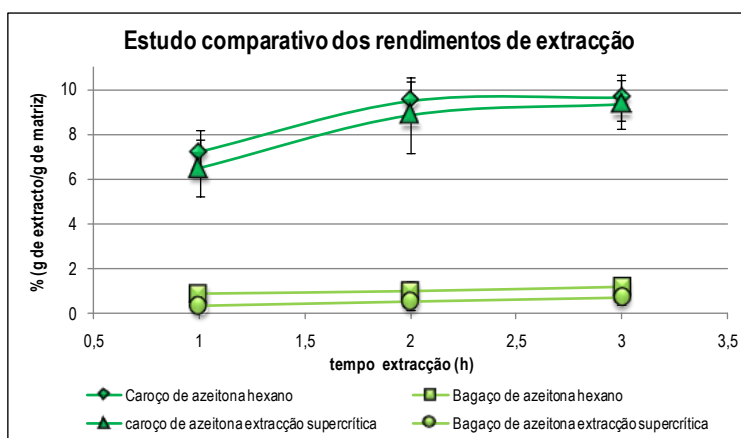


Figura 3.9 – Rendimento em gramas de extracto por grama de matriz (caroço de azeitona e bagaço de azeitona) obtidos ao longo do tempo utilizando como solvente o hexano (caroço de azeitona hexano e bagaço de azeitona hexano) e rendimento em gramas de extracto por gramas de matriz obtidos ao longo do tempo utilizando o sc-CO₂ (caroço de azeitona extracção supercrítica e bagaço de azeitona extracção supercrítica).

Os rendimentos de extracção do caroço de azeitona são superiores comparativamente aos resultados obtidos para o bagaço de azeitona. Para ambas as matrizes a utilização de processos de extracção diferentes, extracção com hexano e extracção supercrítica, permite a obtenção de rendimentos de extracção muito próximos. A diferença observada nos rendimentos de extracção obtidos é devida à diferença nas polaridades do sc-CO₂ e do hexano (Wang, L.; Weller, C. L.; Schlegel, V. L.; Carr, T. P.; Cuppett, S. L., 2007).

1.2.2. Determinação dos Polifenóis Totais¹

1.2.2.1. Quantificação dos Polifenóis Totais Recorrendo a Cromatografia Líquida: HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

O estudo dos polifenóis totais foi feito recorrendo à análise por HPLC acoplado com detector de diodos com o intuito de comparar os perfis cromatográficos dos extractos supercríticos de caroço e bagaço de azeitona em estudo.

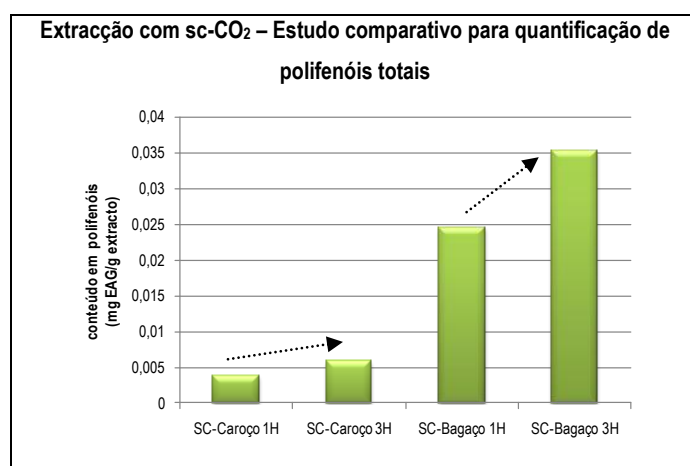


Figura 3.10 – Estudo comparativo para os polifenóis totais na extração supercrítica do caroço e do bagaço de azeitona durante 1 e 3 horas em miligramas de polifenóis totais existente por grama extracto (mg EAG/ g extracto).

Os extractos lipídicos de caroço de azeitona obtidos recorrendo à tecnologia supercrítica apresentam uma concentração inferior em polifenóis comparativamente aos extractos lipídicos de bagaço de azeitona obtidos recorrendo à mesma tecnologia. Para ambas as matrizes, caroço e bagaço de azeitona, a concentração em polifenóis aumenta com o aumento do tempo de extração.

Foi efectuado o estudo do perfil em polifenóis dos extractos lipídicos de caroço e bagaço de azeitona obtidos recorrendo à tecnologia supercrítica através de cromatografia gasosa e o cromatograma obtido encontra-se na figura seguinte.

¹ Não foi determinada recorrendo ao método de Folin-Ciocalteu porque as amostras eram incompatíveis com o método. A solução fica turva e não permite ler a absorvância a 765nm.

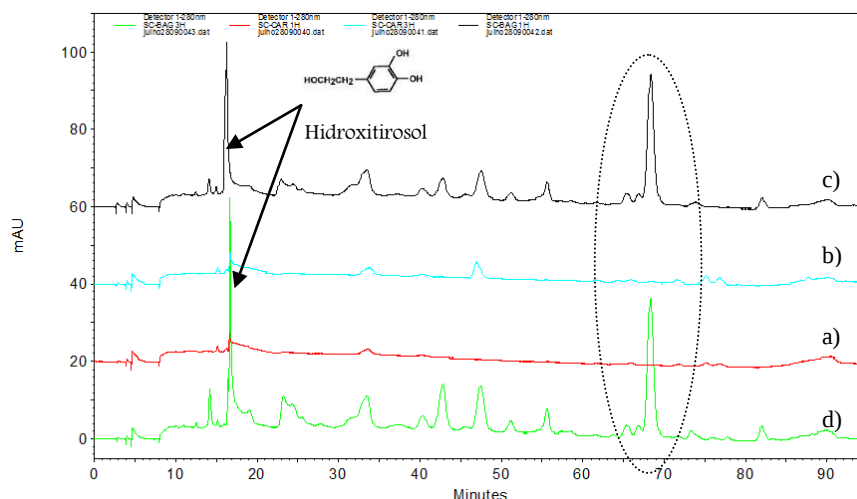


Figura 3.11 - Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 280nm do extractos obtidos recorrendo à tecnologia supercrítica: extracto supercrítico de caroço obtido ao fim de 1 hora (sc-Car 1H – a)); extracto supercrítico de caroço obtido ao fim de 3 horas (sc-Car 3H – b)); extracto supercrítico de bagaço obtido ao fim de 1 hora (sc-Bag 1H – c)) e extracto supercrítico de bagaço obtido ao fim de 3 horas (sc-Bag 3H – d)).

Foi possível identificar nos extractos supercríticos de bagaço de azeitona o hidroxitirosol, verifica-se que a intensidade do pico correspondente aumenta com o tempo de extracção. Nos extractos supercríticos de bagaço de azeitona (c) e d)) existe um pico antes dos 70 minutos que não encontramos no extractos supercríticos de caroço de azeitona, não havendo um aumento na intensidade do pico com o aumento do tempo de extracção. Estes resultados associados aos obtidos através do método de Folin-Ciocalteu revelam que tempos de extracção maiores promovem o aumento na concentração dos polifenóis.

1.3. Avaliação da Capacidade Antioxidante

1.3.1. Avaliação da Capacidade de Resgate do Radical Livre $ROO^\bullet$

1.3.1.1. Método de ORAC

A avaliação da actividade antioxidante dos extractos lipídicos de caroço e de bagaço de azeitona (extracto de hexano¹ e extractos supercríticos) em relação ao radical peróxido foi estudada recorrendo ao método de ORAC o procedimento encontra-se descrito no Capítulo 2.

¹ Não há estudo da Actividade antioxidante para o extracto de Bagaço de Azeitona em hexano de 1H porque não existia extracto suficiente para realizar a análise.

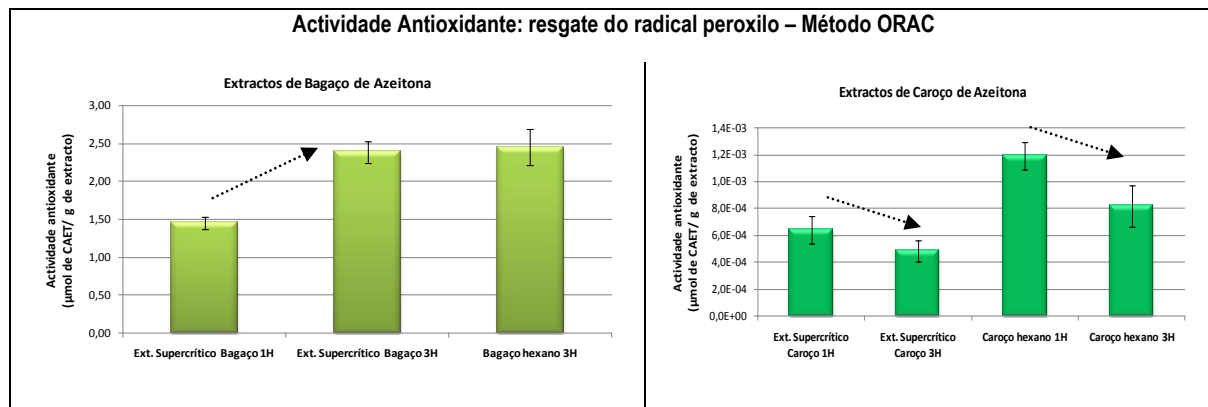


Figura 3.12 – Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante (μmol de CAET/ g de extracto) dos extractos de caroço e bagaço de azeitona obtidos em soxhlet com hexano ao fim de 3 horas (Caroço hexano 3H e Bagaço hexano 3H, respectivamente) e extractos de caroço e bagaço de azeitona obtidos utilizando sc-CO_2 por 1 e 3 horas (Ext. Supercrítico Caroço 1H, Ext. Supercrítico Caroço 3H, Ext. Bagaço Supercrítico 1H e Ext. Supercrítico 3H, respectivamente), nomeadamente o capacidade de resgate do radical peroxilo determinada pelo método de ORAC.

O extracto supercrítico de Bagaço obtido ao fim de 3 horas de extracção (Ext. SC Bagaço 3H) apresenta uma actividade antioxidante superior ao extracto supercrítico obtido ao fim de 1 hora de extracção (Ext. SC Bagaço 1H), os valores obtidos encontram-se concordantes com os publicados para o azeite (Pellegrini, et al., 2003). Os extractos de caroço de azeitona apresentam um comportamento inverso, ou seja tempos mais longos de extracção levam à obtenção de extractos com actividade antioxidante menor, relativamente à capacidade de resgate do radical peroxilo. Estes resultados permitem-nos inferir que tempos maiores de extracção do caroço de azeitona levam à extracção de compostos que promovem o aparecimento de uma sinergia negativa.

O bagaço de azeitona revelou-se a matriz mais promissora para obtenção de extractos com propriedades antioxidantes, no que se refere ao resgate do radical peroxilo, verificando-se que tempos de extracção mais longos permitem a obtenção de extractos de Bagaço de Azeitona com actividade antioxidante superior.

1.3.1.2. Ensaio da Inibição da Auto-oxidação Lipídica Induzida (LDL)

A avaliação da capacidade de resgate do radical peroxilo em substrato lipídico foi determinada recorrendo ao ensaio da inibição da auto-oxidação lipídica induzida, ou seja a avaliação da capacidade dos extractos lipídicos de caroço e bagaço de azeitona (extracto de hexano e extractos supercríticos) na protecção da oxidação da LDL *in vitro* método que se encontra descrito no Capítulo 2. Na figura seguinte encontramos os resultados em percentagem do aumento do tempo de latência na reacção de oxidação da LDL quando se adicionam os extractos à mistura reaccional.

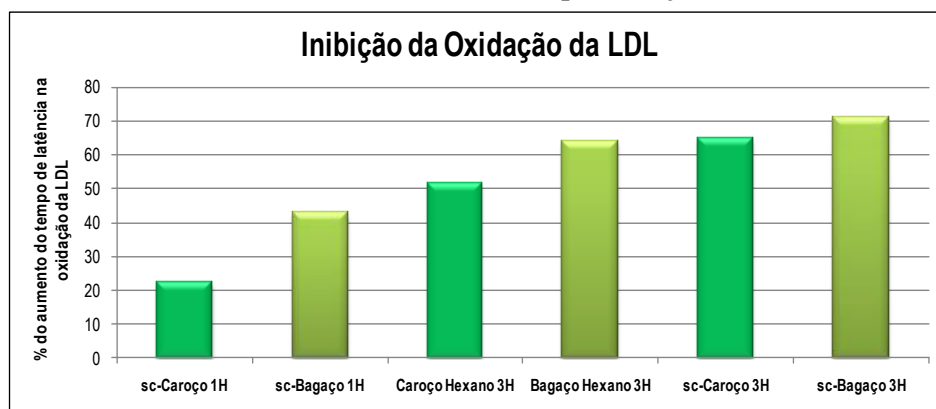


Figura 3.13 – Estudo da inibição da oxidação da LDL por parte dos extractos lipídicos de caroço e bagaço de azeitona em % do aumento do tempo de latência na oxidação da LDL: na presença de AAPH (controlo) e dos extractos de caroço e bagaço de azeitona obtidos em soxhlet com hexano ao fim de 3 horas (Carço hexano 3H e Bagaço hexano 3H, respectivamente) e extractos de caroço e bagaço de azeitona obtidos utilizando sc-CO₂ por 1 e 3 horas (Ext. Supercrítico Carço 1H, Ext. Supercrítico Carço 3H, Ext. Bagaço Supercrítico 1H e Ext. Supercrítico 3H, respectivamente).

A percentagem do aumento do tempo de latência no tempo de oxidação da LDL é maior para os extractos obtidos recorrendo a tempos mais longos de extracção, este comportamento é observado tanto nos extractos supercríticos de caroço de azeitona como nos extractos supercríticos de bagaço de azeitona. É importante ter em consideração que as percentagens de aumento do tempo de latência na oxidação da LDL obtidas para os extractos de 3 horas recorrendo à extracção em soxhlet com hexano são muito próximas às percentagens obtidas para os extractos supercríticos de 3 horas.

Os resultados obtidos para os extractos de bagaço de azeitona através do método de ORAC e do ensaio da auto-oxidação lipídica induzida encontram-se concordantes, ou seja tempos maiores de extracção permitem obter extractos com capacidade antioxidante, relativamente ao resgate do radical peróxido, maior. Esta concordância não se verifica para os extractos supercríticos de caroço de azeitona, os resultados obtidos através do método de ORAC são opostos aos obtidos através do ensaio da auto-oxidação lipídica induzida, ou seja possuem comportamento em substracto lipídico diferente.

1.3.2. Avaliação da Capacidade de Inibição da Formação do Radical Livre HO• (Método de HORAC)

A avaliação da actividade antioxidante perante o radical hidroxilo dos extractos lipídicos de caroço e de bagaço de azeitona (extracto de hexano¹ e extractos

¹ Não há estudo da Actividade antioxidante para o extracto de Bagaço de Azeitona em hexano de 1H porque não existia extracto suficiente para realizar a análise.

Apresentação e Discussão de Resultados

supercríticos) foi estudada recorrendo ao método de HORAC que se encontra descrito no Capítulo 2.

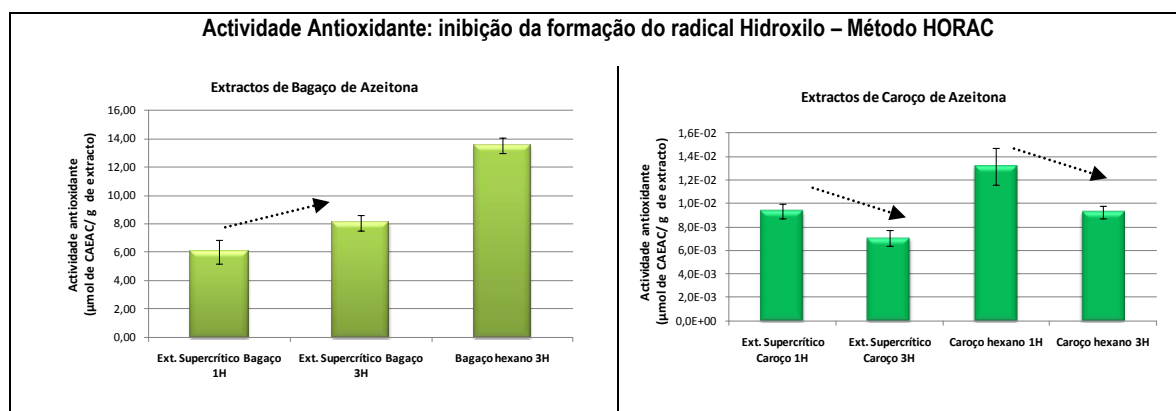


Figura 3.14 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante (µmol de CAEAC/g de extracto) dos extractos de caroço e bagaço de azeitona obtidos em soxhlet com hexano ao fim de 3 horas (Carço hexano 3H e Bagaço hexano 3H, respectivamente) e extractos de caroço e bagaço de azeitona obtidos utilizando sc-CO₂ por 1 e 3 horas (Ext. Supercrítico Carço 1H, Ext. Supercrítico Carço 3H, Ext. Bagaço Supercrítico 1H e Ext. Supercrítico 3H, respectivamente), nomeadamente a capacidade de inibição de formação do radical hidroxilo determinada pelo método de HORAC.

Tempos de extracção maiores levam à obtenção de extractos supercríticos de caroço de azeitona com uma capacidade de inibição de formação do radical hidroxilo menor. Estes promovem a extracção de compostos que levam ao aparecimento de uma sinergia negativa. Os extractos de caroço de azeitona obtidos em soxhlet com hexano apresentam uma actividade antioxidante muito próxima aos extractos obtidos utilizando a extracção supercrítica.

Os extractos supercríticos de bagaço de azeitona apresentam capacidade antioxidante em relação à inibição da formação do radical hidroxilo inferior ao extracto de bagaço de azeitona obtido com hexano e tempos de extracção maiores permitem obter extractos supercríticos de bagaço de azeitona com capacidade antioxidante mais elevada.

Os resultados obtidos para a capacidade antioxidante em relação à inibição da formação do radical livre hidroxilo dos extractos de caroço e bagaço de azeitona encontram-se concordantes com os obtidos para a capacidade de resgate do radical peroxilo através do método de ORAC, ou seja para o bagaço de azeitona tempos maiores promovem a obtenção de extractos com capacidade antioxidante elevada, por sua vez os extractos de caroço de azeitona obtidos para tempos menores possuem capacidade antioxidante maior.

Apresentação e Discussão de Resultados

1.4. Determinação e Quantificação dos Ácidos Gordos

A determinação e quantificação dos ácidos gordos presentes nos extractos lipídicos de caroço e de bagaço de azeitona obtidos utilizando diferentes processos de extracção (extracção com hexano e extracção com sc-CO₂) foram obtidas recorrendo a cromatografia gasosa a metodologia utilizada encontra-se descrita no Capítulo 2.

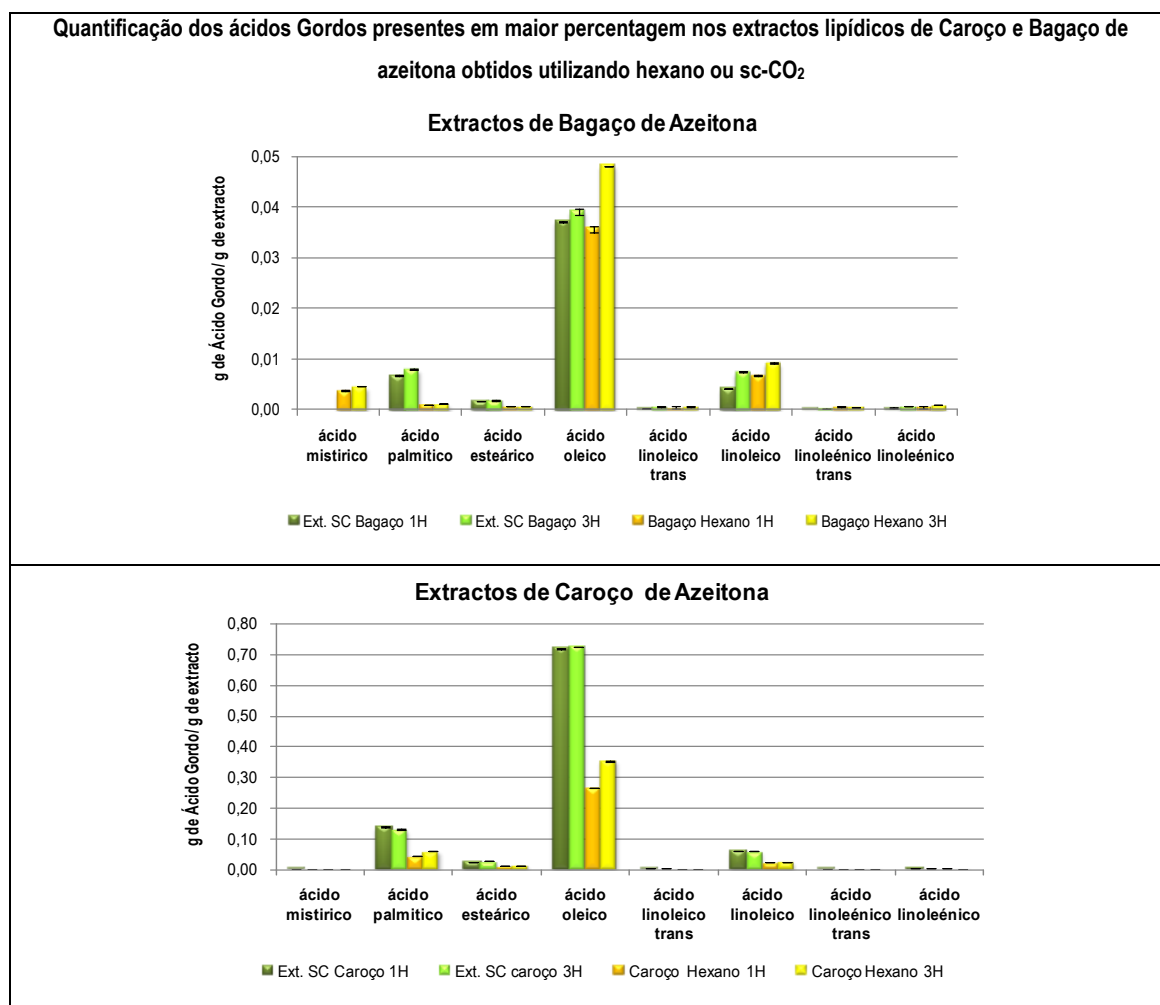


Figura 3.15 – Estudo comparativo do perfil dos ácidos gordos (g de Ácido Gordo/g de extracto) presentes nos extractos lipídicos de Caroço e Bagaço de Azeitona obtidos em soxhlet com hexano (Caroço Hexano 1H, Caroço Hexano 3H, Bagaço Hexano 1H e Bagaço Hexano 3H) e extractos lipídicos de Caroço e Bagaço de Azeitona obtidos usando sc-CO₂ (Ext. SC Caroço 1H, Ext. SC Caroço 3H, Ext. SC Bagaço 1H e Ext. SC Bagaço 3H).

Os extractos de bagaço de azeitona obtidos utilizando os dois processos de extracção diferentes apresentam a mesma composição em ácidos gordos diferindo entre si apenas quantitativamente. É de notar que os extractos supercríticos de bagaço de azeitona têm aproximadamente a mesma quantidade de ácido oleico, no entanto esta é ligeiramente superior para o extracto obtido em soxhlet com hexano durante 3 horas. Para o mesmo tempo de extracção a utilização da extracção supercrítica ou extracção com hexano em

Apresentação e Discussão de Resultados

soxhlet, permitem a obtenção de extractos de bagaço de azeitona com aproximadamente a mesma quantidade de ácido oleico. Por sua vez a extracção supercrítica do bagaço de azeitona permite obter extractos que possuem uma quantidade de ácido palmítico superior aos extractos obtidos usando hexano.

Os extractos supercríticos de caroço de azeitona possuem uma quantidade de ácido oleico superior aos extractos obtidos utilizando hexano, observa-se que tempos superiores de extracção permitem obter extractos com quantidades de ácido oleico maiores para ambos os processos utilizados. Tal como os extractos supercríticos de Bagaço de Azeitona, os extractos supercríticos de Caroço de azeitona possuem uma quantidade de ácido palmítico superior aos extractos obtidos usando hexano. O ácido linoleico encontra-se em maior quantidade nos extractos supercríticos de caroço de azeitona e verifica-se que para os diferentes tempos de extracção a quantidade extraída é aproximadamente a mesma.

Os extractos de bagaço de azeitona em estudo possuem aproximadamente a mesma concentração em ácido linoleico, o que nos indica que conseguimos a mesma selectividade deste composto utilizando os dois processos de extracção diferentes, a extracção supercrítica e extracção com hexano.

A matriz que se revelou mais promissora na obtenção de um extracto rico em ácidos gordos que possuem bioactividade comprovada, como o ácido oleico, é o caroço de azeitona e o processo que se revelou mais indicado foi a extracção supercrítica. Quando comparamos a composição em ácidos gordos dos extractos supercríticos de caroço de azeitona obtidos ao fim de uma hora com a dos extractos obtidos ao fim de três horas verificamos que ao aumentarmos o tempo de extracção estamos a enriquecer o extracto em ácidos gordos de cadeia mais curta que não estão identificados.

1.5. Determinação da Estabilidade Oxidativa

A estabilidade oxidativa do óleo de girassol quando se incorporam diferentes percentagens dos extractos supercríticos de caroço e de bagaço de azeitona foi estudada recorrendo ao teste de rancimat de acordo com o descrito no *Capítulo 2*.

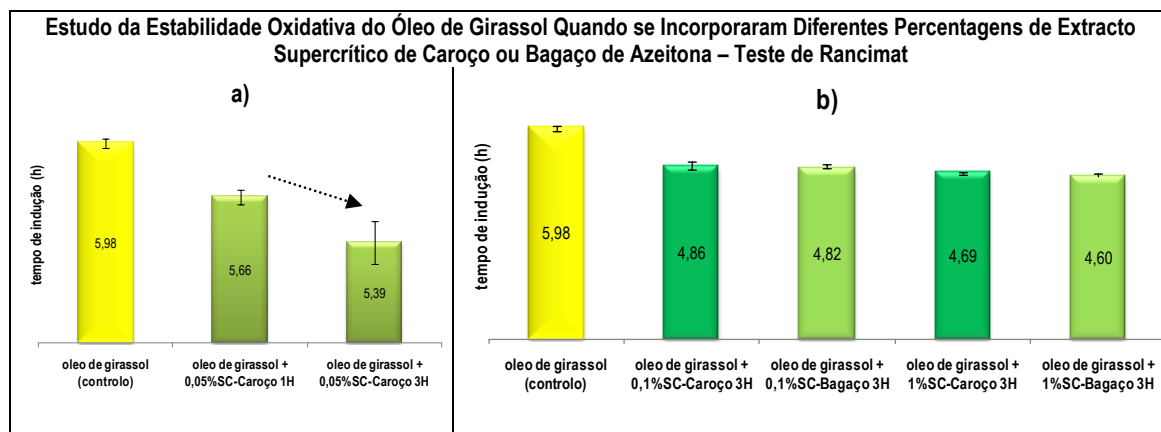


Figura 3.16 – a) Estudo comparativo da estabilidade oxidativa, ou seja do tempo de indução do óleo de girassol, óleo de girassol com 0,05% (m/m) de extracto supercrítico de Caroço de Azeitona de 1H (óleo de girassol+ 0,05% SC-Caróço1H) e óleo de girassol com 0,05% (m/m) de extracto supercrítico de Caroço de Azeitona de 3H (óleo de girassol+ 0,05% SC-Caróço 3H); **b)** Estudo comparativo da estabilidade oxidativa, ou seja do tempo de indução do óleo de girassol, óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Caroço de Azeitona de 3H (óleo de girassol + 0,1% SC-Caróço 3H), óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3H (óleo de girassol + 0,1% SC-Bagaço 3H), óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Caroço de Azeitona de 3H (óleo de girassol + 1% SC-Caróço 3H) e óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3H (óleo de girassol + 0,1% SC-Bagaço 3H).

Através do teste de rancimat observa-se que a adição dos diferentes extractos supercríticos de caroço e de bagaço de azeitona ao óleo de girassol leva à diminuição do tempo de indução, que e quanto maior a percentagem adicionada maior a diminuição observada. Quando adicionamos a mesma percentagem de extracto supercrítico de caroço de azeitona obtido ao fim de uma hora de extracção e de extracto supercrítico de azeitona obtido ao fim de três horas de extracção ao óleo de girassol verificamos que o último leva a uma diminuição maior no tempo de indução. Este comportamento leva-nos a crer que os extractos supercríticos estudados possuem efeito pró-oxidativo este facto encontra-se concordante com os resultados obtidos para a capacidade antioxidante através do método ORAC e HORAC.

Quando se recorre á análise da composição em ácidos gordos das amostras testadas (óleo de girassol + extracto supercrítico de caroço ou bagaço de azeitona) antes e depois do teste de rancimat, consultar Anexo 8 e Anexo 9, verifica-se que a massa em percentagem em ácido oleico decresce enquanto a do ácido linoleico aumenta. Este resultado leva-nos a crer que o processo de aquecimento a que as amostras são sujeitas leva ao aparecimento de compostos que promovem a oxidação. É importante ter em consideração que o ácido linoleico possui duas ligações duplas, e que na configuração *trans* contribuem para a estabilidade do mesmo, e que por sua vez a conjugação das ligações duplas é um dos primeiros passos da auto-oxidação lipídica, e que a partir deste

Apresentação e Discussão de Resultados

ponto se iniciam as reacções em cadeia do processo oxidativo, o que sugere que este composto possa actuar como pró-oxidante (Santos-Zago, Botelho, & Oliveira, 2008).

1.6. Determinação e Quantificação dos Esteróis Vegetais (Fitoesteróis)

A identificação e quantificação dos esteróis presentes nos extractos lipídicos de caroço e bagaço de azeitona, extractos de hexano e extractos supercríticos, foram efectuadas recorrendo a cromatografia gasosa de acordo com a metodologia que se encontra no Capítulo 2.

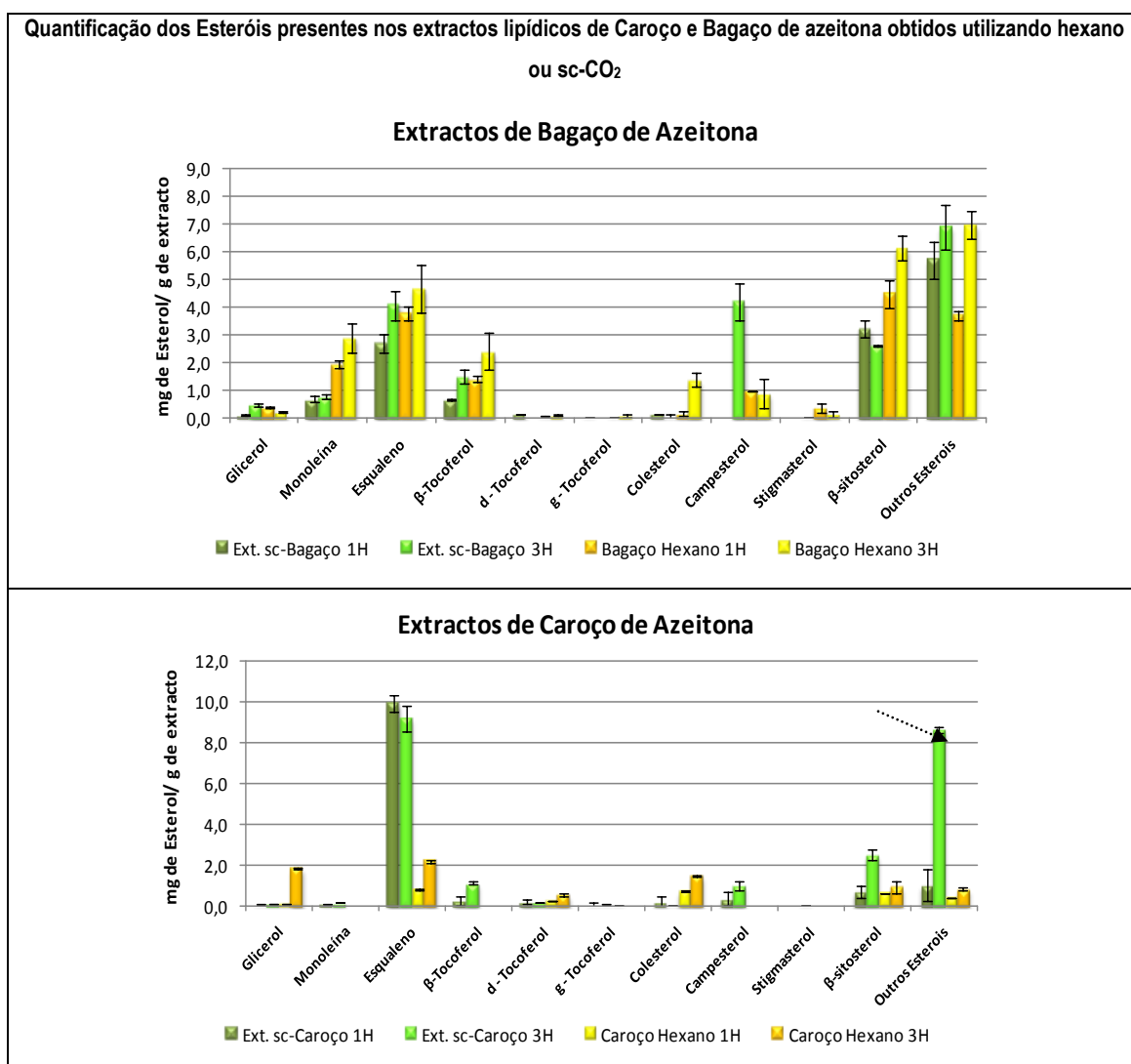


Figura 3.17 - Estudo comparativo do perfil de esteróis (mg de esterol /g de extracto) presentes nos extractos lipídicos de Caroço e Bagaço de Azeitona obtidos em soxhlet com hexano (Caroço hexano 1H, Caroço hexano 3H, Bagaço hexano 1H e Bagaço hexano 3H) e extractos lipídicos de Caroço e Bagaço de Azeitona obtidos usando sc-CO₂ (Ext. SC Caroço 1H, Ext. SC Caroço 3H, Ext. SC Bagaço 1H e Ext. SC Bagaço 3H).

Por observação da figura anterior (Figura 3.17) verifica-se que a extracção supercrítica do caroço de azeitona permite a obtenção de extractos com um teor em esteróis superior aos extractos obtidos recorrendo à extracção em soxhlet com hexano. Os extractos

Apresentação e Discussão de Resultados

supercríticos de caroço de azeitona possuem uma elevada concentração de esqualeno. O extracto supercrítico de caroço de azeitona de 3 horas possui aproximadamente a mesma quantidade de esqualeno que o extracto de 1 hora, ou seja quando prolongamos o tempo de extracção estamos apenas a enriquecer o extracto noutros esteróis. No presente trabalho conseguiram-se obter extractos de bagaço de azeitona com uma concentração em esqualeno aproximada à existente no azeite (azeite extra virgem 4,24mg/g e azeite refinado 3,24mg/g (Owen, Mier, Giavosa, Hull, Spiegelhalder, & Bartsch, 2000)), independentemente do tempo e do processo de extracção utilizado. No entanto verifica-se que a extracção supercrítica do caroço de azeitona permite obter um extracto rico em esqualeno e com uma concentração superior à reportada para os azeites. Existem vários estudos que comprovam que o esqualeno contribui para a protecção da oxidação do óleo e o grau de protecção é dependente da concentração de esqualeno, ou seja o efeito protector deste aumenta com o aumento da concentração (Psomiadou & Tsimidou, 1999). Podemos afirmar que a utilização da extracção supercrítica para a obtenção de extractos lipídicos de caroço de azeitona ricos em compostos biofuncionais é vantajosa. O esqualeno devido à sua estrutura é mais provável que resgate as espécies reactivas de oxigénio do que os radicais hidroxilo, este comportamento pode explicar os resultados obtidos para a capacidade antioxidante, determinada pelo método de ORAC e HORAC para os extractos de caroço de azeitona (Waterman & Lockwood, 2007). Os extractos de caroço e bagaço de azeitona obtidos neste estudo possuem na sua composição uma concentração em β -sitosterol de acordo com o referenciado para o azeite e óleos derivados da azeitona (Cañabate-Díaz, et al., 2007), esta concentração é superior à existente nos extractos de caroço de azeitona. É importante realçar que o extracto supercrítico de caroço de azeitona obtido ao fim de 3 horas possui três vezes mais β -sitosterol que o extracto obtido ao fim de 1 hora, levando-nos a crer que ao prolongarmos o tempo de extracção estamos a promover a extracção deste composto.

A utilização da tecnologia supercrítica é vantajosa porque permitiu obter rendimentos de extracção iguais aos conseguidos recorrendo à utilização de solventes orgânicos como o hexano, a matriz que permitiu obter rendimentos de extracção mais elevados foi o caroço de azeitona. Com o presente trabalho conseguimos obter extractos de caroço e bagaço de azeitona ricos em compostos com propriedades bioactivas reportadas através de diversos estudos.

O conteúdo total em polifenóis está correlacionado com a estabilidade oxidativa dos azeites, no entanto esta correlação com os tocoferóis é muito baixa, os tocoferóis

Apresentação e Discussão de Resultados

encontram-se reportados como um dos principais antioxidantes, possuem a capacidade de resgatar duas moléculas de radicais peróxido e a sua actividade antioxidante encontra-se amplamente reportada (Laguerre, Lecomte, & Villeneuve, 2007), é possível encontrar este comportamento nos extractos de bagaço de azeitona obtidos utilizando hexano ou sc-CO₂, ou seja os extractos que possuem concentrações superiores de polifenóis apresentam uma actividade antioxidante maior apesar de possuírem um conteúdo inferior em tocoferóis. O comportamento inverso observado para os extractos supercríticos de caroço de azeitona pode ser explicado pela existência no extracto de outros esteróis que não se encontram identificados e que provavelmente diminuem a estabilidade oxidativa. Os extractos de bagaço de azeitona apresentam actividade antioxidante superior aos extractos de caroço de azeitona. Por sua vez os extractos supercríticos de caroço de azeitona possuem uma concentração em ácidos gordos superior, nomeadamente em ácido oleico, linoleico e palmítico, apresentam também uma concentração de esteróis superior, nomeadamente de esqualeno e um conjunto de outros esteróis não identificados aos extractos de bagaço de azeitona. Tendo em consideração a sua composição, os extractos supercríticos de caroço de azeitona possuem potencial, por exemplo, para aplicação na indústria cosmética, uma vez que os testes de estabilidade oxidativa mostraram que a adição destes ao óleo de girassol possuem efeito pró-oxidativo o que nos leva a crer que não será vantajosa a utilização deste extracto como aditivo na indústria dos óleos alimentares. Sugere-se que se dê continuidade à caracterização dos extractos obtidos para explorar as potencialidades destes. Outro estudo interessante será a avaliação da actividade antioxidante destes extractos lipídicos *in vitro* com linhas celulares humanas, estes ensaios permitem, por exemplo, compreender de que forma os extractos bioactivos actuam na protecção das células das ROS. Outra abordagem poderá ser efectuada a encapsulação dos extractos lipídicos de caroço de azeitona e avaliar se esta formulação permite aumentar a biodisponibilidade dos compostos bioactivos existentes nos extractos.

Etapa 2**2. Caracterização dos Extractos Naturais de Cereja**

Para avaliação do processo global de extracção e das vantagens da utilização da extracção supercrítica como um segundo passo de extracção utilizaram-se os extractos alcoólicos e hidroalcoólicos preparados por extracção convencional sólido-líquido como matriz. Para se efectuar este segundo passo de extracção, e de forma a facilitar o manuseamento, foi necessário adicionar aos extractos de cereja maltodextrina (30% m/m) antes de se proceder à sua liofilização.

A extracção supercrítica, fraccionada, foi efectuada de acordo com o procedimento descrito anteriormente no *Capítulo 2* e de acordo com a tabela seguinte (Tabela 3.1), os extractos obtidos para as diferentes fracções foram recolhidos e analisados separadamente.

Tabela 3.1 – Metodologia aplicada no processo de extracção supercrítica¹

		Solvente	Tempo de Extracção (h)
Cereja	Fracção 1	sc-CO ₂	1
	Fracção 2	sc-CO ₂ + 10% EtOH	1,5
	Fracção 3	sc-CO ₂ + 10% EtOH	-
EtOH:H ₂ O (50:50)	Fracção 1	sc-CO ₂	1
	Fracção 2	sc-CO ₂ + 10% EtOH	1,5
	Fracção 3	sc-CO ₂ + 10% EtOH	1
100% EtOH	Fracção 1	sc-CO ₂	1
	Fracção 2	sc-CO ₂ + 10% EtOH	1,5
	Fracção 3	sc-CO ₂ + 10% EtOH	1
100% MeOH	Fracção 1	sc-CO ₂	1
	Fracção 2	sc-CO ₂ + 10% EtOH	1,5
	Fracção 3	sc-CO ₂ + 10% EtOH	1

2.1. Rendimentos de Extracção

Rendimentos de extracção obtidos para a extracção do refugo de cereja efectuadas de acordo com a metodologia descrita no *Capítulo 2*.

¹ Quando se efectuou a extracção supercrítica do refugo de cereja não se efectuou a Fracção 3.

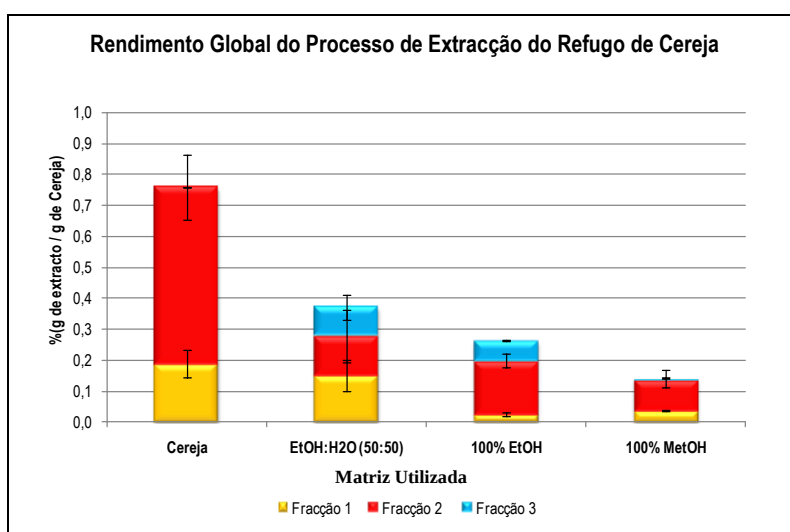


Figura 3.18 – Rendimento global do processo de extração de cereja em % de g de extracto/ g de cereja.

A extração da cereja com solventes convencionais tem como objectivo a obtenção de extractos ricos em compostos fenólicos, estes extractos são atractivos por serem uma fonte natural de antioxidantes. Ao utilizarmos o metanol como solvente, que se encontra reportado como o mais indicado para a extração de antocianinas, impedimos a decomposição dos compostos fenólicos e tornamos a preparação do extracto mais simples devido à elevada volatilidade do metanol (Mozetic, Trebse, & Hribar, 2002). Por outro lado alguns estudos mostram que o etanol e a água são bons solventes para obter extractos ricos em polifenóis a partir de uma matriz natural, e como tal recorreu-se à extração da cereja com etanol e etanol:água 50:50 (v/v) (Shi, Pohorly. J., C., Bryan, & Wu, 2003).

A extração supercrítica da cereja permite a obtenção de rendimentos de extração maiores para a Fracção 1 e 2. Dos três extractos de cereja utilizados como matriz na extração supercrítica, o extracto de EtOH:H₂O (50:50) é o que permite a obtenção do rendimento de extração global mais elevado. A Fracção 3 foi efectuada apenas para os extractos de cereja para promover o aumento do rendimento extração. No caso da extração supercrítica da cereja não foi necessário proceder a mais uma fracção de extração porque o rendimento já se encontrava de acordo com os resultados obtidos em estudos em curso no laboratório de acolhimento.

2.2. Determinação dos Polifenóis Totais

O estudo dos polifenóis totais dos extractos convencionais foi efectuado de acordo com a metodologia que se encontra descrita no *Capítulo 2*, os resultados obtidos são os apresentados de seguida.

2.2.1. Quantificação dos Polifenóis Totais Recorrendo ao Método de Folin-Ciocalteu

O estudo dos polifenóis totais dos extractos convencionais foi feito recorrendo ao método de Folin-Ciocalteu.

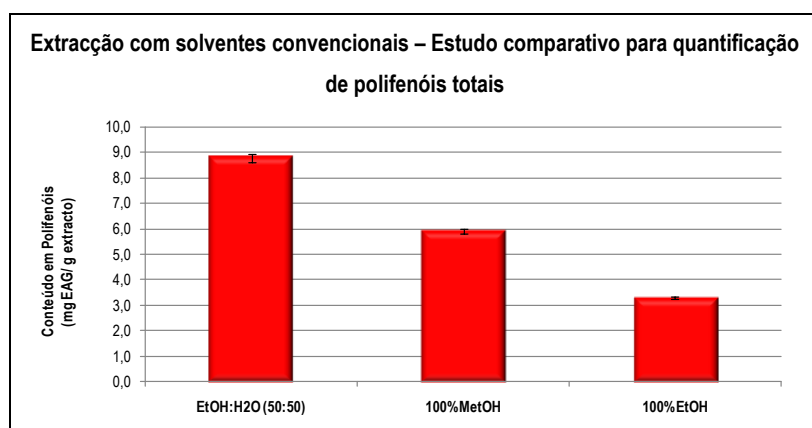


Figura 3.19 – Estudo comparativo para os polifenóis totais na extracção da cereja com solventes convencionais: etanol:água na proporção 50:50 (v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100% EtOH e 100%MetOH) em mg de EAG/g de extracto à esquerda e em mg EAG/g matriz à direita.

Este método não foi aplicado aos extractos supercríticos porque estes são incompatíveis com o método, desta forma procedeu-se à quantificação dos polifenóis através de HPLC e uma recta de calibração com ácido gálico.

2.2.2. Quantificação dos Polifenóis Totais Recorrendo a Cromatografia Líquida: HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

A determinação dos polifenóis totais dos extractos de cereja (convencionais e supercríticos) foi efectuada recorrendo a cromatografia líquida (HPLC) e a uma curva de calibração de ácido gálico.

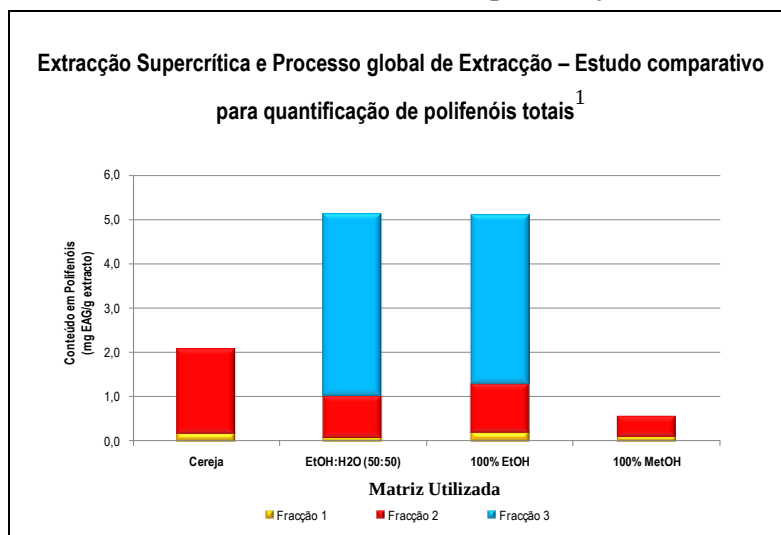


Figura 3.20 - Estudo comparativo para os polifenóis totais extraídos para o processo global de extracção da cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente) em mg de EAG/g de cereja à esquerda e mg de EAG/g extracto à direita.

¹ Não foi possível efectuar a quantificação dos polifenóis totais para o extracto supercrítico obtido na etapa 3 do extracto 100%MetOH por não existir quantidade de extracto suficiente para análise.

Quando se procede à extracção da cereja com solventes convencionais com as composições EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH verifica-se que a que permite a obtenção de um extracto mais concentrado em polifenóis é o EtOH:H₂O (50:50).

No processo global de extracção verifica-se que o conteúdo em polifenóis existente nos extractos aumenta com o aumento do tempo de extracção e que a utilização do etanol como co-solvente promove o aumento da extracção de polifenóis.

2.2.3. Determinação do perfil em Polifenóis Recorrendo a Cromatografia Líquida: HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)¹

Os extractos em estudo foram analisados por HPLC e procedeu-se à detecção no comprimento de onda (λ) de 280nm, característico para os compostos fenólicos e a 360nm característico dos compostos da família dos flavonóis.

¹ em anexo encontram-se os cromatogramas obtidos por HPLC-DAD no c.d.o 360nm, característico dos compostos da família dos flavonóis.

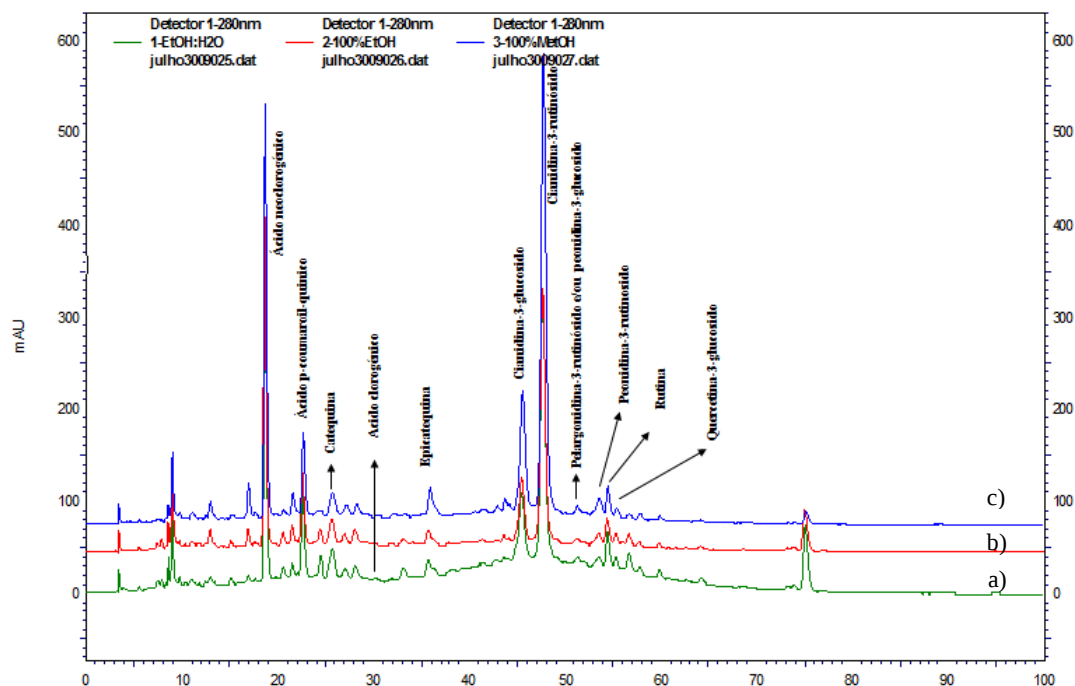


Figura 3.21- Perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD no c.d.o 280nm recorrendo ao HPLC-DAD do extracto de cereja sacro EtOH:água 50:50 (a)), extracto de cereja sacro 100% EtOH(b)) e extracto de cereja 100% MetOH(c)).

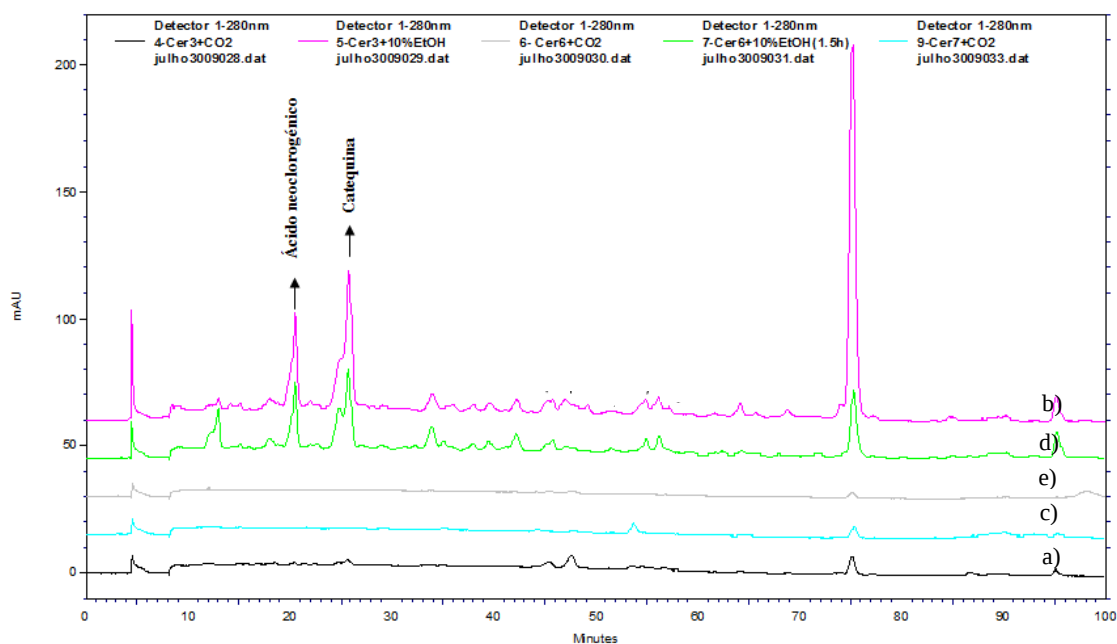


Figura 3.22- Perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD no c.d.o 280nm dos extractos supercríticos: extracção da cereja com sc-CO₂ durante 1 hora – Etapa 1 (a)), extracção da cereja com sc-CO₂ + 10% etanol durante 1,5 horas – Etapa 2 (b)), extracção do extracto EtOH:H₂O 50:50 (v/v) com sc-CO₂ durante 1 hora – Etapa 1 (c)), extracção do extracto EtOH:H₂O 50:50 (v/v) com sc-CO₂ durante 1,5 horas – Etapa 2 (d)), extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO₂ durante 1 hora – Etapa 1 (e)).

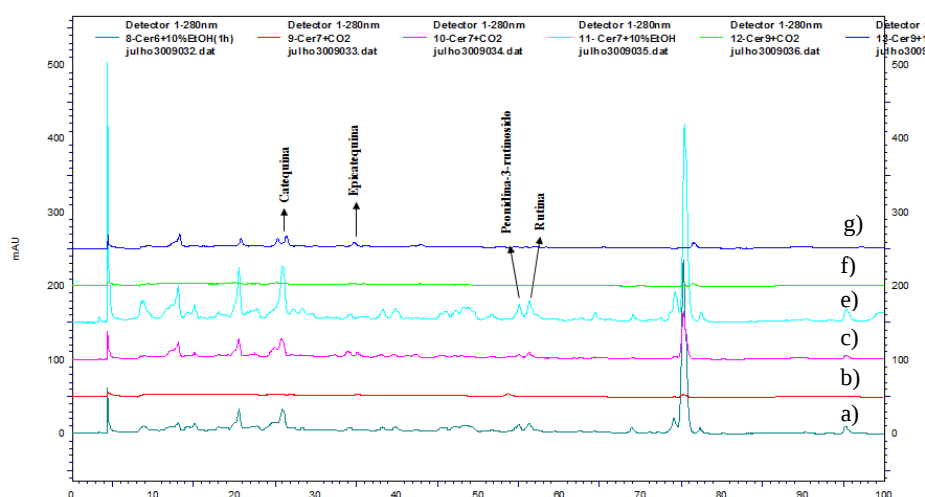


Figura 3.23 - Perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD no c.d.o 280nm dos extractos supercríticos: extracção do extracto EtOH:H2O 50:50 (v/v) com sc-CO2 durante 1 horas – Etapa 3 (a)), extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO2 durante 1 hora – Etapa 1 (b)), extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO2 + 10%EtOH durante 1,5 horas – Etapa 2 (c)), extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO2 + 10%EtOH durante 1 hora – Etapa 3 (e)), extracção do extracto 100% MetOH com sc-CO2 durante 1 hora – Etapa 1 (f)), extracção do extracto 100% MetOH com sc-CO2 + 10% EtOH durante 1,5 horas – Etapa 2 (g)).

Os espectros de HPLC dos extractos supercríticos revelam que o processo de extracção global em estudo permite seleccionar e concentrar os extractos em determinados polifenóis. Os cromatogramas obtidos para os extractos na Fracção 1 estão de acordo com os resultados obtidos para a quantificação dos polifenóis totais, ou seja os extractos possuem um conteúdo em polifenóis muito baixo. Os extractos obtidos na Fracção 2 e Fracção 3 possuem um conteúdo em polifenóis superior porque a utilização do modificador de fase, o etanol, que permite alterar a polaridade do CO₂ e promover a extracção de moléculas com polaridades superiores como os polifenóis (Camy & Condoret, 2006), e a concentração em polifenóis aumenta com o tempo de extracção. Quando recorremos à análise dos perfis cromatográficos dos extractos em estudo verificamos que os cromatogramas dos extractos convencionais e dos extractos supercríticos obtidos na Etapa 2 e 3 apresentam um pico aos 75min, e este possui uma intensidade maior para os extractos supercríticos, como estes se encontram todos com a mesma concentração podemos inferir que a extracção supercrítica dos extractos permite obter uma selectividade maior para este composto e como consequência um extracto mais concentrado. Através de trabalhos em curso no laboratório de acolhimento, nomeadamente análise por HPLC-MS/MS, deduz-se que o composto poderá ser um glucosido da sakuranetina, a sakuranina.

2.3. Avaliação da Capacidade Antioxidante

2.3.1. Avaliação da capacidade de resgate do radical livre $ROO^\bullet$

2.3.1.1. Método de ORAC

A avaliação da actividade antioxidante dos extractos de cereja (extractos convencionais e extractos supercríticos) foi estudada recorrendo ao método de ORAC de acordo com o descrito no *Capítulo 2*. Os resultados obtidos encontram-se de seguida e no *Anexo 17*.

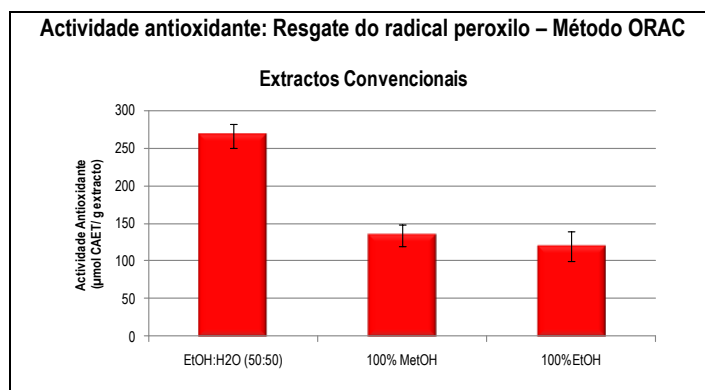


Figura 3.24 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante (μmol de CAET/ g de extracto) para extracção da cereja com solventes convencionais: etanol:água na proporção 50:50 (v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100% EtOH e 100%MeOH), nomeadamente a capacidade de resgate do radical peroxilo determinada pelo método de ORAC.

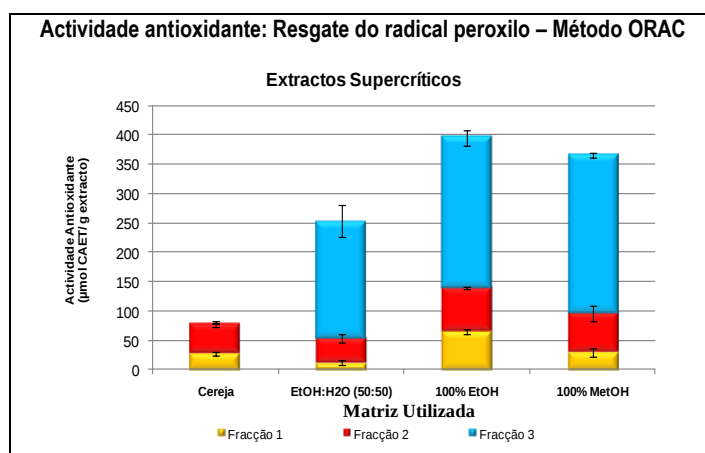


Figura 3.25 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante (μmol de CAET/ g de extracto) dos extractos supercríticos de cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MeOH, respectivamente), nomeadamente a capacidade de resgate do radical peroxilo determinada pelo método de ORAC.

Na extracção da cereja utilizando EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MeOH) verifica-se que o solvente que permite a obtenção de um extracto com capacidade antioxidante mais elevada perante o radical peroxilo é o 100%EtOH.

Na Fracção 1 conseguiram-se obter extractos supercríticos com actividade antioxidante aproximadamente igual quando se utiliza a cereja como matriz e quando se utiliza o

Apresentação e Discussão de Resultados

extracto 100%MetOH como matriz. O extracto 100% EtOH apresenta a actividade antioxidante perante o radical peroxilo mais elevada para esta etapa. Na Fracção 2 conseguiram-se obter extractos que apresentam aproximadamente a mesma actividade antioxidante perante o radical peroxilo. Por sua vez, a Fracção 3 revelou-se a mais promissora para a obtenção de extractos com actividade antioxidante perante o radical peroxilo, sendo este valor aproximadamente igual para os extractos de 100%EtOH e 100%MetOH.

2.3.2. Avaliação da capacidade de resgate do radical livre HO•**2.3.2.1. Método de HORAC**

A avaliação da actividade antioxidante dos extractos de cereja obtidos ao longo deste projecto (extractos convencionais e extractos supercríticos) foi estudada recorrendo ao método de HORAC de acordo com o descrito no *Capítulo 2*, os resultados obtidos encontram-se apresentados de seguida e no Anexo 18.

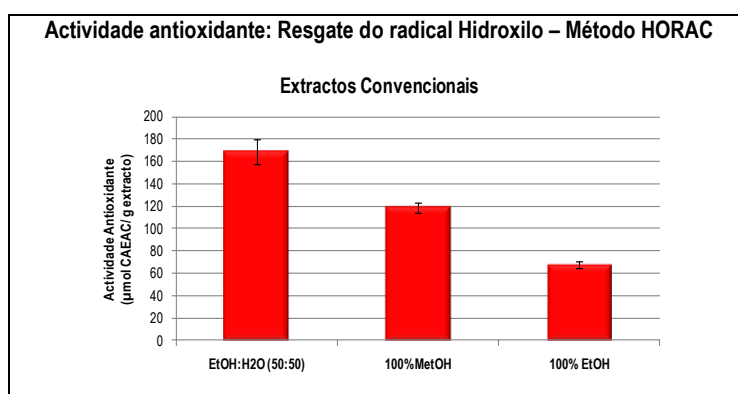


Figura 3.26 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante (µmol de CAEAC/ g de extracto) para extracção da cereja com solventes convencionais: etanol:água na proporção 50:50 (v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100% EtOH e 100%MetOH), nomeadamente a capacidade de resgate do radical peroxilo determinada pelo método de HORAC.

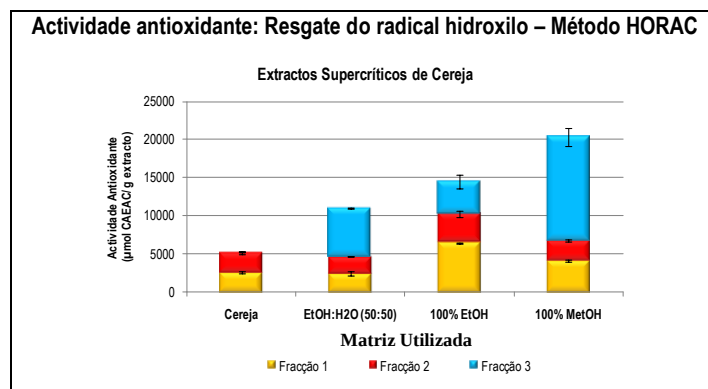


Figura 3.27 - Estudo comparativo da Capacidade Antioxidante (µmol de CAEAC/ µL de cereja, à esquerda e µmol de CAEAC/ µL de extracto, à direita) dos extractos supercríticos de cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente), nomeadamente a capacidade de resgate do radical peroxilo determinada pelo método de HORAC.

Apresentação e Discussão de Resultados

Quando se procede à extracção da cereja com EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH verifica-se que o solvente que permite a obtenção de um extracto com capacidade antioxidante mais elevada perante o radical hidroxilo é o 100%EtOH.

A capacidade de inibição da produção do radical hidroxilo dos extractos obtidos para a Fracção 1 da extracção supercrítica utilizando como matriz a cereja e o extracto EtOH:H₂O (50:50) é aproximadamente igual, sendo este valor superior para o extracto 100%MetOH.

Os extractos obtidos na Fracção 2 quando se utilizam como matriz os extractos EtOH:H₂O (50:50) e 100%MetOH obtidos estes apresentam aproximadamente a mesma capacidade de inibição da produção do radical hidroxilo. O extracto de 100%EtOH obtido para Fracção 2 apresenta a actividade antioxidante mais elevada para esta fracção.

Os extractos de EtOH:H₂O (50:50) e 100%EtOH obtidos na Fracção 3 apresentam aproximadamente a mesma actividade antioxidante em relação ao radical hidroxilo e o extracto 100%MetOH obtido na Fracção 3, é o extracto que possui a capacidade em relação ao radical hidroxilo mais elevada, para esta etapa do processo global de extracção. Verifica-se que tempos de extracção mais longos, Fracção 3, permitem obter extractos com actividade antioxidante perante o radical hidroxilo superior.

2.4. Identificação do Álcool Perilílico por Cromatografia em Camada Fina (TLC)

De seguida apresenta-se o esquema do TLC dos extractos supercríticos, segundo passo do processo global de extracção, onde foi possível identificar a presença do álcool perilílico. Os esquemas dos TLC para os outros extractos em estudo encontram-se no Anexo 18.

Apresentação e Discussão de Resultados

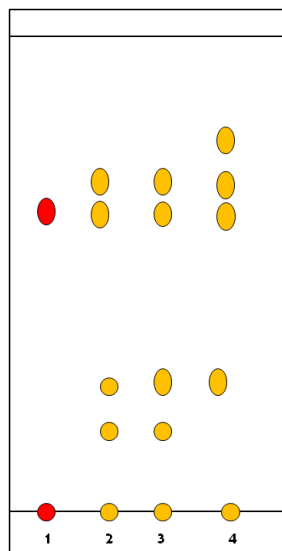


Figura 3.28 - Esquema do TLC para os extractos supercríticos do extracto de cereja 100%MetOH onde: 1 – álcool perillílico (padrão), 2 – Fracção 1: extracto obtido utilizando sc-CO₂, 3 – Fracção 2: extracto obtido utilizando CO₂+10%EtOH durante 1h30 e 4 – Fracção 3: extracto obtido utilizando CO₂+10%EtOH após extracção durante mais 1h.

Tal como se pode verificar pelo esquema apresentado na figura anterior (Figura 3.28) os extractos obtidos quando se utiliza a extracção supercrítica como um segundo passo conseguimos obter extractos concentrados no álcool perillílico. É possível identificar a presença deste monoterpene quando se utiliza como matriz o extracto de cereja 100%MetOH.

Em resumo, ao recorrermos a um primeiro passo de extracção da cereja com solventes convencionais obtemos um extracto rico em polifenóis, o extracto que apresenta conteúdo superior em polifenóis é o extracto EtOH:H₂O (50:50).

O processo global de extracção (processo combinado) permite obter extractos ricos em polifenóis, sendo que o conteúdo em polifenóis aumenta com o tempo de extracção e com a presença de um co-solvente, o etanol. Os extractos supercríticos obtidos na Etapa 2 e 3 apresentam um pico aos 75min com intensidade maior mas com uma concentração inferior de outros polifenóis, ou seja esta tecnologia permite-nos obter uma selectividade maior para este composto e como consequência um extracto mais concentrado, os resultados obtidos indicam que o composto é um glucosido da sakuranetina, a sakuranina. Existe uma relação entre a concentração em polifenóis e a actividade antioxidante, ou seja, quanto maior a concentração em polifenóis maior a actividade antioxidante do extracto. É possível observar este comportamento para os extractos obtidos durante o processo global de extracção. Verifica-se também que a capacidade antioxidante, perante o radical peroxilo e hidroxilo, aumenta com o aumento

Apresentação e Discussão de Resultados

do tempo de extracção e com a adição de etanol, co-solvente, que altera a polaridade do CO₂. Os extractos supercríticos obtidos utilizando como matriz o extracto 100%EtOH e extracto 100%MetOH revelaram-se mais promissores por possuírem uma concentração superior em polifenóis e actividade antioxidante mais elevada, a fracção mais promissora é a Fracção 3 pois permite a obtenção de extracto com polifenóis com bioactividade comprovada como a sakuranina. Esta fracção é também a mais promissora para a obtenção de um extracto onde é possível identificar o álcool perilílico.

Bibliografia

- Camy, S., & Condoret, J.-S. (2006). Modelling and experimental study of separators for co-solvent recovery in a supercritical extraction process. *J. of Supercritical Fluids* , 38, 51–61.
- Cañabate-Díaz, B., Carretero, A. S., Fernández-Gutiérrez, A., Vega, A. B., Frenich, A. G., Vidal, J. L., et al. (2007). Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chemistry* , 102, 593-598.
- Chapman, J. M., Knoy, C. K., Brown, R. C., & Niemann, S. (2006). *Identification of Antineoplastic and Neurotrophic Lignans in Medicinal Prairie Plants by Liquid Chromatography Electron Impact Mass Spectrometry (LC/EI/MS)*. Obtido em 20 de Setembro de 2009, de <http://www.cssco.com/files/KC%20Life%20Science%202006.pdf>
- Flintoff-Dyea, N. L., & Omaye, S. T. (2005). Antioxidant effects of conjugated linoleic acid isomers in isolated human low-density lipoproteins. *Nutrition Research* , 25, 1–12.
- Gonçalves, B., Pereira, J. M., Santos, A., Bacelar, E., correia, C., Carvalheiro, J., et al. (2007). Qualidade da cereja e seus reflexos na saúde humana. *Revista da APH* , 90, 14-19.
- Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* , 46, 244–282.
- Milosevic, J., Ashton, D. S., & Cocksedge, M. J. (2002). Lipids present in olive skin. *International Journal of Food Science and Technology* , 37, 523-526.
- Mozetic, B., Trebse, P., & Hribar, J. (2002). Determination and quantification of anthocyanins and hydroxycinnamic acids in different cultivars of sweet cherries (*Prunus avium* L.) from Nova Gorica Region (Slovenia). *Food Technol. Biotechnol.* , 40 (3), 207-212.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E. K., Prior, R. L., & Huang, D. (2002). Novel Fluorometric Assay for Hydroxyl Radical Prevention Capacity Using Fluorescein as the Probe. *J. Agric. Food Chem.* , 50, 2772-2777.
- Ou, Boxin; et al. (2002). Novel Fluorometric Assay for Hydroxyl Radical Prevention Capacity Using Fluorescein as the Probe. *J. Agric. Food Chem.* , 50, 2772-2777.
- Owen, R. W., Mier, W., Giavosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000). Phenolic compounds and squaleno in olive oils: the concentration and

Apresentação e Discussão de Resultados

antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology* , 38, 647-659.

Paiva-Martins, F., & Gordon, M. H. (2005). Interactions of Ferric Ions with Olive Oil Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* , 53, 2704-2709.

Pardo, J. E., Cuesta, M., & Alvarruiz, A. (2007). Evaluation of potential and real quality of virgin olive oil from the designation of origin "aceite Campo de Montiel" (Ciudad Real, Spain). *Food Chemistry* , 100, 977-984.

Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., et al. (2003). Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *Journal of Nutrition* , 2812-2819.

Perretti, G., Montanari, L., & Fantozzi, P. (2006). Lipid Extraction from Olea Europea L. by Supercritical Carbon Dioxide for Analytical Use. *International Journal of Food Engineering* , Volume 2, Issue 2.

Petti, S., & Scully, C. (2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. *journal of dentistry* , 37 , 413 - 423.

Psomiadou, E., & Tsimidou, M. (1999). On the Role of Squalene in Olive Oil Stability. *J. Agric. Food Chem.* , 47, 4025-4032.

Ranalli, A., Pollastri, L., Contento, S., Di Loreto, G., Iannucci, E., Lucera, L., et al. (2002). Acylglycerol and Fatty Acid Components of Pulp, Seed, and Whole Olive Fruit Oils. Their Use to Characterize Fruit Variety by Chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* , 50, 3775-3779.

Ryan, M., McInerney, D., Owens, O., Collins, P., Johnson, A., & Tomkin, G. (2000). Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoreactivity. *Q J Med* , 93, 85-91.

Saito, T., Abe, D., & Sekiya, K. (2008). Sakuranetin induces adipogenesis of 3T3-L1 cells through enhanced expression of PPAR γ 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 372, 835-839.

Santos-Zago, L. F., Botelho, A. P., & Oliveira, A. C. (2008). Os efeitos do ácido linoléico conjugado no metabolismo animal: avanço das pesquisas e perspectivas para o futuro. *Revista de Nutrição* , 21(2), 195-221.

Shi, J. Y., Pohorly, J., Y., C., J., Bryan, M., & Wu, Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Food, Agriculture & Environment* , 1 (2), 42-47.

Apresentação e Discussão de Resultados

Singh, I., Mok, M., Christensen, A., Turner, A. H., & Hawley, J. A. (2008). The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* , 18, 127 - 132.

Wagner, K., & Elmadfa, I. (2000). Effects of tocopherols and their mixtures on the oxidative stability of olive oil and linseed oil under heating. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* , 102, 624–629.

Wang, L.; Weller, C. L.; Schlegel, V. L.; Carr, T. P.; Cuppett, S. L. (2007). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* , 109, 567-574.

Waterman, E., & Lockwood, B. (2007). Active Components and Clinical Applications of Olive Oil. *Alternative Medicine Review* , 12, Number 4, 331-342.

win, D. T. (2005). Oleic Acid - The anti-breast cancer component in olive oil. *AU J. T.* , 2, 75-78.

Capítulo 4 - Caso de Estudo

Ensaio de Bioactividade dos Extractos Supercríticos de Cereja

1. Ensaio *in vitro* em Linhas Celulares Humanas

Neste capítulo apresenta-se um estudo *in vitro* efectuado no laboratório de acolhimento recorrendo à utilização de linhas celulares humanas, com o qual se pretendeu verificar se os extractos supercríticos derivados da cereja produzidos no âmbito do presente trabalho possuem actividade anti-proliferativa perante linhas celulares cancerígenas. Avaliou-se o efeito anti-proliferativo e a toxicidade, no primeiro pretende-se verificar se a adição dos extractos atrasa ou inibe a divisão de células cancerígenas, no segundo verificar se os extractos possuem efeito citotóxico a nível celular. De seguida segue-se uma descrição mais detalhada do estudo efectuado.

1.1. Avaliação do efeito Antiproliferativo

O objectivo dos testes antiproliferativos consiste em verificar se a adição dos extractos supercríticos de cereja e extracto de cereja atrasa ou inibe a proliferação de células cancerígenas. A linha celular utilizada foi HT29 – células humanas de adenocarcinoma do cólon-recto.

Neste tipo de ensaio as células são inoculadas com diferentes concentrações de extracto de cereja durante 24 horas a 37°C e 5%CO₂. A viabilidade celular é posteriormente quantificada utilizando o método do MTT e expressa em termos de percentagem relativamente ao controlo (células não tratadas com extracto). O método baseia-se na redução do MTT por uma enzima produzida na mitocôndria de células metabolicamente activas (dehidrogenase), formando-se cristais de formazan de cor púrpura.

Células HT29 são inoculadas em placas de 96 poços. 24 horas depois, início da fase de crescimento, o meio é removido e as células são incubadas com o mesmo volume das várias soluções de extracto supercrítico de cereja. Após 96 horas o meio é substituído por meio fresco com o reagente MTT (0,5 g/L) e as células deixadas a incubar por mais 4 horas. O meio é removido e os cristais de produto formados são dissolvidos em DMSO (150µL/poço). O produto é quantificado através da medição da absorvância a 570nm num espectrofotómetro. Quanto maior a absorvância maior o número de células capazes de catalisar a reacção e, como tal, maior o número de células viáveis. Assim, o ensaio consiste na obtenção de curvas dose-resposta para os vários extractos supercríticos de cereja (viabilidade celular em função da concentração de extracto) de

Caso de Estudo

forma a determinar a concentração a partir da qual se considera efectiva, ou seja, que conduza a uma redução de 50% da viabilidade celular – IC50 (índice de citotoxicidade).

1.2. Avaliação da citotoxicidade

A linha celular Caco2 (células humanas do cancro do cólon) foi o modelo celular utilizado para a avaliação do efeito citotóxico dos vários extractos supercríticos de cereja. Estas células quando no estado confluyente mimetizam o epitélio intestinal.

O principal objectivo deste teste consiste na obtenção de curvas dose-resposta para os vários extractos supercríticos de cereja de forma a determinar a concentração a partir da qual se considera tóxica, ou seja, que conduza a uma redução de 50% da viabilidade celular – IC50 (índice de citotoxicidade).

O ensaio consiste na adição de diferentes concentrações de extracto supercrítico de cereja ao meio celular seguida de incubação a 37°C e 5%CO₂. Após 4 horas de incubação, o meio é removido e a viabilidade celular é determinada utilizando o método colorimétrico de MTT, já descrito anteriormente.

2. Resultados e conclusões

Para todos os extractos foi determinado o valor de IC50, estes encontram-se na tabela seguinte:

Tabela 4.1– Avaliação da actividade antiproliferativa - HT29: valores de IC50 em mg extracto/ml dos diferentes extractos supercríticos de cereja testados.

	IC50 mg /mL	
	Fracção 1	Fracção 2
Cereja	0,45	0,28
	0,28	-
	-	-
EtOH:H ₂ O (50:50)	nd	0,19
	0,19	0,9
	0,9	-
100% EtOH	0,42	0,38
	0,38	nd
	nd	-
100% MetOH	0,26	0,16
	0,16	nd
	nd	-

Tal como se pode verificar pelos valores apresentados na tabela anterior o extracto que apresenta uma concentração de extracto inferior para a redução de 50% da viabilidade das células HT29 é o extracto correspondente à fracção 2 da extracção supercrítica

quando se utiliza como matriz o extracto 100% MetOH. É importante verificar se para esta concentração o extracto não possui efeito citotóxico para as células Caco2. Utilizou-se linha celular Caco2 como modelo celular para a avaliação do efeito citotóxico da incubação do extracto.

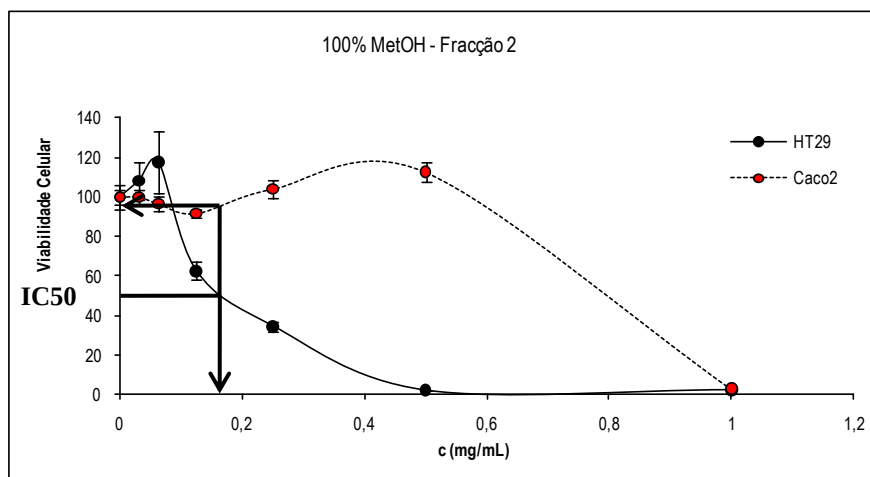


Figura 4.1 – Efeito da incubação do extracto obtido na fracção 2 da extracção supercrítica quando se utiliza como matriz o extracto 100% MetOH na proliferação das células cancerígenas HT29 e efeito citotóxico do mesmo extracto nas células humanas do cancro do cólon Caco2.

Tal como se pode verificar pela figura anterior o extracto obtido na fracção 2 da extracção supercrítica quando se utiliza como matriz o extracto 100% MetOH não apresenta toxicidade nas células Caco2 para a concentração correspondente ao IC50 (100% viabilidade celular).

Estes resultados provam que a utilização de um primeiro passo de extracção, extracção sólido-líquido convencional, permite a obtenção de extractos supercríticos com propriedades anti-proliferativas em linhas de células cancerígenas humanas.

Capítulo 5 - Conclusões

No presente trabalho obtiveram-se extractos naturais recorrendo à tecnologia supercrítica que possuem características e actividades biofuncionais que os permitem incluir como potenciais componentes na formulação de nutracêuticos. Os objectivos do trabalho foram conseguidos, na primeira etapa do estudo os extractos de caroço e de bagaço de azeitona obtidos apresentam propriedades antioxidantes. A tecnologia supercrítica permitiu a obtenção de rendimentos de extracção para compostos específicos iguais aos obtidos quando se recorre ao hexano, solvente orgânico prejudicial à saúde e ao ambiente, sendo por isso vantajosa a substituição deste pelo sc-CO_2 .

Na segunda etapa do estudo provou-se que a utilização de um primeiro passo de extracção, extracção sólido-líquido convencional, permite a obtenção de extractos supercríticos onde é possível identificar o álcool perillílico, composto que é possivelmente responsável pelas propriedades anti-proliferativas em linhas de células cancerígenas humanas apresentadas pelos extractos que o possuem. A utilização desta estratégia de extracção permitiu ainda identificar a presença do polifenol, a sakuranina, composto que confere valor aos extractos preparados, pois tem sido atribuído à sakuranina actividade antihiperlipidémica e extractos que possuem este composto têm sido utilizados para o tratamento da diabetes (Chapman, Knoy, Brown, & Niemann, 2006).

• *Subprodutos de Azeitona*

A matriz que demonstrou ser a mais indicada para a obtenção de um extracto rico em ácidos gordos com bioactividade comprovada foi o caroço de azeitona, o processo de extracção supercrítica permitiu obter extractos lipídicos concentrados em ácido oleico. Este processo permitiu ao mesmo tempo enriquecer o extracto em esqualeno, numa concentração superior (10mg/g) à reportada para os azeites (azeite extra virgem 4,24mg/g e azeite refinado 3,24mg/g (Owen, Mier, Giavosa, Hull, Spiegelhalder, & Bartsch, 2000)). O esqualeno contribui para a protecção da oxidação de substratos lipídicos e o grau de protecção é dependente da concentração deste, ou seja o efeito protector deste aumenta com o aumento da concentração de esqualeno incorporada. No entanto este comportamento não foi observado quando os extractos supercríticos de caroço e bagaço de azeitona foram incorporados no óleo de girassol provavelmente devido à presença de γ - e δ - tocoferol. Apesar dos extractos possuírem na sua constituição compostos que isoladamente possuem efeito anti-oxidante, apresentam

efeito pró-oxidativo não sendo indicados para a utilização como aditivos na indústria de óleos alimentares. Como tal estes extractos poderão ser utilizados na indústria cosmética, devido à sua composição rica em esqualeno os extractos lipídicos de caroço de azeitona são os que possuem maior potencial para serem incluídos por exemplo em cremes ou sabonetes.

Sugere-se que se dê continuidade à caracterização dos extractos obtidos com o intuito de explorar as potencialidades destes. Um estudo interessante será a avaliação da actividade antioxidante dos extractos *in vitro* com linhas celulares humanas, estes ensaios permitem, por exemplo, compreender de que forma os extractos bioactivos actuam na protecção das células das ROS.

- **Refugo de cereja**

A cereja é um fruto produzido em larga escala em Portugal e reconhecido por possuir uma composição rica em compostos biofuncionais que se encontram reportados como benéficos para a saúde humana. A recuperação destes compostos a partir de resíduos apresenta inúmeras vantagens pois uma forma de valorização de um subproduto, rico em compostos biofuncionais mas também pode ser uma forma de resolver problemas ambientais, pois grandes quantidades de resíduos representam problemas de armazenamento, transformação ou eliminação e acarretam custos elevados.

Os resultados obtidos com este trabalho são encorajadores pois mostram que a utilização da extracção supercrítica como um segundo passo permite extrair compostos biofuncionais da cereja nomeadamente, polifenóis como a sakuranina e o monoterpene álcool perilílico, compostos que de outra forma não eram detectados nos extractos por se encontrarem muito diluídos.

Este processo favorece a extracção selectiva dos compostos alvo por ajuste das condições de extracção utilizadas. Na primeira etapa extracção sólido-líquido, na segunda etapa, extracção supercrítica é possível ajustar as condições de pressão, temperatura, caudal, tipo e percentagem de co-solvente.

Os extractos obtidos possuem actividade antioxidante elevada e efeito anti-proliferativo em linhas celulares cancerígenas humanas. Devido à bioactividade associada, estes extractos naturais de cereja podem ser considerados como uma fonte promissora para a formulação de nutracêuticos ou até mesmo a sua utilização na formulação de medicamentos utilizados no tratamento do cancro.

Bibliografia

- Chapman, J. M., Knoy, C. K., Brown, R. C., & Niemann, S. (2006). *Identification of Antineoplastic and Neurotrophic Lignans in Medicinal Prairie Plants by Liquid Chromatography Electron Impact Mass Spectrometry (LC/EI/MS)*. Retrieved Setembro 20, 2009, from <http://www.cssco.com/files/KC%20Life%20Science%202006.pdf>
- Owen, R. W., Mier, W., Giavosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000). Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology* , 38, 647-659.

Anexos

Anexo 1 - Espectros de HPLC-DAD a 253nm dos Extractos convencionais de Carço e Bagaço de Azeitona

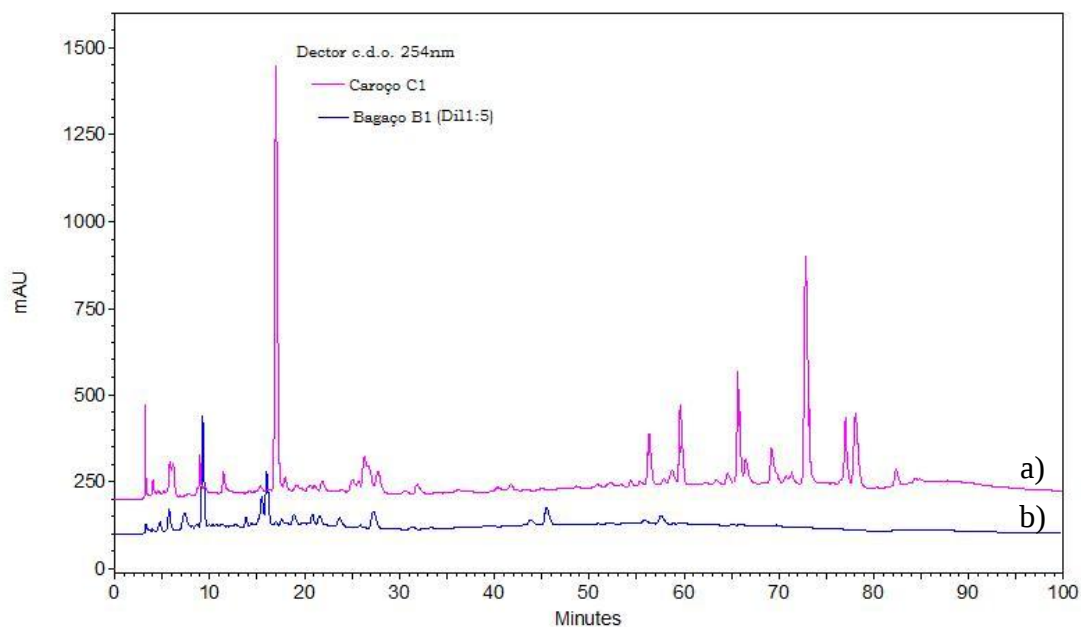


Figura A.1- Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto aquoso de carço (Carço C1 – a) e extracto aquoso de bagaço de azeitona (Bagaço B1 (Dil1:5) – b)).

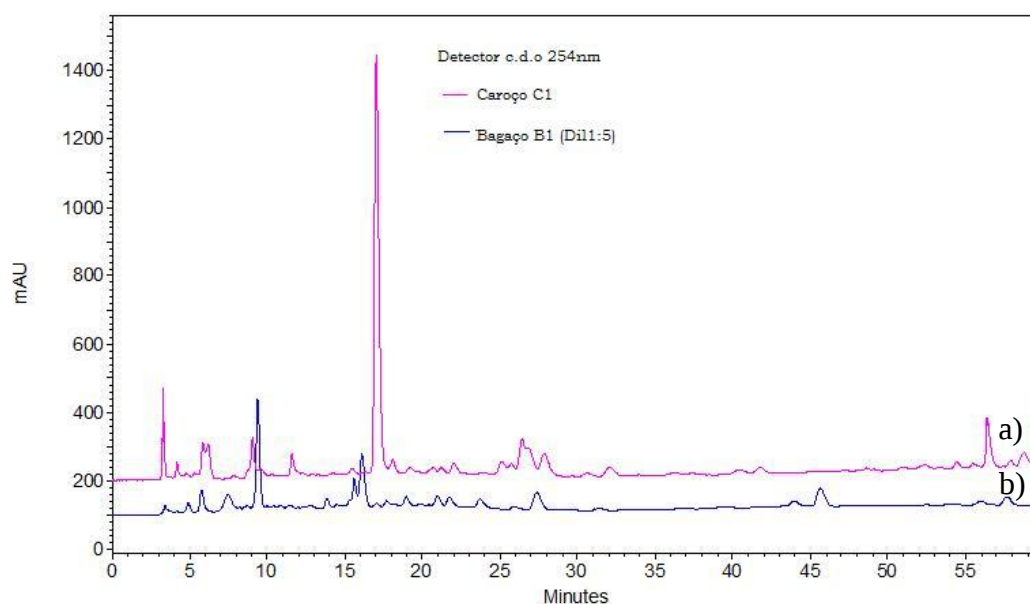


Figura A.2- Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto aquoso de carço (Carço C1 – a) e extracto aquoso de bagaço de azeitona (Bagaço B1 (Dil1:5) – b)) – Ampliação 1.

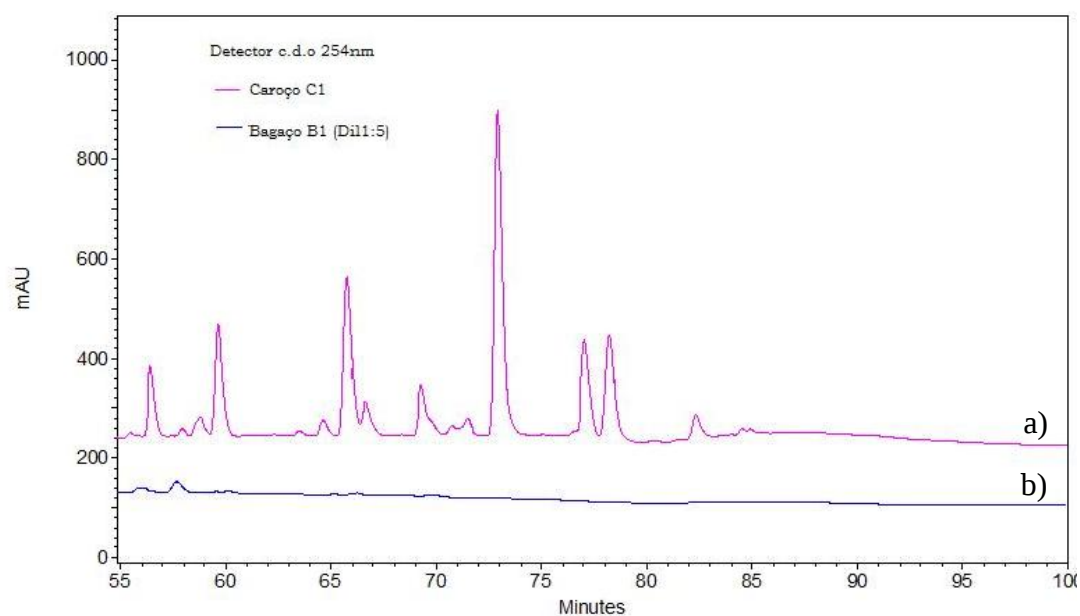


Figura A.3- Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto aquoso de caroço (Carvão C1 – a)) e extracto aquoso de bagaço de azeitona (Bagaço B1 (Dil1:5) – b)) – Ampliação 2.

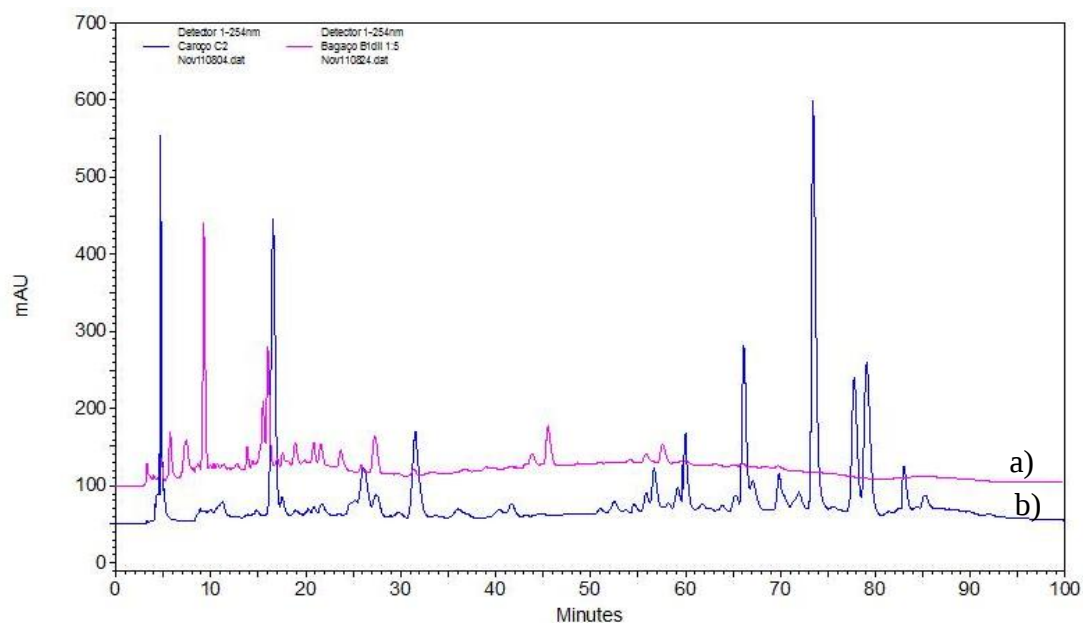


Figura A.4 - Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto com etanólico de caroço (Carvão C2 – b)) e extracto etanólico de bagaço de azeitona (Bagaço B1 (Dil1:5) – a)).

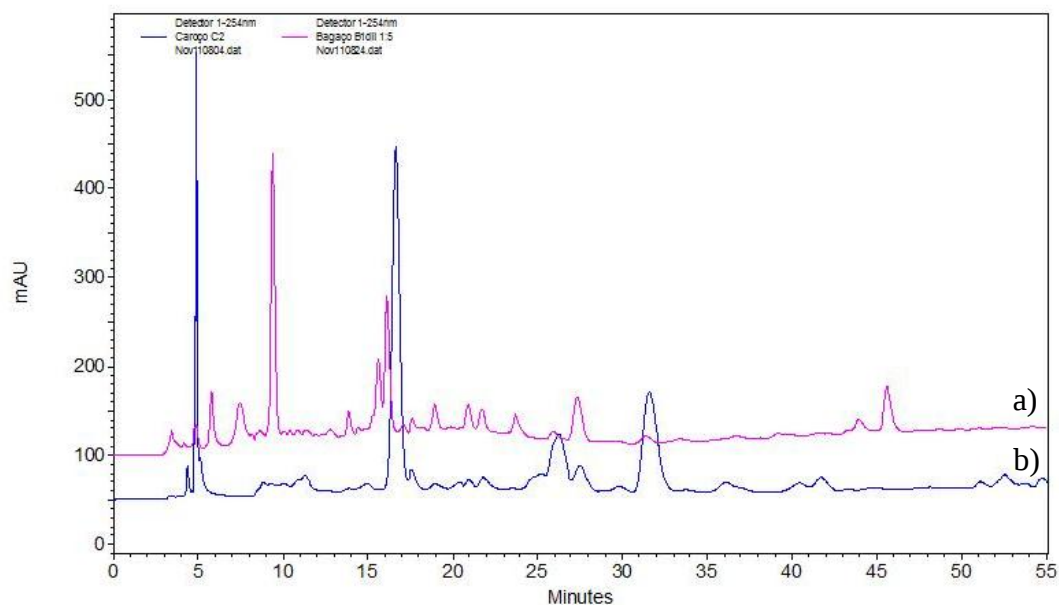


Figura A.5 – Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto com etanólico de caroço (Caroço C2 – b)) e extracto etanólico etanol de bagaço de azeitona (Bagaço B1 (Dil1:5) – a)) – Ampliação 1.

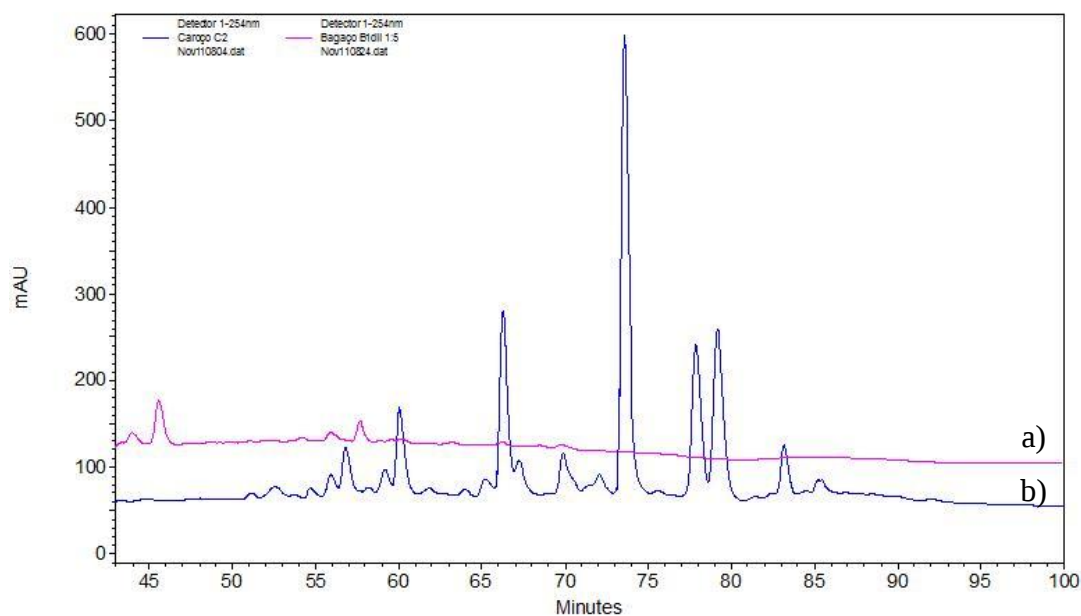


Figura A.6 - Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto com etanólico de caroço (Caroço C2 – b)) e extracto etanólico etanol de bagaço de azeitona (Bagaço B1 (Dil1:5) – a)) - Ampliação 2.

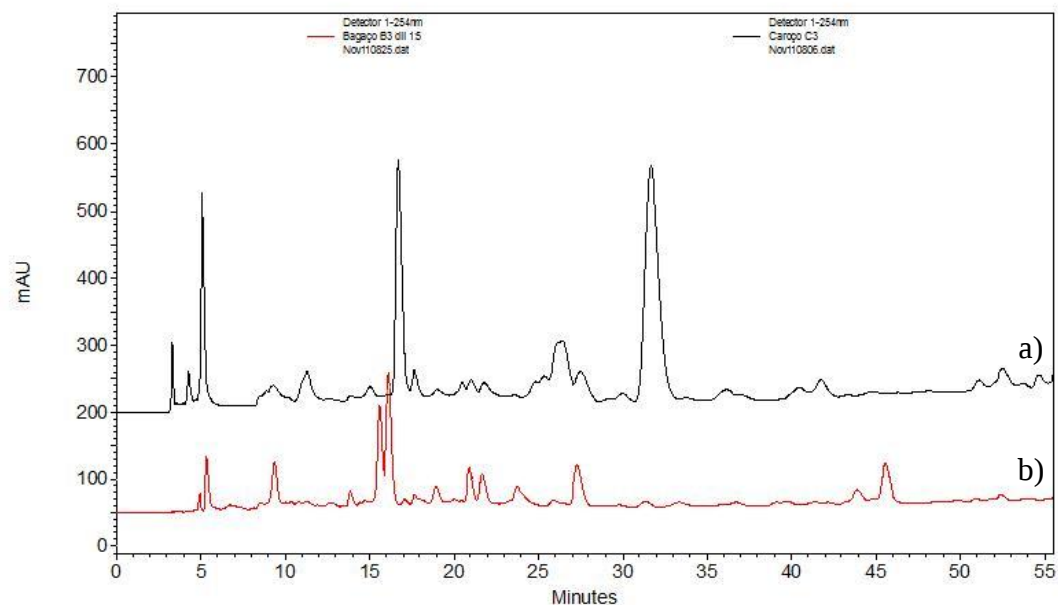


Figura A.7 - Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto EtOH:H₂O 80:20(v/v) de caroço (Carroço C3 – a)) e extracto EtOH:H₂O 80:20(v/v) de bagaço de azeitona (Bagaço B1 (Dil1:5) – b)) – Ampliação 1.

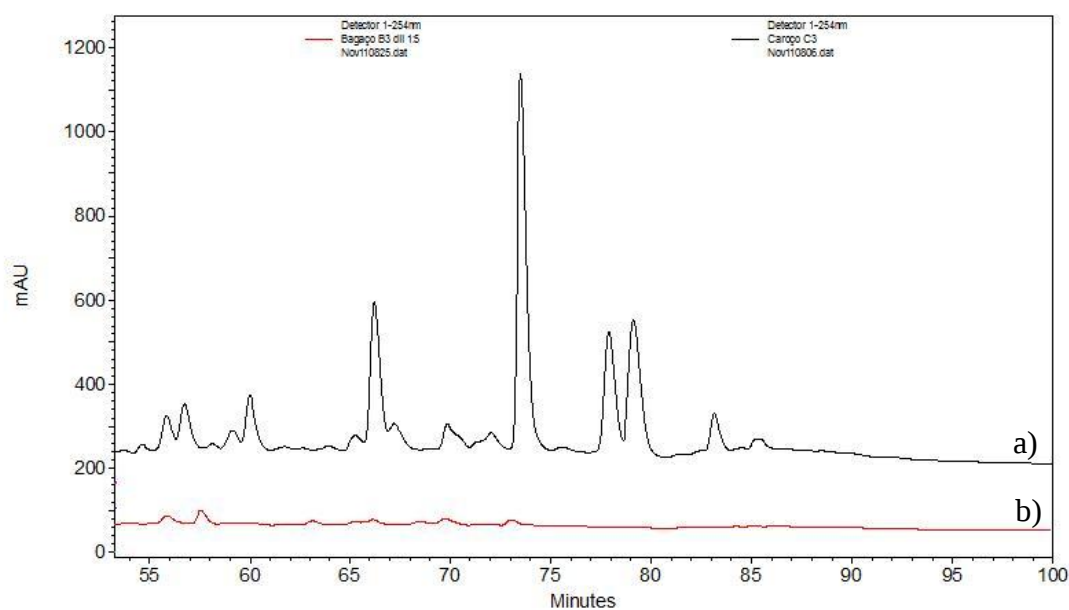


Figura A.8 - Comparação do perfil cromatográfico determinado por HPLC-DAD a 254nm do extracto EtOH:H₂O 80:20(v/v) de caroço (Carroço C3 – a)) e extracto EtOH:H₂O 80:20(v/v) de bagaço de azeitona (Bagaço B1 (Dil1:5) – b)) – Ampliação 2.

Anexo 2 - Protocolo para Preparação do Phosphate Buffer Saline

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

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

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

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

¹ Quando este se encontrar na forma hidratada

Anexo 3 - *Rendimento de extracção do caroço de azeitona em soxhlet com hexano*

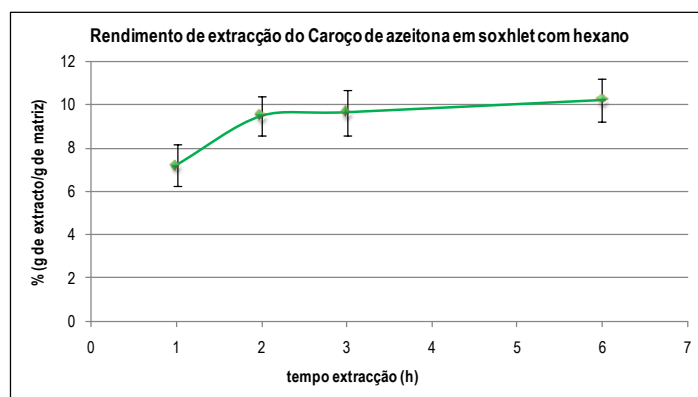


Figura A.9 – Rendimento em gramas de extracto por grama de caroço de azeitona (matriz) obtidos para diferentes tempos de extracção em soxhlet com hexano.

Anexo 4 - Cinéticas da Reacção de Inibição da Auto-oxidação Lipídica Induzida (LDL)

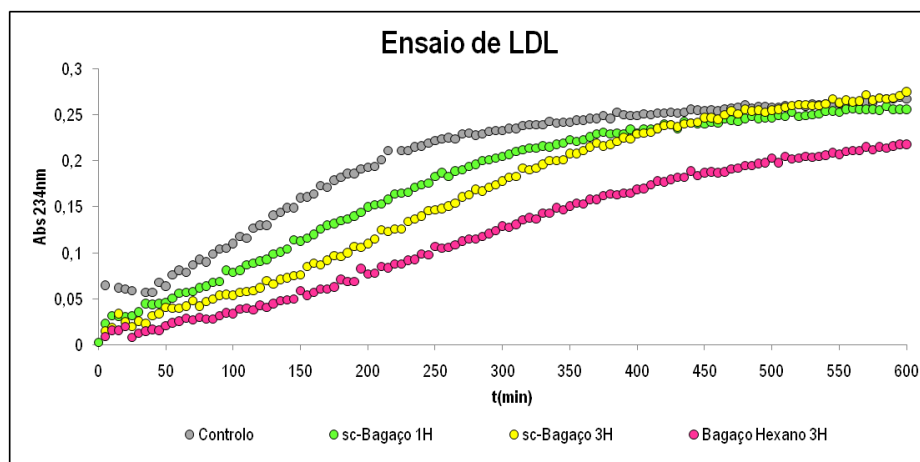


Figura A.10 - Perfil da cinética de oxidação da LDL: na presença de AAPH (controlo) e do extracto de bagaço de azeitona obtido em soxhlet com hexano ao fim de 3 horas (Bagaço hexano 3H) e extractos de bagaço de azeitona obtidos utilizando $sc\text{-CO}_2$ por 1 e 3 horas (Ext. Bagaço Supercrítico 1H e Ext. Supercrítico 3H, respectivamente).

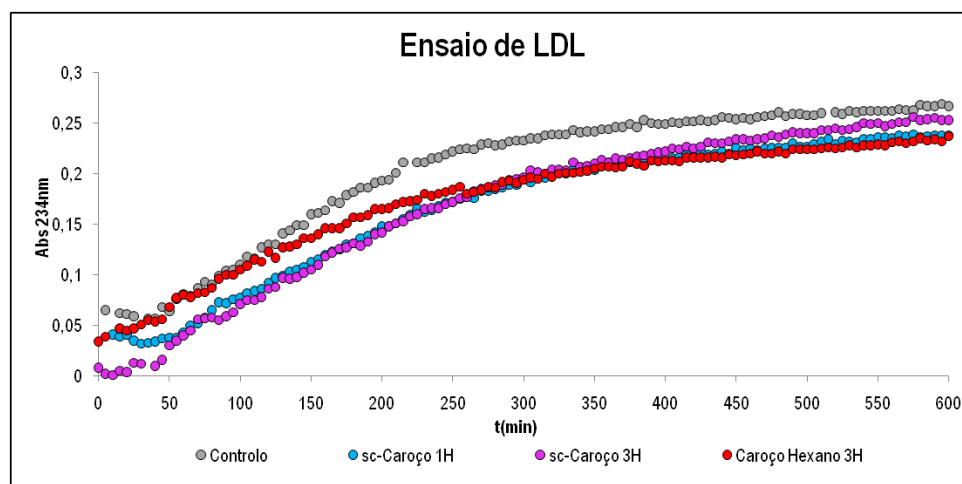
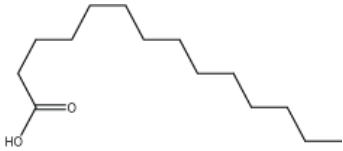
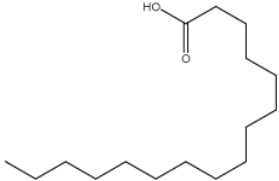
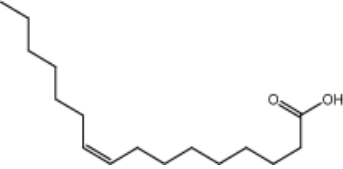
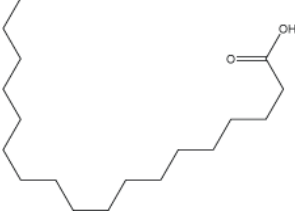
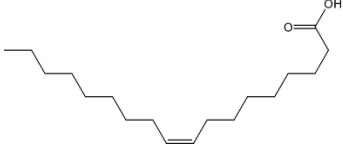


Figura A. 11 - Perfil da cinética de oxidação da LDL: na presença de AAPH (controlo) e do extracto de caroço de azeitona obtido em soxhlet com hexano ao fim de 3 horas (Caroço hexano 3H) e extractos de caroço de azeitona obtidos utilizando $sc\text{-CO}_2$ por 1 e 3 horas (Ext. Supercrítico Caroço 1H, Ext. Supercrítico Caroço 3H, respectivamente).

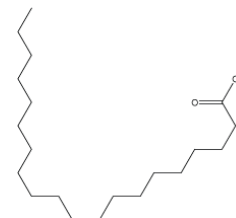
Anexo 5 - Identificação dos Ácidos Gordos Presentes nos extractos de Carço e Bagaço de Azeitona

	Nome Comum	Fórmula Química	Peso Molecular	Fórmula de Estrutura
C14:0	Ácido Mistirico	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228g/mol	
C16:0	Ácido Palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256g/mol	
C16:1	Ácido Palmitoleico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254g/mol	
C17:0	Ácido Heptadecanóico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270g/mol	
C18:0	Ácido Esterárico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284g/mol	
C18:1	Ácido Oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282g/mol	
C18:2	Ácido Linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280g/mol	

C18:3 Ácido
Linolénico $C_{18}H_{30}O_2$ 278.43g/mol



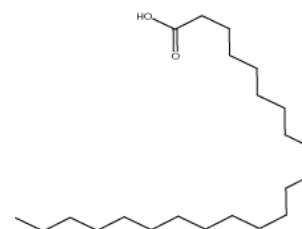
C20:0 Ácido
Eicosanoico $C_{20}H_{40}O_2$ 312g/mol



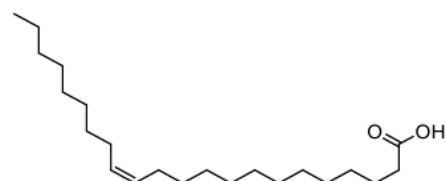
C20:1 Ácido
Eicosenoico $C_{20}H_{38}O_2$ 310g/mol



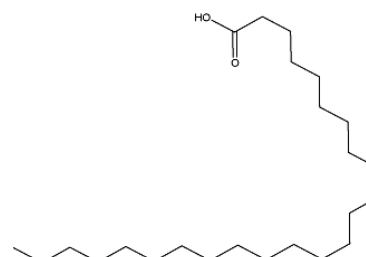
C22:0 Ácido Beénico $C_{22}H_{44}O_2$ 341g/mol



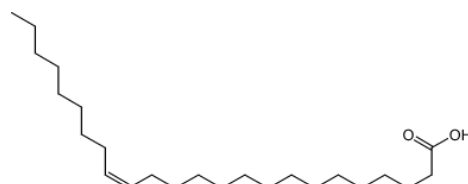
C22:1 Ácido Erúcico $C_{22}H_{42}O_2$ 339g/mol



C24:0 Ácido
Tetracosanoico $C_{24}H_{48}O_2$ 369g/mol



C24:1 Ácido
Nervónico $C_{24}H_{46}O_2$ 367g/mol



Anexo 6 - Espectros de GC Obtidos Para a Determinação dos Ácidos Gordos presentes nos Extractos Lipídicos de Caroço e Bagaço de Azeitona¹

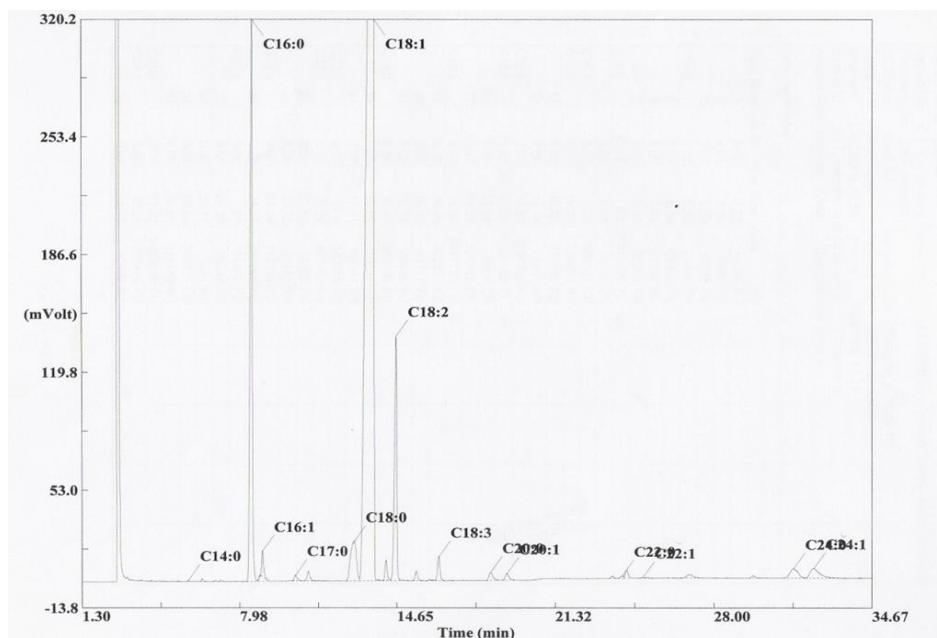


Figura A.12 - Espectro de GC obtido para o extracto de sc-Carvalho 1H: RT=5.79 – C14:0; RT=8.5 – C16:0; RT=8.95 – C16:1; RT=10.33 – C17:0; RT=12.83 – C18:0; RT=13.66 – C18:1; RT=14.62 – C18:2; RT=16.42 – C18:3; RT=18.6 – C20:0; RT=19.29 – C20:1; RT=24.14 – C22:0; RT=25 – C22:1; RT=31.35 – C24:0; RT=32.21 – C24:1.

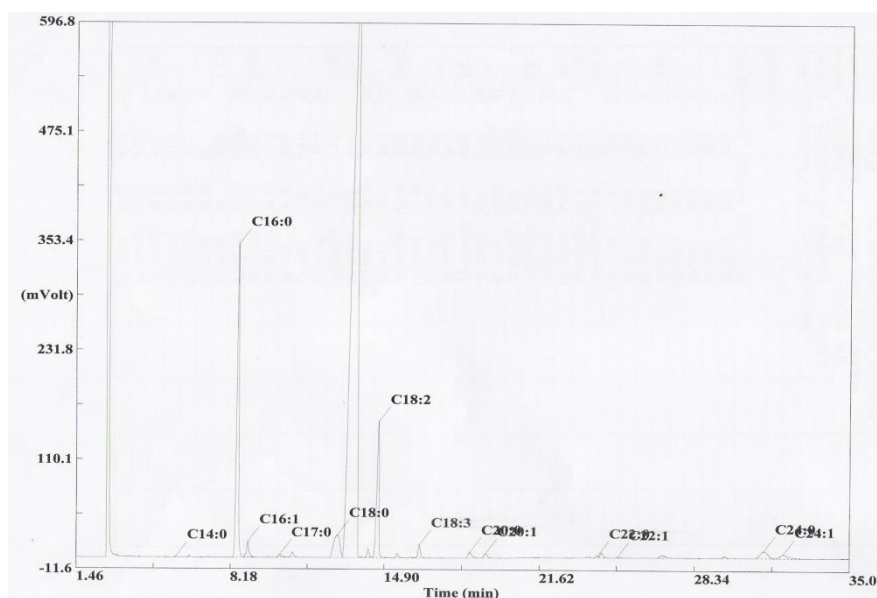


Figura A.13 - Espectro de GC obtido para o extracto de sc-Carvalho 3H: RT=5.79 – C14:0; RT=8.52 – C16:0; RT=8.95 – C16:1; RT=10.34 – C17:0; RT=12.87 – C18:0; RT=13.7 – C18:1; RT=14.64 – C18:2; RT=16.43 – C18:3; RT=18.62 – C20:0; RT=19.3 – C20:1; RT=24.16 – C22:0; RT=25 – C22:1; RT=31.34 – C24:0; RT=32.18 – C24:1.

¹ Todos os extractos foram analisados por GC em triplicado, os cromatogramas apresentados são apenas de uma das réplicas.

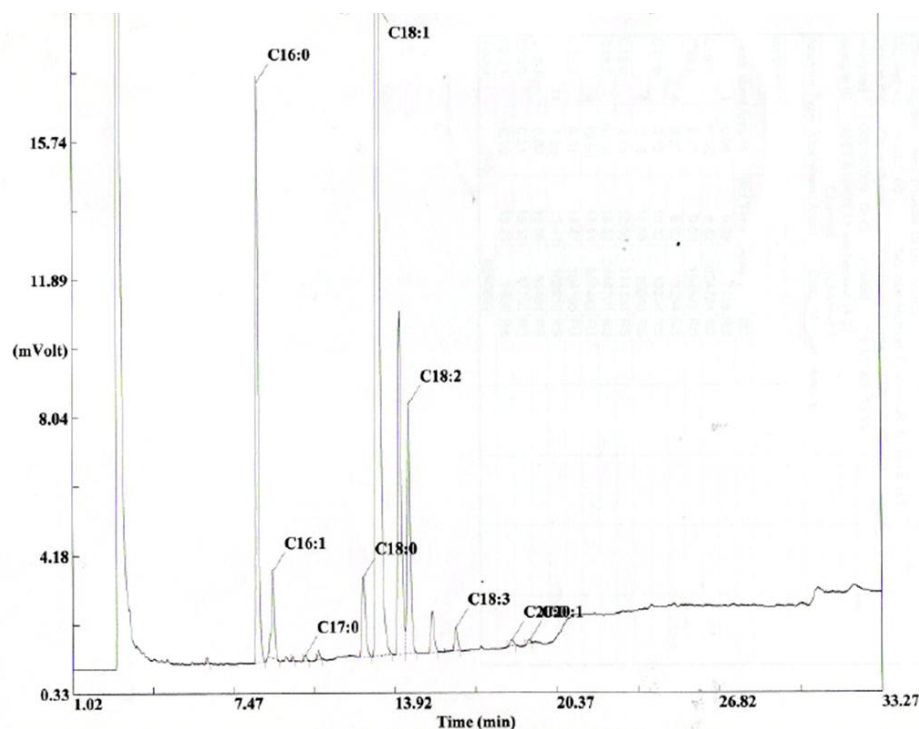


Figura A.14 - Espectro de GC obtido para o extracto de Carço hexano 1H: RT=8.42 – C16:0; RT=9.03 – C16:1; RT=10.32 – C17:0; RT=12.65 – C18:0; RT=13.25 – C18:1; RT=14.47 – C18:2; RT=16.36 – C18:3; RT=18.58 – C20:0; RT=19.29 – C20:1.

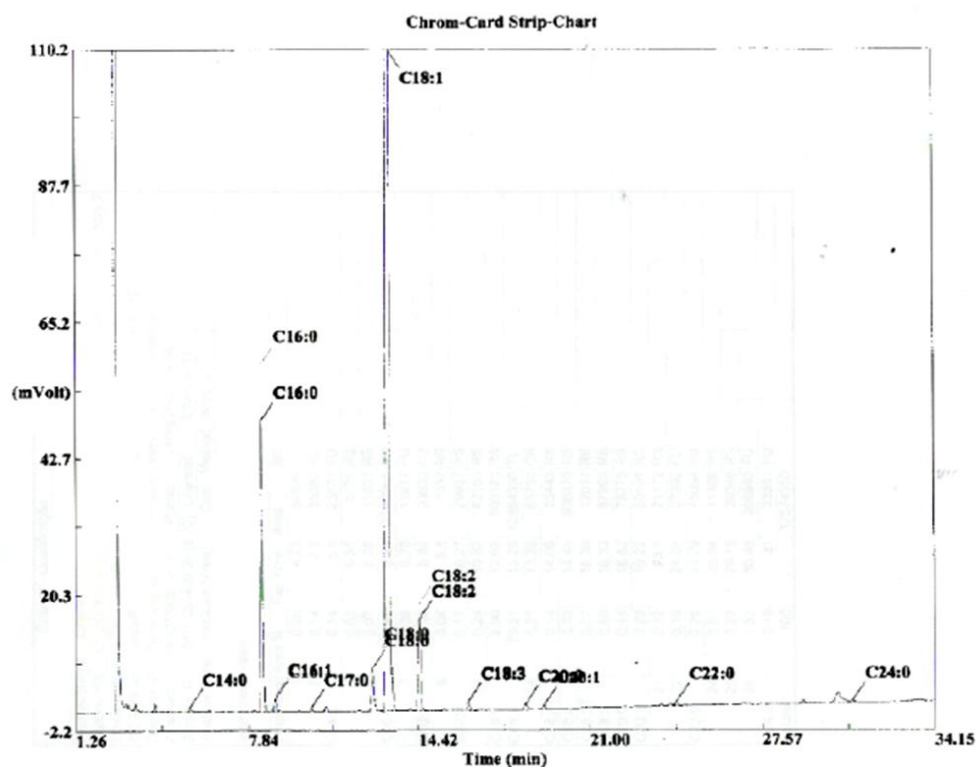


Figura A.15 - Espectro de GC obtido para o extracto de Carço hexano 3H: RT=5.6 – C14:0; RT=8.39 – C16:0; RT=8.89 – C16:1; RT=10.27 – C17:0; RT=12.62 – C18:0; RT=13.28 – C18:1; RT=14.45 – C18:2; RT=16.33 – C18:3; RT=18.52 – C20:0; RT=19.22 – C20:1; RT=24.29 – C22:0; RT=31.00 – C24:0.

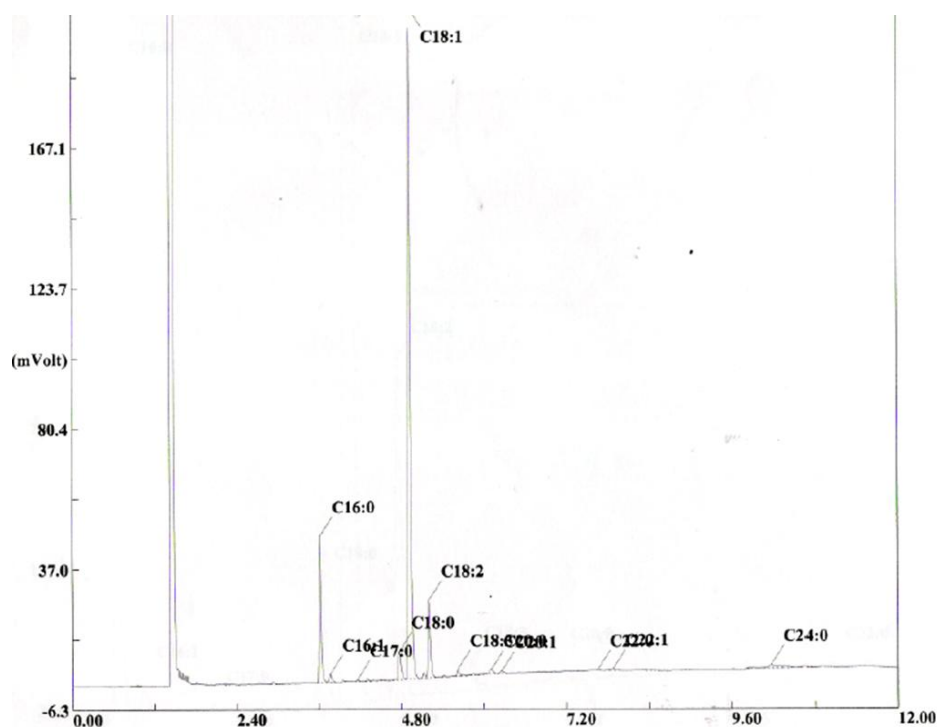


Figura A.16 - Espectro de GC obtido para o extracto de sc-Bagaço 1H: RT=3.61 – C16:0; RT=3.76 – C16:1; RT=4.16 – C17:0; RT=4.77 – C18:0; RT=4.92 – C18:1; RT=5.21 – C18:2; RT=5.63 – C18:3; RT=6.11 – C20:0; RT=6.27 – C20:1; RT=7.76 – C22:0; RT=7.88 – C22:1; RT=10.18 – C24:0.

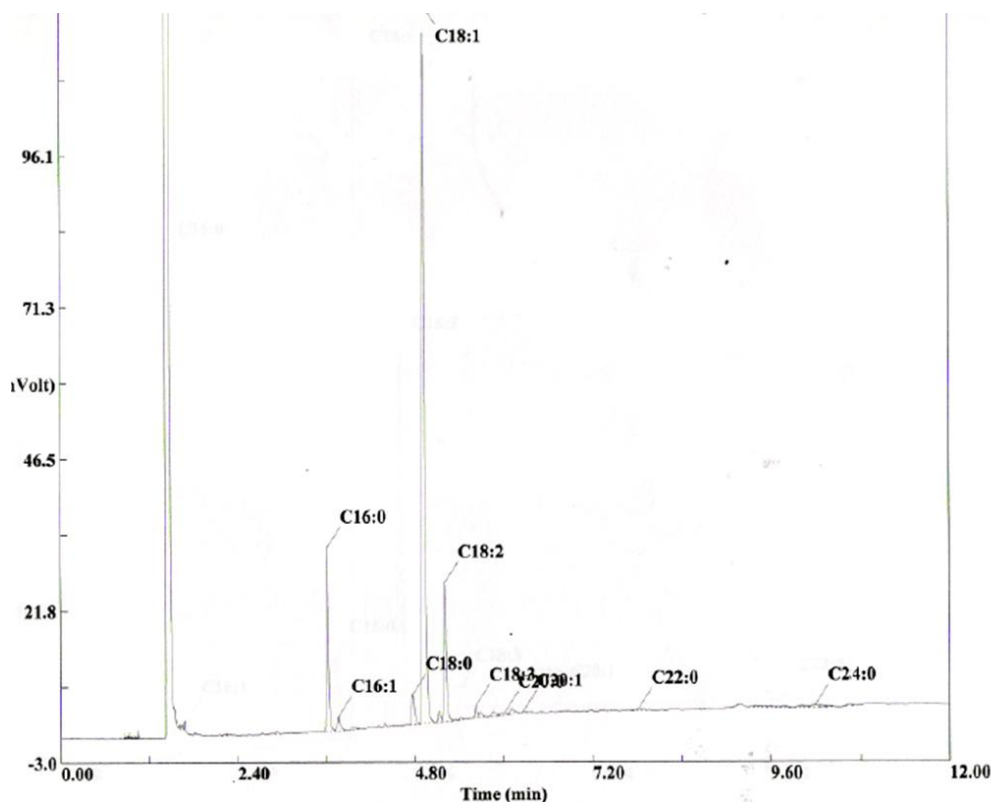


Figura A.17 - Espectro de GC obtido para o extracto de sc-Bagaço 3H: RT=3.61 – C16:0; RT=3.76 – C16:1; RT=4.77 – C18:0; RT=4.92 – C18:1; RT=5.21 – C18:2; RT=5.63 – C18:3; RT=6.02 – C20:0; RT=6.27 – C20:1; RT=7.82 – C22:0; RT=10.2 – C24:0.

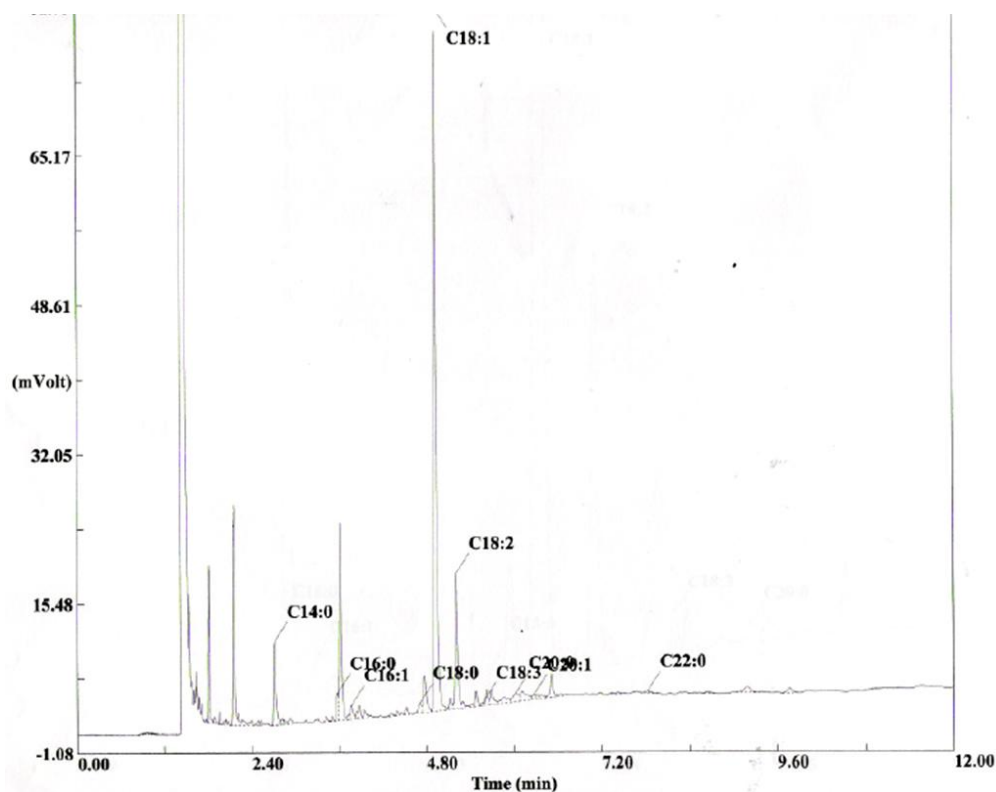


Figura A. 18 - Espectro de GC obtido para o extracto de Bagaço hexano 1H: RT=2.71 – C14:0; RT=3.57 – C16:0; RT=3.76 – C16:1; RT=4.71 – C18:0; RT=4.92 – C18:1; RT=5.21 – C18:2; RT=5.63 – C18:3; RT=6.02 – C20:0; RT=10.2 – C24:0.

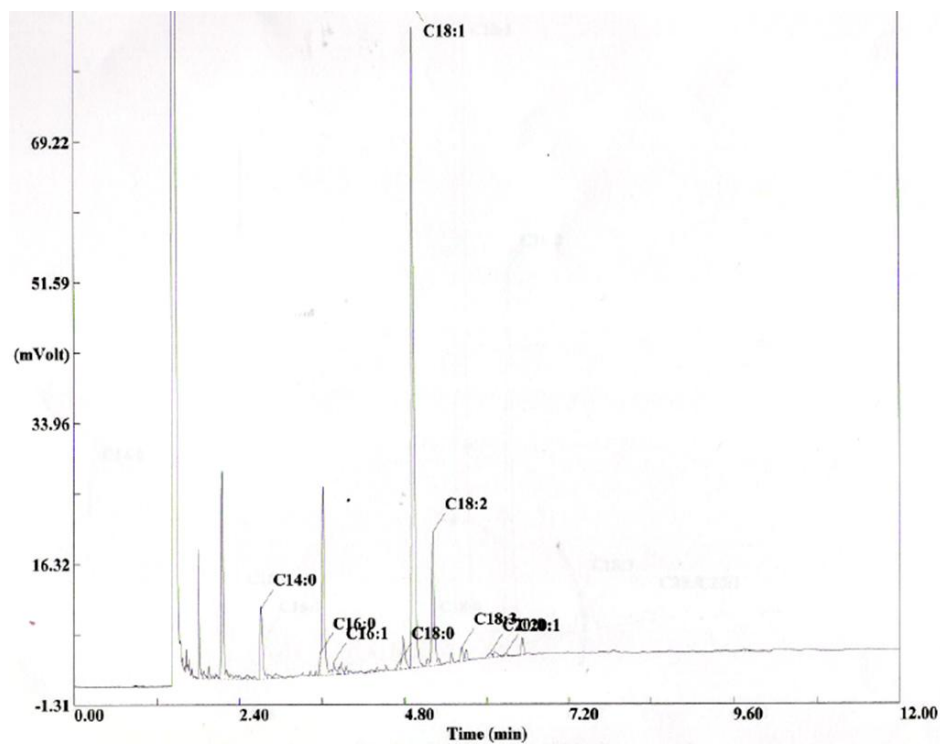


Figura A. 19 - Espectro de GC obtido para o extracto de Bagaço hexano 3H: RT=2.27 – C14:0; RT=3.58 – C16:0; RT=3.77 – C16:1; RT=4.72 – C18:0; RT=4.92 – C18:1; RT=5.21 – C18:2; RT=5.63 – C18:3; RT=6.04 – C20:0; RT=6.27 – C20:1.

Anexo 7 - Identificação e Quantificação dos Ácidos Gordos Presentes nos extractos de Carço e Bagaço de Azeitona

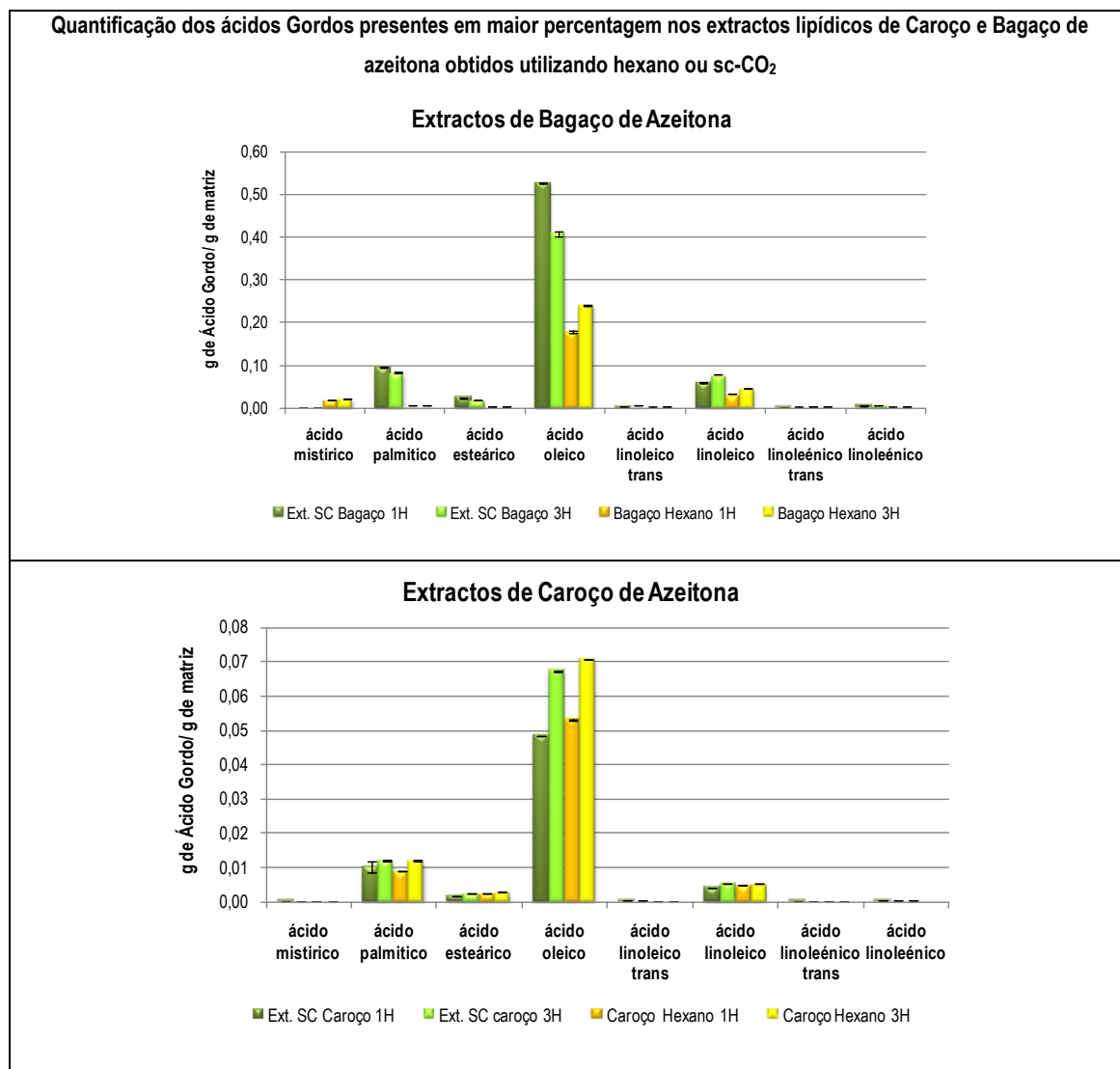


Figura A.20 - Estudo comparativo do perfil dos ácidos gordos (g Ácido Gordo/ g de matriz) presentes nos extractos lipídicos de Carço e Bagaço de Azeitona obtidos em soxhlet com hexano (Carço hexano 1H, Carço hexano 3H, Bagaço hexano 1H e Bagaço hexano 3H) e extractos lipídicos de Carço e Bagaço de Azeitona obtidos usando sc-CO₂ (Ext. SC Carço 1H, Ext. SC Carço 3H, Ext. SC Bagaço 1H e Ext. SC Bagaço 3H).

Tabela A.2 – Gramas de ácido gordo existentes por gramas de extracto de Bagaço de Azeitona (g Ac. Gordo/g exgtracto) obtidos utilizando metodologias diferentes: a extracção em soxhlet com hexano durante 1 hora e 3 horas (Bagaço Hexano 1H e Bagaço Hexano 3H, respectivamente) e extracção com sc-CO₂ durante 1 hora e 3 horas (Ext. SC Bagaço 1H e Ext. SC Bagaço 3H, respectivamente)¹.

	g Ac. Gordo/g extracto											
	Ext. SC Bagaço 1H			Ext. SC Bagaço 3H			Bagaço Hexano 1H			Bagaço Hexano 3H		
C14:0	nd	±	-	nd	±	-	0,00372	±	0,00014	0,00458	±	0,00002
C16:0	0,00670	±	0,00014	0,00799	±	0,00012	0,00102	±	0,00002	0,00111	±	0,00001
C16:1	0,00047	±	0,00002	0,00089	±	0,00007	0,00086	±	0,00012	0,00085	±	0,00004
C17:0	0,00008	±	0,00001	nd	±	-	nd	±	-	nd	±	-
C18:0	0,00169	±	0,00007	0,00181	±	0,00005	0,00065	±	0,00003	0,00070	±	0,00005
C18:1	0,03717	±	0,00018	0,03919	±	0,00060	0,03563	±	0,00066	0,04816	±	0,00008
C18:2T	0,00031	±	0,00000	0,00059	±	0,00002	0,00045	±	0,00016	0,00058	±	0,00006
C18:2	0,00415	±	0,00006	0,00746	±	0,00008	0,00667	±	0,00013	0,00923	±	0,00015
C18:3T	0,00006	±	0,00000	0,00016	±	0,00008	0,00059	±	0,00007	0,00055	±	0,00003
C18:3	0,00035	±	0,00001	0,00065	±	0,00001	0,00050	±	0,00030	0,00090	±	0,00003
C20:0	0,00026	±	0,00025	0,00031	±	0,00006	0,00069	±	0,00025	0,00049	±	0,00007
C20:1	0,00027	±	0,00004	0,00013	±	0,00001	0,00029	±	0,00000	0,00019	±	0,00000
C22:0	0,00020	±	0,00007	0,00016	±	0,00003	0,00022	±	0,00011	nd	±	-
C22:1	0,00027	±	0,00007	nd	±	-	nd	±	-	nd	±	-
C24:0	0,00048	±	0,00004	0,00027	±	0,00008	0,00014	±	0,00000	nd	±	-

Tabela A.3 - Gramas de ácido gordo existentes por gramas de matriz (Bagaço de Azeitona) (g Ac. Gordo/g matriz)) utilizando metodologias diferentes: a extracção em soxhlet com hexano durante 1 hora e 3 horas (Bagaço Hexano 1H e Bagaço Hexano 3H, respectivamente) e extracção com sc-CO₂ durante 1 hora e 3 horas (Ext. SC Bagaço 1H e Ext. SC Bagaço 3H, respectivamente)¹.

	g Ac. Gordo/g matriz											
	Ext. SC Bagaço 1H			Ext. SC Bagaço 3H			Bagaço Hexano 1H			Bagaço Hexano 3H		
C14:0	nd	±	-	nd	±	-	0,01860	±	0,00068	0,02290	±	0,00008
C16:0	0,09499	±	0,00194	0,08351	±	0,00127	0,00508	±	0,00011	0,00555	±	0,00001
C16:1	0,00662	±	0,00032	0,00931	±	0,00076	0,00431	±	0,00062	0,00425	±	0,00019
C17:0	0,00113	±	0,00009	nd	±	-	nd	±	-	nd	±	-
C18:0	0,02400	±	0,00102	0,01894	±	0,00055	0,00324	±	0,00017	0,00349	±	0,00023
C18:1	0,52735	±	0,00257	0,40948	±	0,00631	0,17815	±	0,00330	0,24081	±	0,00040
C18:2T	0,00441	±	0,00008	0,00618	±	0,00020	0,00227	±	0,00081	0,00288	±	0,00031
C18:2	0,05884	±	0,00080	0,07842	±	0,00054	0,03336	±	0,00063	0,04614	±	0,00074
C18:3T	0,00087	±	0,00000	0,00164	±	0,00079	0,00297	±	0,00034	0,00275	±	0,00016
C18:3	0,00499	±	0,00014	0,00679	±	0,00006	0,00249	±	0,00148	0,00450	±	0,00013
C20:0	0,00375	±	0,00354	0,00326	±	0,00067	0,00343	±	0,00123	0,00245	±	0,00035
C20:1	0,00378	±	0,00053	0,00133	±	0,00011	0,00146	±	0,00000	0,00097	±	0,00000
C22:0	0,00279	±	0,00101	0,00165	±	0,00026	0,00111	±	0,00055	nd	±	-
C22:1	0,00379	±	0,00096	nd	±	-	nd	±	-	nd	±	-
C24:0	0,00682	±	0,00057	0,00279	±	0,00085	0,00071	±	0,00000	nd	±	-

¹ nd – significa que o ácido gordo não foi detectado.

Tabela A.4 - Gramas de ácido gordo existentes por gramas de extracto de Carço de Azeitona (g Ac. Gordo/g de extracto) obtidos utilizando metodologias diferentes: a extracção em soxhlet com hexano durante 1 hora e 3 horas (Carço Hexano 1H e Carço Hexano 3H, respectivamente) e extracção com sc-CO₂ durante 1 hora e 3 horas (Ext. SC Carço 1H e Ext. SC Carço 3H, respectivamente)¹.

	g Ac. Gordo/g extracto							
	Ext. SC Carço 1H		Ext. SC carço 3H		Carço Hexano 1H		Carço Hexano 3H	
C14:0	0,00020	± 0,00000	0,00020	± 0,00000	0,00013	± 0,00002	0,00065	± 0,00003
C16:0	0,13870	± 0,00127	0,13049	± 0,00247	0,04452	± 0,00008	0,06005	± 0,00013
C16:1	0,00523	± 0,00006	0,00732	± 0,00011	0,00192	± 0,00002	0,00256	± 0,00000
C17:0	0,00177	± 0,00006	0,00179	± 0,00008	0,00058	± 0,00000	0,00082	± 0,00000
C18:0	0,02505	± 0,00007	0,02690	± 0,00000	0,01196	± 0,00002	0,01396	± 0,00003
C18:1	0,72077	± 0,00129	0,72614	± 0,00127	0,26551	± 0,00104	0,35359	± 0,00051
C18:2T	0,00473	± 0,00015	0,00340	± 0,00014	0,00043	± 0,00000	0,00069	± 0,00003
C18:2	0,06100	± 0,00020	0,05925	± 0,00007	0,02380	± 0,00008	0,02571	± 0,00000
C18:3T	0,00020	± 0,00000	0,00020	± 0,00000	0,00029	± 0,00004	0,00034	± 0,00000
C18:3	0,00640	± 0,00000	0,00602	± 0,00003	0,00265	± 0,00002	0,00244	± 0,00003
C20:0	0,00350	± 0,00000	0,00430	± 0,00000	0,00154	± 0,00002	0,00219	± 0,00003
C20:1	0,00273	± 0,00012	0,00310	± 0,00000	0,00106	± 0,00002	0,00141	± 0,00003
C22:0	0,00063	± 0,00006	0,00096	± 0,00006	0,00034	± 0,00008	0,00116	± 0,00017
C22:1	0,00010	± 0,00000	0,00020	± 0,00000	nd	± -	nd	± -
C24:0	0,00767	± 0,00025	0,01029	± 0,00016	0,00134	± 0,00072	0,06396	± 0,10915
C24:1	0,00903	± 0,00057	0,00627	± 0,00019	nd	± -	nd	± -

Tabela A.5 - Gramas de ácido gordo existentes por gramas de matriz (Carço de Azeitona) (g Ac. Gordo/g matriz) utilizando metodologias diferentes: a extracção em soxhlet com hexano durante 1 hora e 3 horas (Carço Hexano 1H e Carço Hexano 3H, respectivamente) e extracção com sc-CO₂ durante 1 hora e 3 horas (Ext. SC Carço 1H e Ext. SC Carço 3H, respectivamente)¹.

	g Ac. Gordo/g matriz							
	Ext. SC Carço 1H		Ext. SC carço 3H		Carço Hexano 1H		Carço Hexano 3H	
C14:0	0,00001	± 0,00000	0,00002	± 0,00000	0,00003	± 0,00000	0,00013	± 0,00001
C16:0	0,01019	± 0,00152	0,01210	± 0,00023	0,00890	± 0,00002	0,01201	± 0,00003
C16:1	0,00035	± 0,00000	0,00068	± 0,00001	0,00038	± 0,00000	0,00051	± 0,00000
C17:0	0,00012	± 0,00000	0,00017	± 0,00001	0,00012	± 0,00000	0,00016	± 0,00000
C18:0	0,00168	± 0,00000	0,00249	± 0,00000	0,00239	± 0,00000	0,00279	± 0,00001
C18:1	0,04838	± 0,00009	0,06731	± 0,00012	0,05310	± 0,00021	0,07072	± 0,00010
C18:2T	0,00032	± 0,00001	0,00032	± 0,00001	0,00009	± 0,00000	0,00014	± 0,00001
C18:2	0,00409	± 0,00001	0,00549	± 0,00001	0,00476	± 0,00002	0,00514	± 0,00000
C18:3T	0,00001	± 0,00000	0,00002	± 0,00000	0,00006	± 0,00001	0,00007	± 0,00000
C18:3	0,00043	± 0,00000	0,00056	± 0,00000	0,00053	± 0,00000	0,00049	± 0,00001
C20:0	0,00023	± 0,00000	0,00040	± 0,00000	0,00031	± 0,00000	0,00044	± 0,00001
C20:1	0,00018	± 0,00001	0,00029	± 0,00000	0,00021	± 0,00000	0,00028	± 0,00001
C22:0	0,00004	± 0,00000	0,00009	± 0,00001	0,00007	± 0,00002	0,00023	± 0,00003
C22:1	0,00001	± 0,00000	0,00002	± 0,00000	nd	± -	nd	± -
C24:0	0,00051	± 0,00002	0,00095	± 0,00002	0,00027	± 0,00014	0,01279	± 0,02183
C24:1	0,00061	± 0,00004	0,00058	± 0,00002	nd	± -	nd	± -

¹ nd – significa que o ácido gordo não foi detectado.

Anexo 8 - Cromatogramas de GC Obtidos Para o Estudo Comparativo dos Ácidos Gordos Existentes no Óleo de Girassol Quando Incorporamos Diferentes Percentagens de Extracto Supercrítico de Carço e Bagaço de Azeitona Antes e Depois de Sujeitos ao Teste de Rancimat

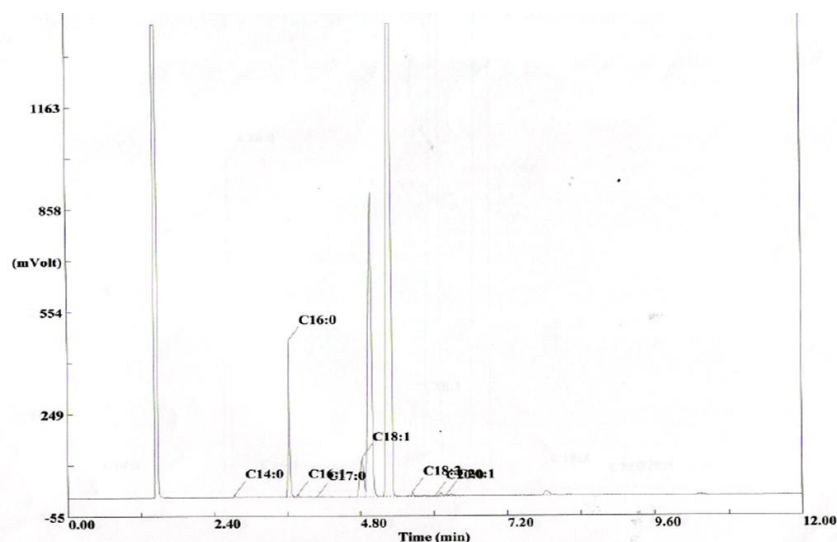


Figura A.21 - Espectro de GC obtido para o óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Carço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 0,1% sc-Carço 3H) antes do teste de rancimat: RT=2.74 – C14:0; RT=3.63 – C16:0; RT=3.77 – C16:1; RT=4.09 – C17:0; RT=4.83 – C18:1; RT=5.65 – C18:3; RT=6.02 – C20:0; RT=6.2 – C20:1.

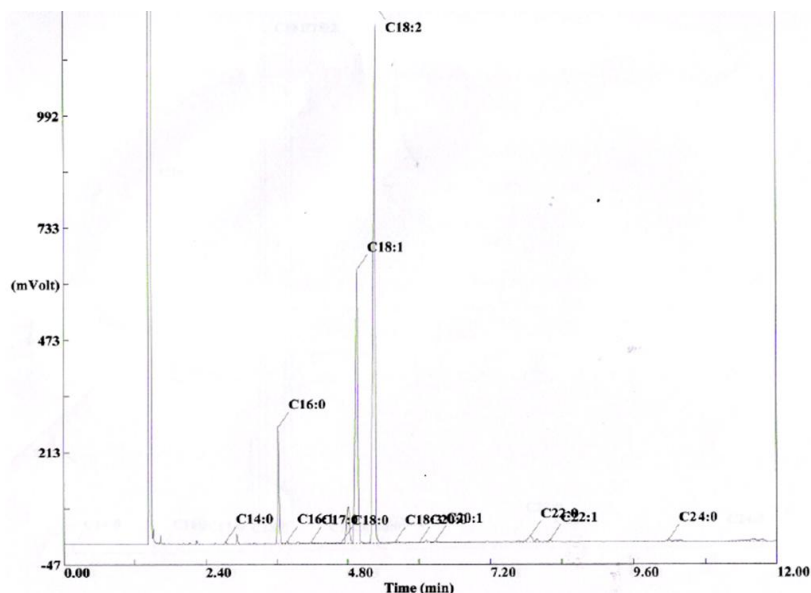


Figura A.22 - Espectro de GC obtido para o óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Carço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 0,1% sc-Carço 3H) depois do teste de rancimat: RT=2.73 – C14:0; RT=3.63 – C16:0; RT=3.77 – C16:1; RT=4.17 – C17:0; RT=4.69 – C18:0; RT=4.96 – C18:1; RT=5.27 – C18:2; RT=5.59 – C18:3; RT=6.01 – C20:0; RT=6.28 – C20:1; RT=7.87 – C22:0; RT=8.2 – C22:1; RT=10.19 – C24:0.

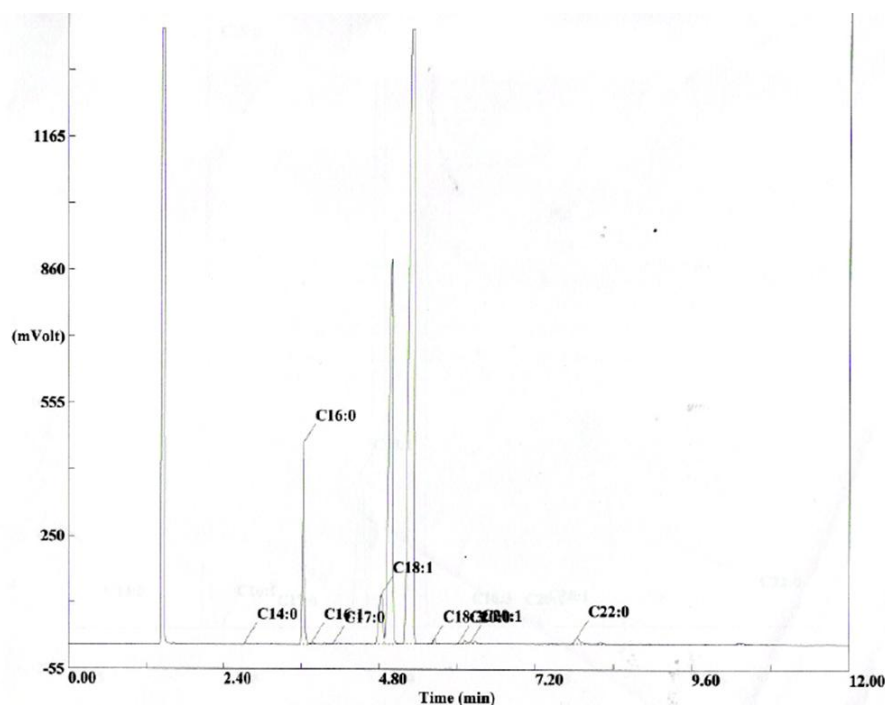


Figura A.23 - Espectro de GC obtido para o óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Caróço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 1% sc-Caróço 3H) antes do teste de rancimat: RT=2.73 – C14:0; RT=3.63 – C16:0; RT=3.77 – C16:1; RT=4.08 – C17:0; RT=4.83 – C18:1; RT=5.6 – C18:3; RT=6.01 – C20:0; RT=6.2 – C20:1; RT=7.83 – C22:0.

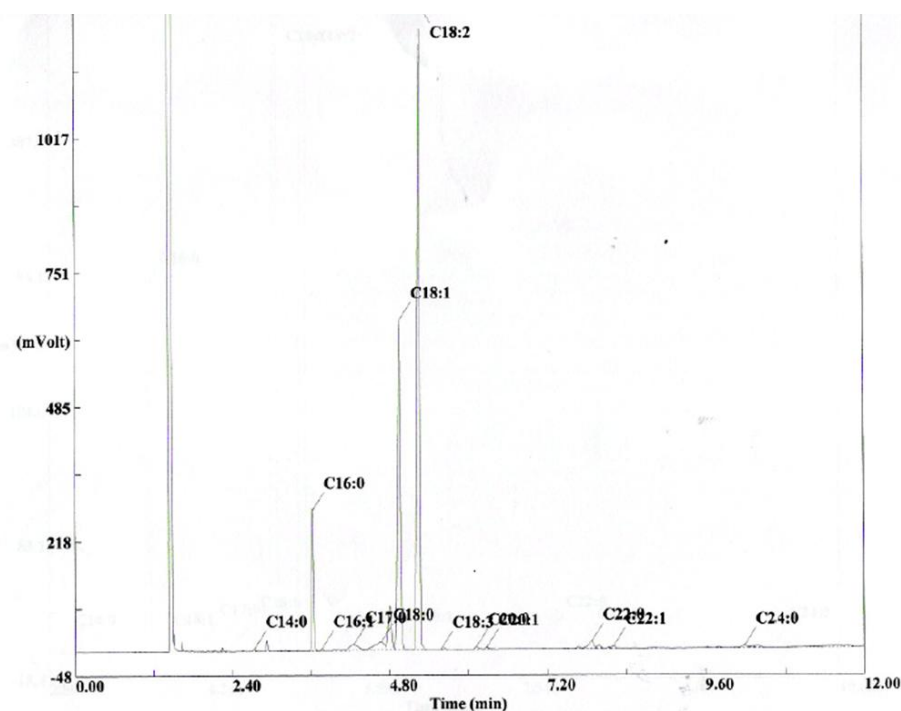


Figura A.24 - Espectro de GC obtido para o óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Caróço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 1% sc-Caróço 3H) depois do teste de rancimat: RT=2.74 – C14:0; RT=3.63 – C16:0; RT=3.77 – C16:1; RT=4.25 – C17:0; RT=4.68 – C18:0; RT=4.96 – C18:1; RT=5.27 – C18:2; RT=5.59 – C18:3; RT=6.13 – C20:0; RT=6.28 – C20:1; RT=7.87 – C22:0; RT=8.21 – C22:1; RT=10.21 – C24:0.

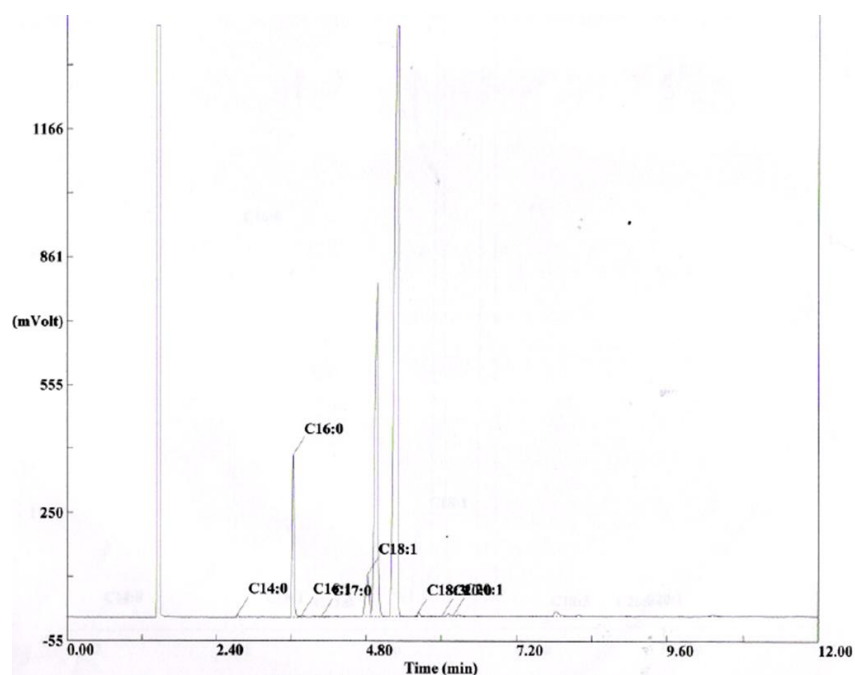


Figura A.25 - Espectro de GC obtido para o óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 0,1% sc-Bagaço 3H) antes do teste de rancimat: RT=2.73 – C14:0; RT=3.63 – C16:0; RT=3.77 – C16:1; RT=4.08 – C17:0; RT=4.82 – C18:1; RT=5.6 – C18:3; RT=6.01 – C20:0; RT=6.19 – C20:1.

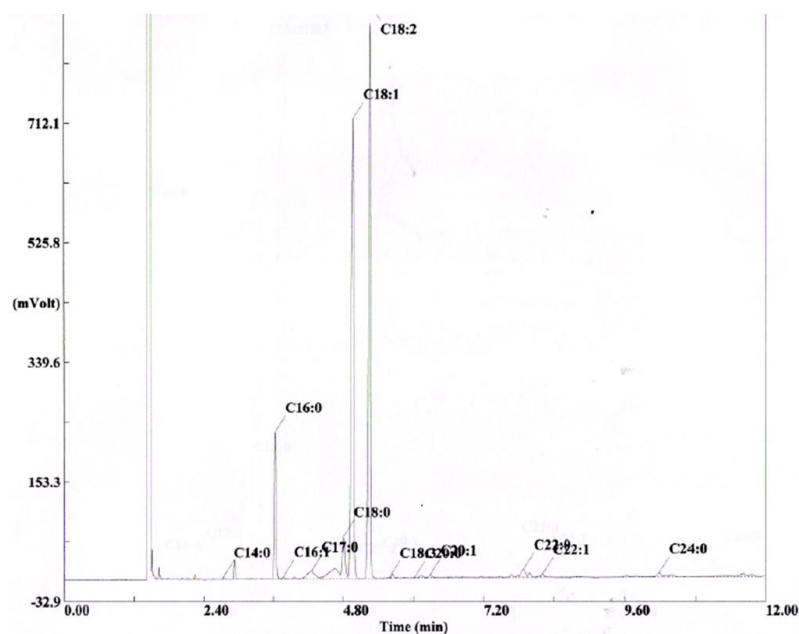


Figura A.26 - Espectro de GC obtido para o óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 0,1% sc-Bagaço 3H) depois do teste de rancimat: RT=2.73 – C14:0; RT=3.63 – C16:0; RT=3.77 – C16:1; RT=4.24 – C17:0; RT=4.66 – C18:0; RT=4.96 – C18:1; RT=5.27 – C18:2; RT=5.59 – C18:3; RT=6.01 – C20:0; RT=6.28 – C20:1; RT=7.87 – C22:01; RT=10.21 – C24:0.

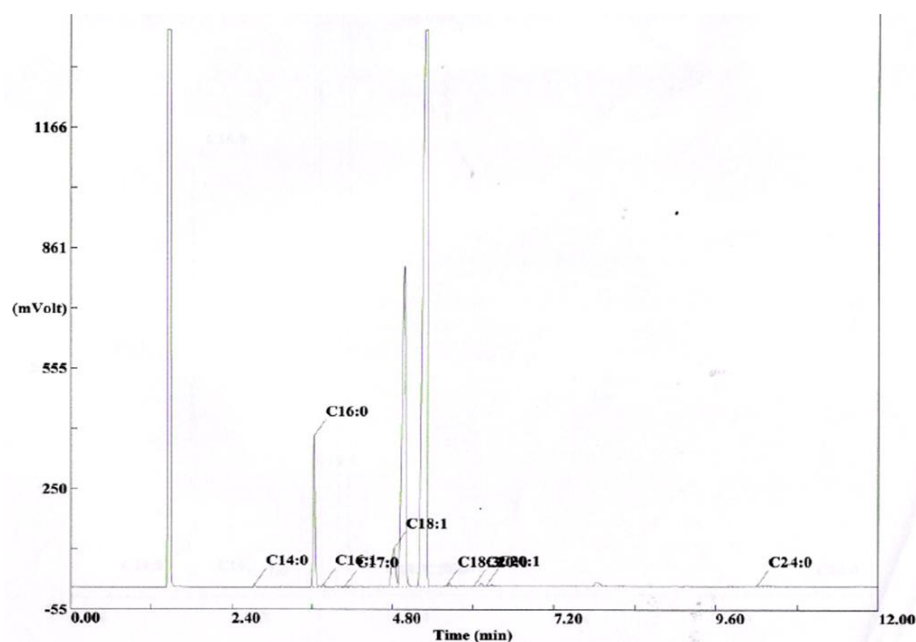


Figura A.27 - Espectro de GC obtido para o óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 1% sc-Bagaço 3H) antes do teste de rancimat: RT=2.74 – C14:0; RT=3.63 – C16:0; RT=3.77 – C16:1; RT=4.09 – C17:0; RT=4.82 – C18:1; RT=5.6 – C18:3; RT=6.01 – C20:0; RT=6.2 – C20:1; RT=10.21 – C24:0.

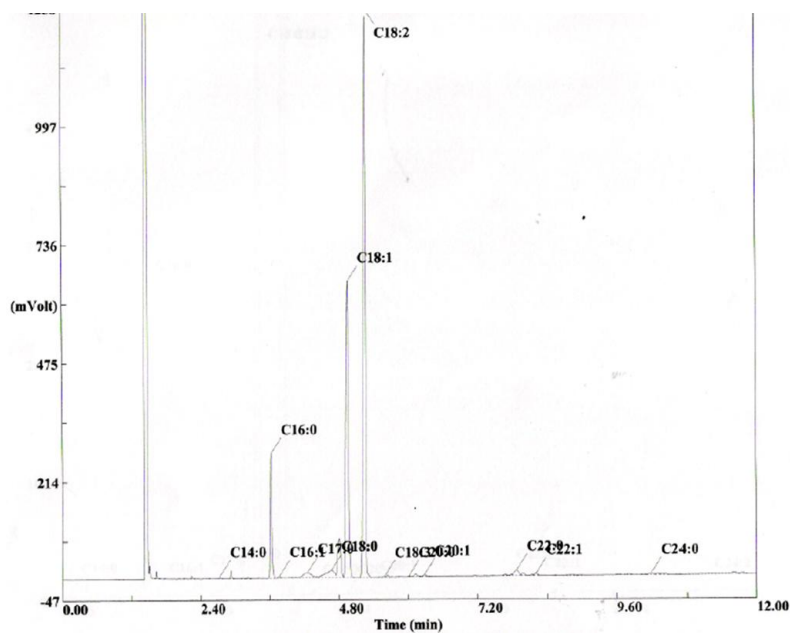


Figura A.28 - Espectro de GC obtido para o óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 1% sc-Bagaço 3H) depois do teste de rancimat: RT=2.73 – C14:0; RT=3.63 – C16:0; RT=3.77 – C16:1; RT=4.26 – C17:0; RT=4.67 – C18:0; RT=4.96 – C18:1; RT=5.27 – C18:2; RT=5.59 – C18:3; RT=6.01 – C20:0; RT=6.28 – C20:1; RT=7.87 – C22:0; RT=8.2 – C22:1; RT=10.19 – C24:0.

Anexo 9 - Estudo Comparativo dos Ácidos Gordos Existentes no Óleo de Girassol Quando Incorporamos Diferentes Percentagens de Extracto Supercrítico de Carço e Bagaço de Azeitona Antes e Depois de Sujeitos ao Teste de Rancimat

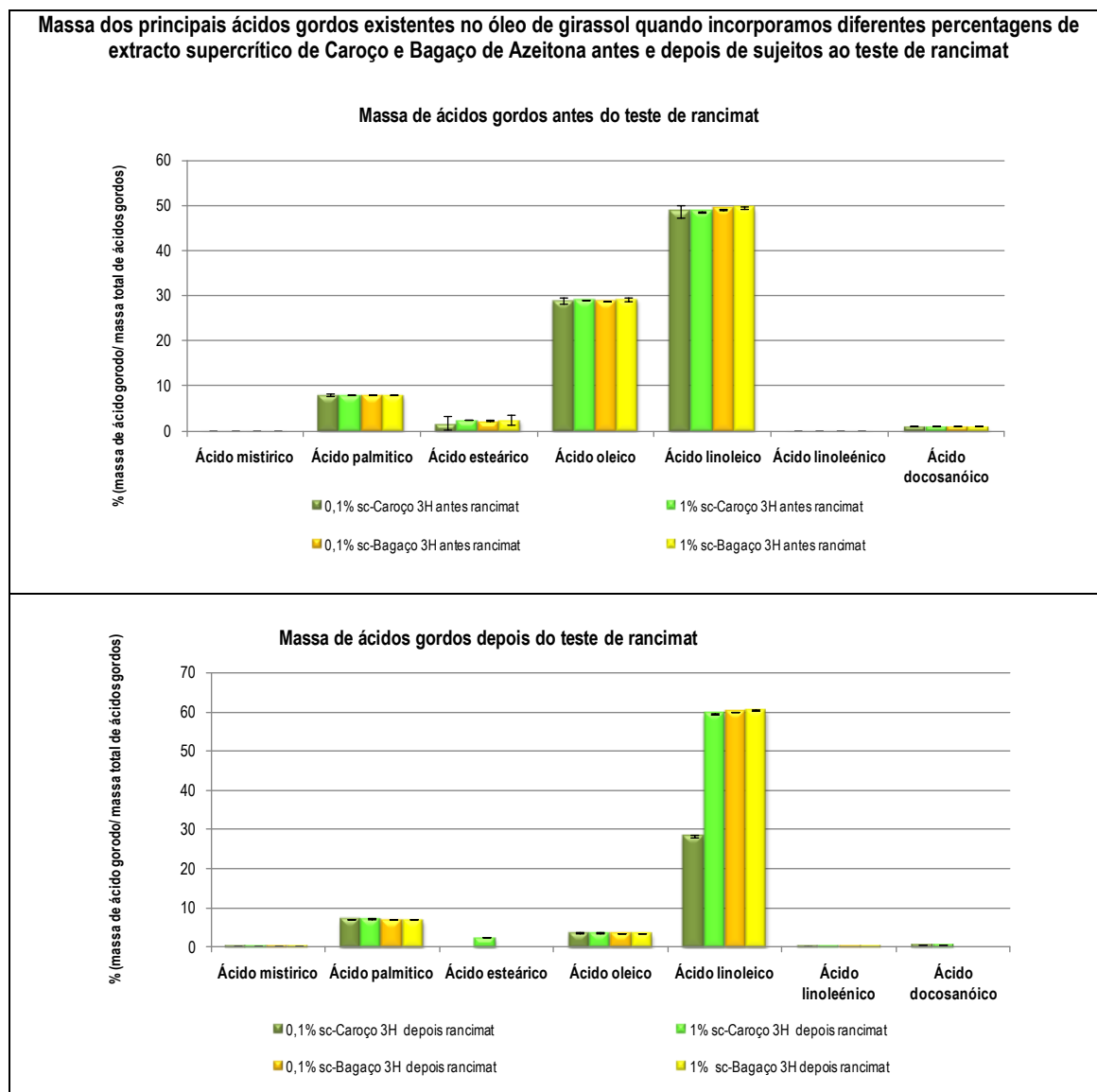


Figura 3.29 – Estudo comparativo das % da massa de ácido gordo/ massa de ácido gordo total existentes na amostra: óleo de girassol quando incorporamos diferentes percentagens (m/m) de extracto supercrítico de Carço e Bagaço de Azeitona(óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Carço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 0,1% sc-Carço 3H), óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Carço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 1% sc-Carço 3H), óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 0,1% sc-Bagaço 3H) e óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 1% sc-Bagaço 3H)) antes e depois do teste de Rancimat.

Tabela A.6 – Estudo comparativo da % da massa de ácido gordo/ massa de ácido gordo total existentes no óleo de girassol quando incorporamos diferentes percentagens (m/m) de extracto supercrítico de Carço de Azeitona: óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Carço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 0,1% sc-Carço 3H) e óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Carço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 1% sc-Carço 3H) antes e depois do teste de rancimat.

	% (massa de ácido gordo/ massa total de ácidos gordos)			
	0,1% sc-Carço 3H antes rancimat	0,1% sc-Carço 3H depois rancimat	1% sc-Carço 3H antes rancimat	1% sc-Carço 3H depois rancimat
Ácido mistúico	0,115 ± 0,005	0,086 ± 0,002	0,110 ± 0,002	0,085 ± 0,001
Ácido palmítico	8,041 ± 0,221	7,182 ± 0,067	8,041 ± 0,030	7,208 ± 0,067
Ácido esteárico	1,792 ± 1,529	0,000 ± 0,036	2,541 ± 0,050	2,541 ± 0,020
Ácido oleico	28,893 ± 0,768	3,711 ± 0,202	28,988 ± 0,055	3,736 ± 0,169
Ácido linoleico	48,678 ± 1,306	28,247 ± 0,278	48,615 ± 0,096	59,501 ± 0,269
Ácido linoleénico	0,025 ± 0,000	0,099 ± 0,103	0,025 ± 0,000	0,009 ± 0,001
Ácido docosanóico	1,095 ± 0,021	0,642 ± 0,014	1,165 ± 0,019	0,641 ± 0,004

Tabela A.7 - Estudo comparativo % da massa de ácido gordo/ massa de ácido gordo total existentes no óleo de girassol quando incorporamos diferentes percentagens (m/m) de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona: óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 1 hora (óleo de girassol + 0,1% sc-Bagaço 1H), óleo de girassol com 0,1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 0,1% sc-Bagaço 3H) e óleo de girassol com 1% de extracto supercrítico de Bagaço de Azeitona de 3 horas (óleo de girassol + 1% sc-Bagaço 3H) antes e depois do teste de rancimat.

	% (massa de ácido gordo/ massa total de ácidos gordos)					
	0,1% sc-Bagaço 1H antes rancimat	0,1% sc-Bagaço 1H depois rancimat	0,1% sc-Bagaço 3H antes rancimat	0,1% sc-Bagaço 3H depois rancimat	1% sc-Bagaço 3H antes rancimat	1% sc-Bagaço 3H depois rancimat
Ácido mistúico	0,078 ± 0,067	0,082 ± 0,002	0,107 ± 0,004	0,082 ± 0,001	0,106 ± 0,003	0,083 ± 0,000
Ácido palmítico	8,666 ± 1,041	6,614 ± 0,060	7,914 ± 0,008	6,982 ± 0,027	8,017 ± 0,054	7,051 ± 0,015
Ácido esteárico	2,737 ± 1,677	0,000 ± 0,000	2,306 ± 0,202	0,000 ± 0,000	2,510 ± 1,139	0,000 ± 0,000
Ácido oleico	37,121 ± 0,195	3,055 ± 0,009	28,734 ± 0,080	3,619 ± 0,008	29,170 ± 0,294	3,629 ± 0,007
Ácido linoleico	37,375 ± 0,188	51,840 ± 0,138	49,118 ± 0,216	60,033 ± 0,080	49,467 ± 0,350	60,357 ± 0,180
Ácido linoleénico	0,050 ± 0,001	0,077 ± 0,001	0,025 ± 0,001	0,025 ± 0,000	0,025 ± 0,000	0,025 ± 0,001
Ácido docosanóico	1,181 ± 0,008	0,674 ± 0,009	1,036 ± 0,009	0,000 ± 0,000	1,007 ± 0,002	0,000 ± 0,001

Anexo 10 - Saponificação de Extractos Lipídicos de Carço e Bagaço de Azeitona e Extracção dos Insaponificáveis

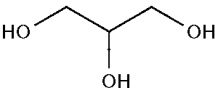
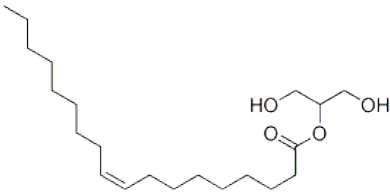
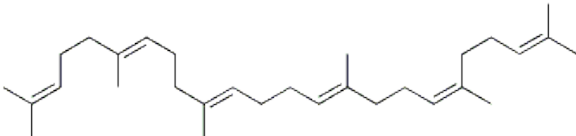
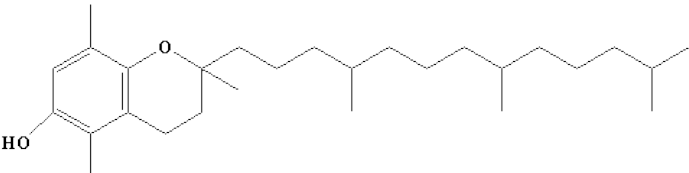
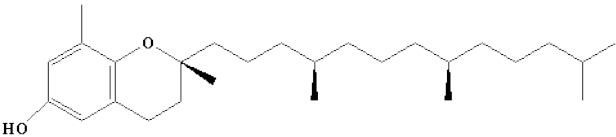
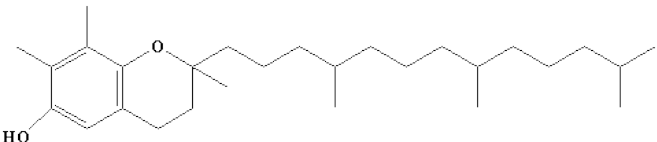
✓ Protocolo para a saponificação de extractos lipídicos de carço e bagaço de azeitona

1. A 0,5g de extracto adicionar 0,5mL de KOH (0,76g/mL);
2. Adicionar à mistura 200µL de solução padrão, no nosso caso Colesterol 5mg/ml em etanol;
3. Deixar em refluxo durante 30 minutos.

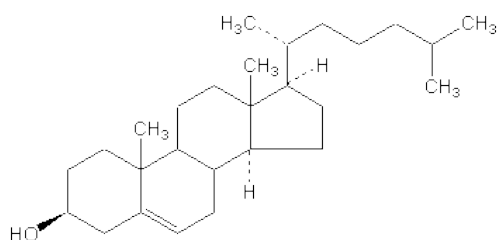
✓ Protocolo para a extracção dos insaponificáveis dos extractos de carço e bagaço de azeitona

1. Adicionar à mistura obtida na saponificação 10mL de ciclohexano e 5mL de água;
2. Agitar vigorosamente durante 5 minutos;
3. Deixar decantar numa ampola até haver separação total das duas fases;
4. Recolher o sobrenadante;
5. Extrair novamente com 10mL de ciclohexano e 5mL de água;
6. Agitar vigorosamente durante 5 minutos;
7. Deixar decantar até separação total das duas fases;
8. Recolher o sobrenadante e juntar com o sobrenadante obtido na primeira extracção;
9. Evaporar à secura e recolher o resíduo.

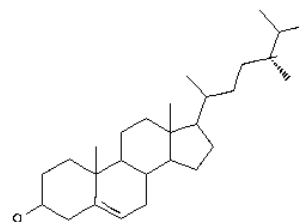
Anexo 11 - Identificação dos Esteróis Presentes nos extractos de Caróço e Bagaço de Azeitona

Nome Comum	Fórmula Química	Peso Molecular	Fórmula de Estrutura
Glicerol	$C_3H_5(OH)_3$	92,10 g/mol	
Monoleína	$C_{21}H_{40}O_4$	356,54g/mol	
Esqualeno	$C_{30}H_{50}$	410,72g/mol	
β -Tocoferol	$C_{28}H_{48}O_2$	416,68g/mol	
δ -Tocoferol	$C_{27}H_{46}O_2$	402,65g/mol	
γ -Tocoferol	$C_{28}H_{48}O_2$	416.68g/mol	

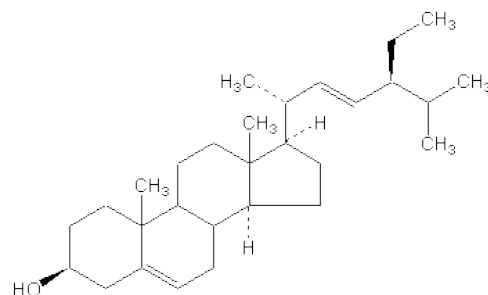
Colesterol $C_{27}H_{46}O_1$ 386,65g/mol



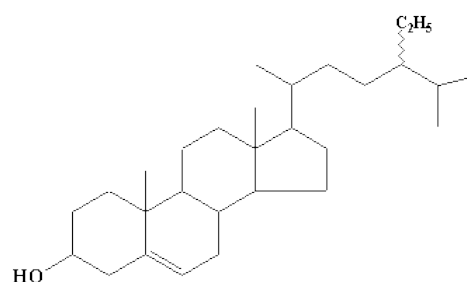
Campesterol $C_{28}H_{48}O$ 400,68g/mol



Stigmasterol $C_{29}H_{48}O_1$ 412,69g/mol



β -Sitosterol $C_{29}H_{50}O_1$ 414,71g/mol



Anexo 12 - Espectros de GC Obtidos Para a Determinação dos Esteróis presentes nos Extractos Lipídicos de Carço e Bagaço de Azeitona¹

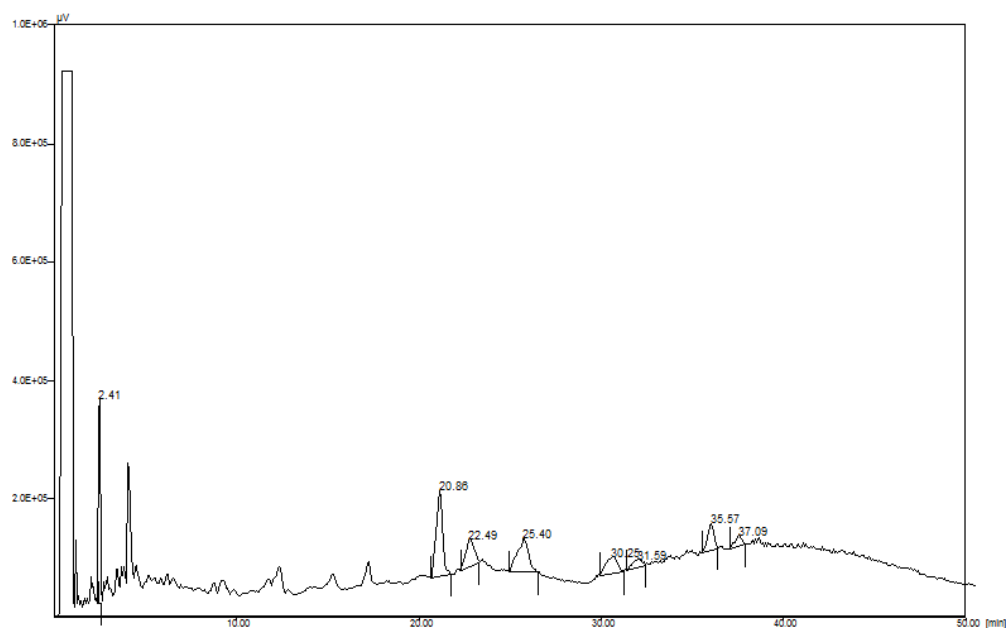


Figura A.29 - Espectro de GC obtido para o extracto de Carço hexano 1H: TR=2.41 – Glicerol; TR=20.86 – Esqualeno; TR=22.49 – δ -tocoferol; TR=25.40 – γ -tocoferol; TR=30.25 – Colesterol; TR=31.59 – β -sitosterol; TR=35.57 – Esterol; TR=37.09 – HDS.

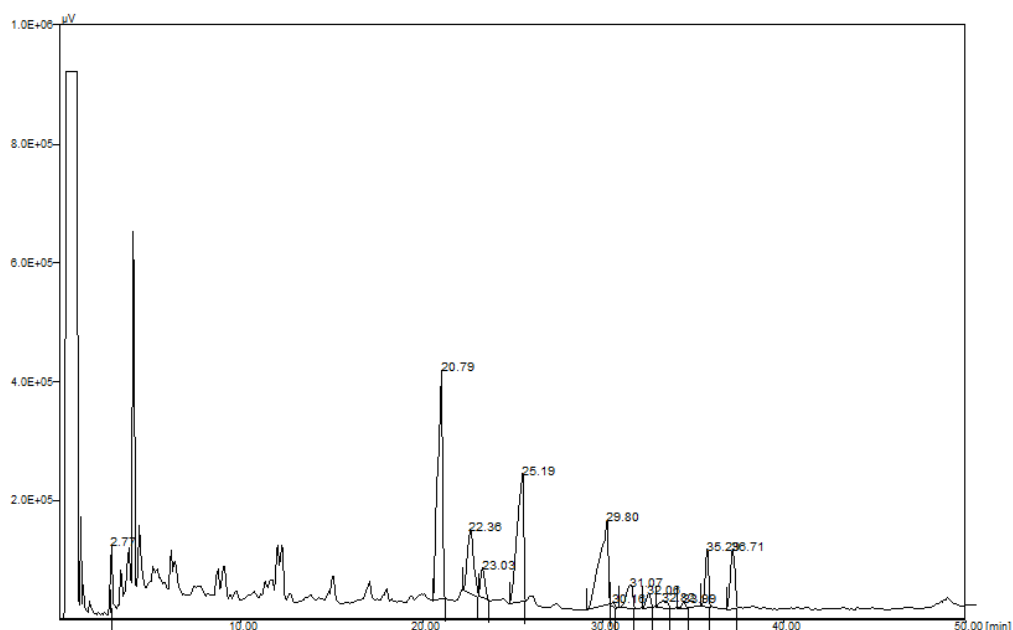


Figura A.30 – Espectro de GC obtido para o extracto de Carço hexano 3H: TR=2.77 – Glicerol; TR=20.79 – Monoleína; TR=22.36 – Esqualeno; TR=23.03 – β -tocoferol; TR=25.19 – Colesterol; TR=29.80 – Campesterol; TR=30.16 – Stigmasterol; TR=31.07 – β -Sitosterol; TR=32.06 – Esterol; TR=32.83 – Esterol; TR= 33.99 – Esterol; TR=35.29 – Esterol e TR=36.71 – HDS.

¹ Todos os extractos foram analisados por GC em triplicado, os cromatogramas apresentados são apenas de uma das réplicas.

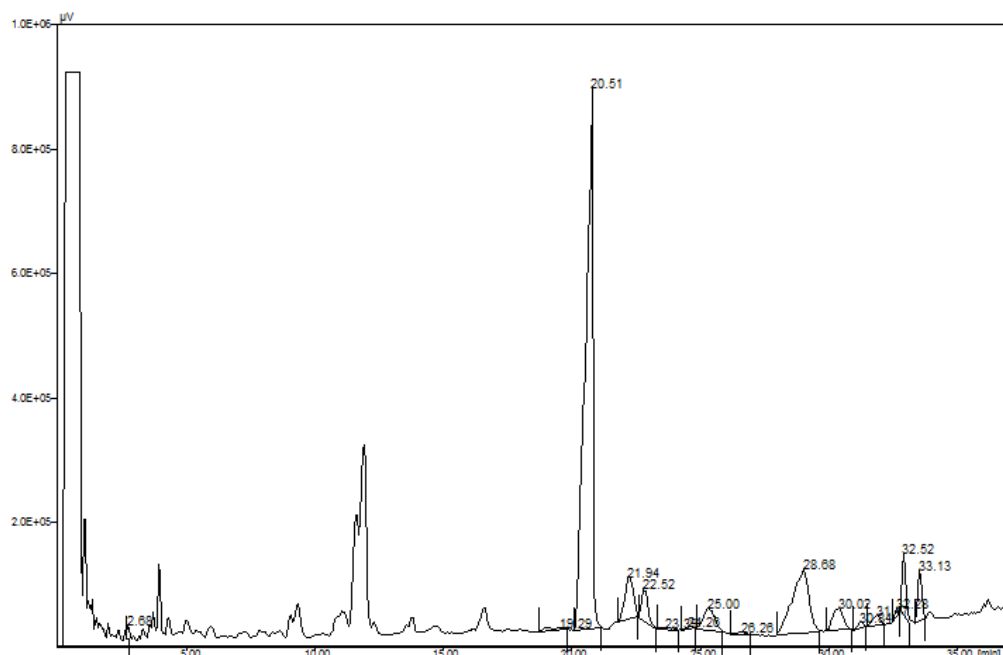


Figura A.31 – Espectro de GC obtido para o extracto de sc-Caroço 1H: TR=2.68 – Glicerol; TR=19.29 – Monoleína; TR=20.51 – Esqualeno; TR=21.94 – β -tocoferol; TR=22.52 δ -tocoferol; TR=24.26 - γ -tocoferol; TR=25.00 – Colesterol; TR=26.26 – Campesterol; TR=28.68 – β -Sitosterol; TR=30.02 – Esterol, TR=30.84 – Esterol; TR=31.47 – Esterol; TR=32.52 – Esterol e TR=33.13 – HDS.

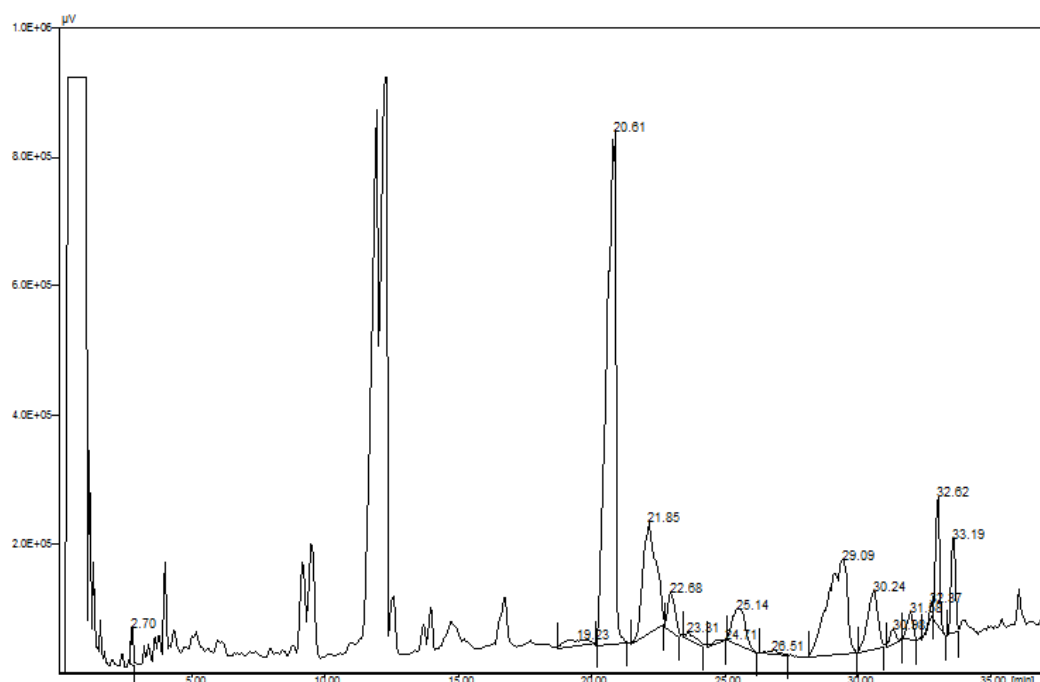


Figura A.32 – Espectro de GC obtido para o extracto de sc-Caroço 3H: TR=2.70 – Glicerol; TR=19.23 – Monoleína; TR=20.61 – Esqualeno; TR=21.85 – β -tocoferol; TR=22.68 – δ -tocoferol; TR=23.31 – γ -tocoferol; TR=24.71 – Colesterol; TR=25.14 – Campesterol; TR=29.09 – β -Sitosterol; TR=30.24 – Esterol, TR=30.98 – Esterol; TR=31.58 – Esterol; TR=32.62 – Esterol e TR=33.19 – HDS.

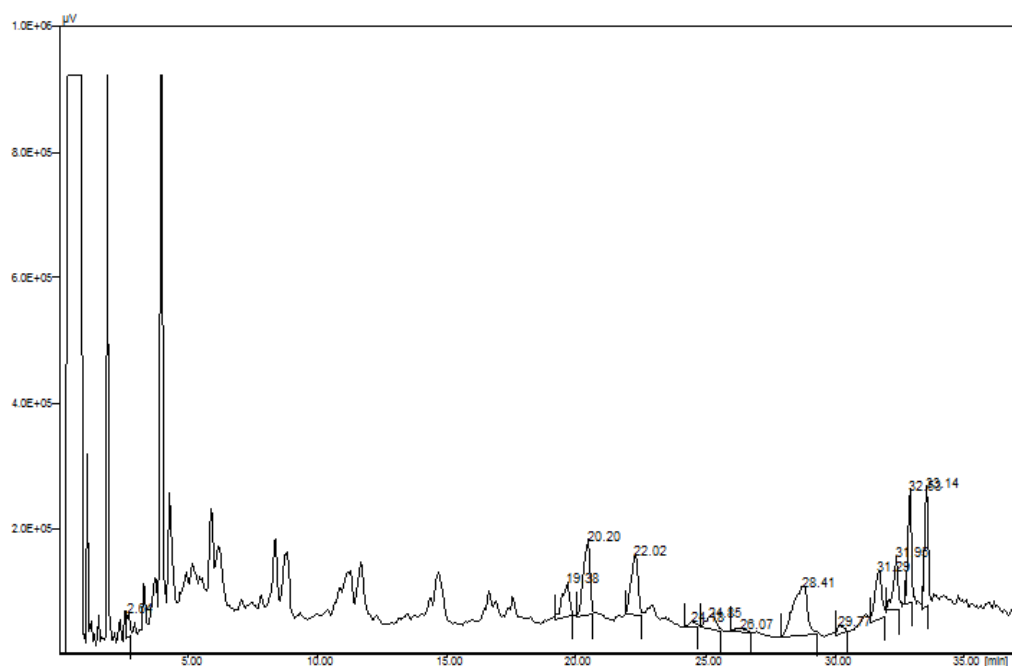


Figura A.33 – Espectro de GC obtido para o extracto de Bagaço Hexano 1H: TR=2.64 – Glicerol; TR=19.38 – Monoleína; TR=22.02 – β -Tocoferol; TR=24.18 – Colesterol; TR=24.85 – Campesterol; TR=26.07 – Stigmasterol; TR=28.41 – β -sitosterol; TR=29.77 – Esterol; TR=31.29 – Esterol; TR=31.95 – Esterol; TR=32.53 – Esterol e TR=33.14 – HDS.

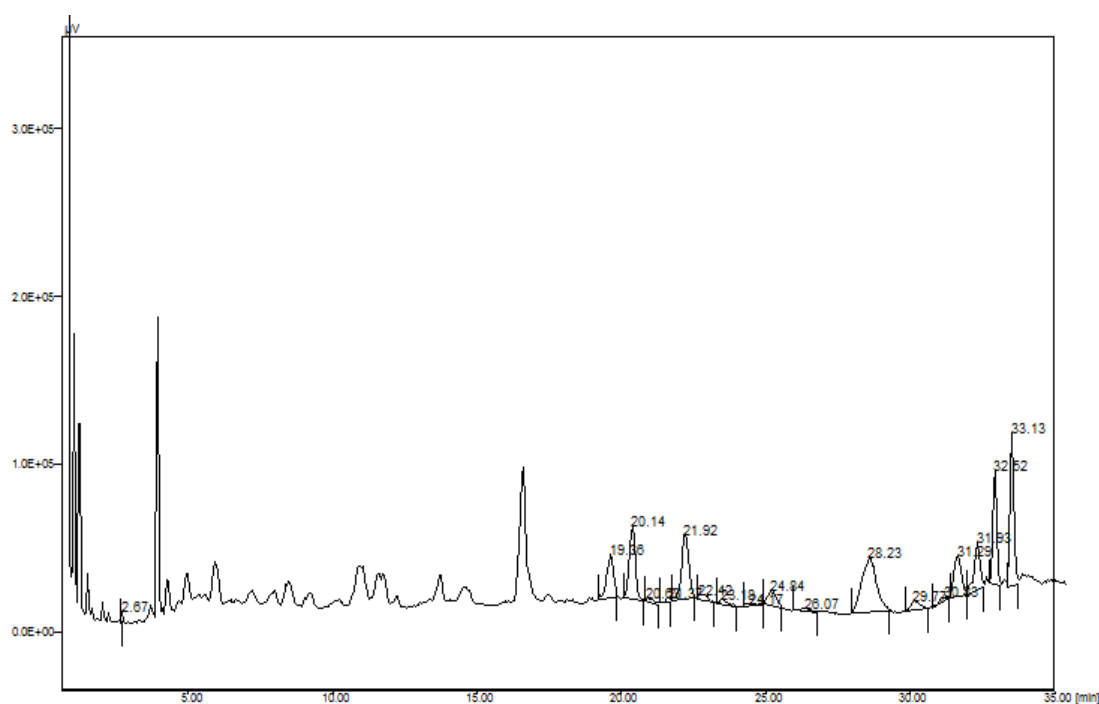


Figura A.34 – Espectro de GC obtido para o extracto de Bagaço hexano 3H: TR=2.67 – Glicerol; TR=19.36 – Monoleína; TR=20.14 – Esqualeno; TR=21.92 – β -Tocoferol; TR=22.42 – δ -Tocoferol; TR=23.18 – γ -Tocoferol; TR=24.17 – Colesterol; TR=24.84 – Campesterol, TR=26.07 – Stigmasterol; TR=28.23 – β -sitosterol; TR=29.77 – Esterol; TR=30.83 – Esterol; TR=31.29 – Esterol; TR=31.93 – Esterol; TR=32.52 – Esterol e TR=33.13 – HDS.

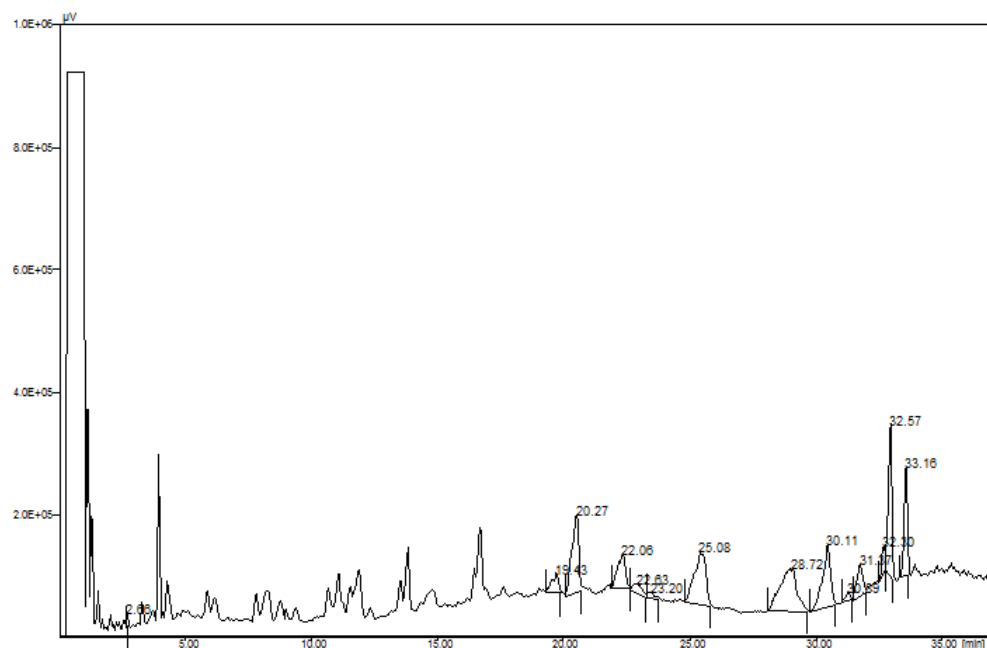


Figura A.35 – Espectro de GC obtido para o extracto de sc-Bagaço 1H: TR=2.66 – Glicerol; TR=19.43 – Monoléina; TR=20.27 – Esqualeno; TR=22.06 – β -Tocoferol; TR=22.63 – δ -Tocoferol; TR=23.20 – γ -Tocoferol; TR=25.08 – Colesterol; TR=28.72 – β -Sitosterol; TR=30.11 – Esterol; TR=30.89 – Esterol; TR=31.37 – Esterol; TR=32.30 – Esterol; TR=32.57 – Esterol e TR=33.16 – HDS.

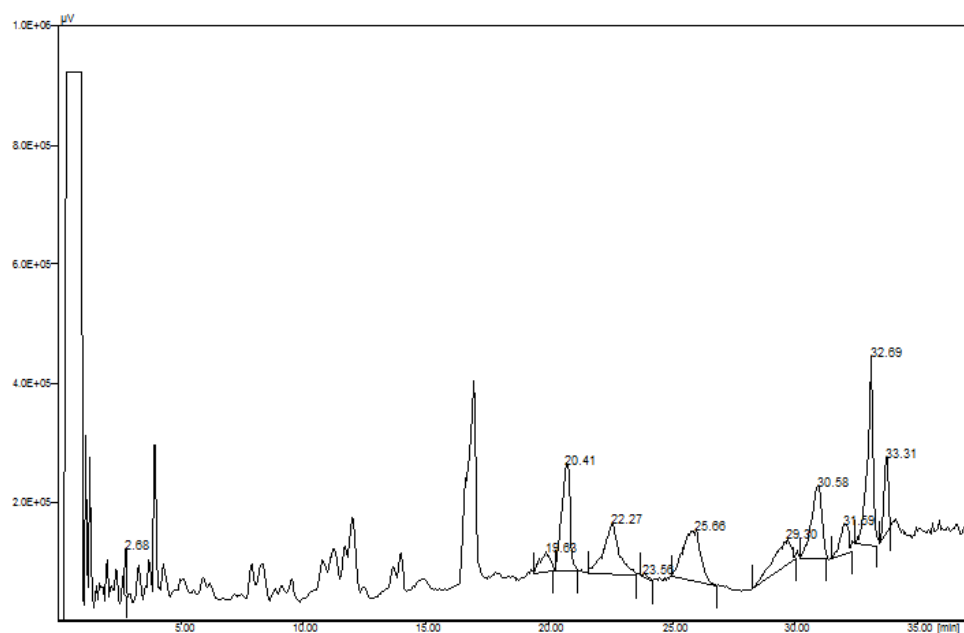


Figura A.36 – Espectro de GC obtido para o extracto de sc-Bagaço 1H: TR=2.68 – Glicerol; TR=19.60 – Monoléina; TR=20.42 – Esqualeno; TR=22.27 – β -Tocoferol; TR=23.58 – Colesterol; TR=25.52 – Campesterol; TR=29.32 – β -Sitosterol; TR=30.51 – Esterol; TR=31.58 – Esterol; TR=32.68 – Esterol e TR=33.28 – HDS.

Anexo 13 - Identificação e Quantificação dos Esteróis Presentes nos Extractos Lipídicos de Carço e Bagaço de Azeitona

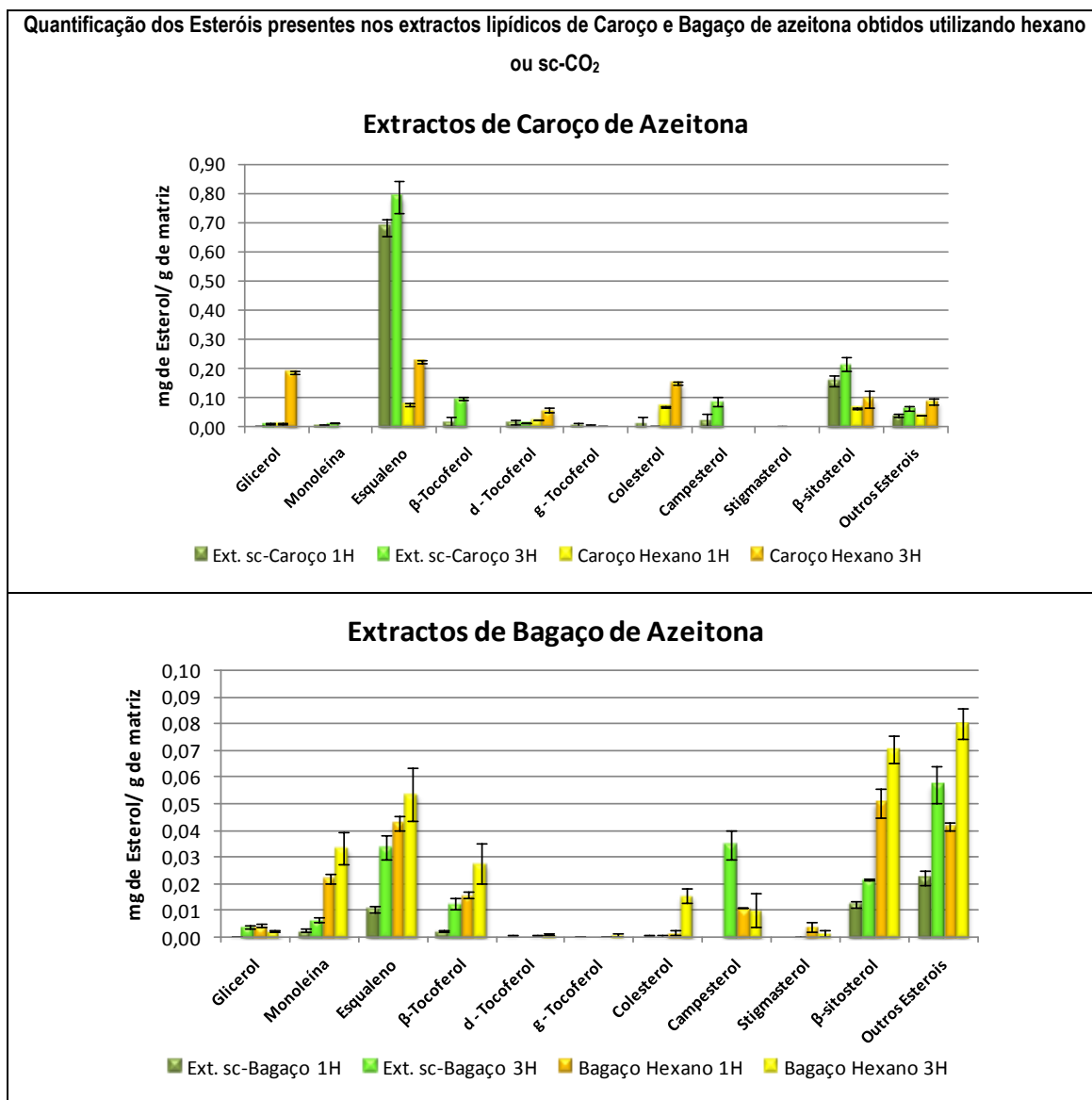


Figura A.37 - Estudo comparativo do perfil de esteróis (mg de esterol/g de matriz) presentes nos extractos lipídicos de Carço e Bagaço de Azeitona obtidos em soxhlet com hexano (Carço hexano 1H, Carço hexano 3H, Bagaço hexano 1H e Bagaço hexano 3H) e extractos lipídicos de Carço e Bagaço de Azeitona obtidos usando sc-CO₂ (Ext. SC Carço 1H, Ext. SC Carço 3H, Ext. SC Bagaço 1H e Ext. SC Bagaço 3H).

Tabela A.8 – Quantificação dos esteróis presentes nos extractos de bagaço de azeitona em miligramas de esterol existentes por gramas de extracto (mg de esterol/ g de extracto) e em miligramas de esterol por grama de matriz (Bagaço de Azeitona) (mg esterol/ g matriz) utilizando metodologias diferentes: a extracção em soxhlet com hexano durante 1 hora e 3 horas (Bagaço Hexano 1H e Bagaço Hexano 3H, respectivamente) e extracção com sc-CO₂ durante 1 hora e 3 horas (Ext. SC Bagaço 1H e Ext. SC Bagaço 3H, respectivamente)¹.

	Bagaço Hexano 1H		Bagaço Hexano 3H		Ext. sc-Bagaço 1H		Ext. sc-Bagaço 3H	
	mg de esterol/ g extracto	mg esterol/ g matriz	mg de esterol/ g extracto	mg esterol/ g matriz	mg de esterol/ g extracto	mg esterol/ g matriz	mg de esterol/ g extracto	mg esterol/ g matriz
Glicerol	0,396 ± 0,041	0,004 ± 0,000	0,215 ± 0,023	0,002 ± 0,000	0,108 ± 0,010	0,0004 ± 0,00004	0,474 ± 0,049	0,0039 ± 0,0004
Monoleína	1,949 ± 0,154	0,022 ± 0,002	2,900 ± 0,524	0,033 ± 0,006	0,686 ± 0,104	0,0027 ± 0,00040	0,788 ± 0,090	0,0065 ± 0,0008
Esqualeno	3,781 ± 0,242	0,043 ± 0,003	4,667 ± 0,876	0,054 ± 0,010	2,713 ± 0,338	0,0105 ± 0,00131	4,081 ± 0,530	0,0339 ± 0,0044
β-Tocoferol	1,402 ± 0,103	0,016 ± 0,001	2,404 ± 0,666	0,028 ± 0,008	0,649 ± 0,032	0,0025 ± 0,00012	1,502 ± 0,260	0,0125 ± 0,0022
δ - Tocoferol	0,063 ± 0,020	0,001 ± 0,000	0,094 ± 0,023	0,001 ± 0,000	0,143 ± 0,024	0,0006 ± 0,00009	nd ± -	nd ± -
γ - Tocoferol	0,044 ± 0,010	0,000 ± 0,000	0,098 ± 0,055	0,001 ± 0,001	0,051 ± 0,000	0,0002 ± 0,00000	nd ± -	nd ± -
Colesterol	0,162 ± 0,100	0,002 ± 0,001	1,369 ± 0,250	0,016 ± 0,003	0,147 ± 0,020	0,0006 ± 0,00025	0,070 ± 0,074	0,0006 ± 0,0006
Campesterol	0,978 ± 0,006	0,011 ± 0,000	0,890 ± 0,535	0,010 ± 0,006	nd ± -	nd ± -	4,193 ± 0,656	0,0348 ± 0,0054
Stigmasterol	0,363 ± 0,151	0,004 ± 0,002	0,143 ± 0,101	0,002 ± 0,001	nd ± -	nd ± -	0,035 ± 0,000	0,0003 ± 0,0003
β-sitosterol	4,475 ± 0,489	0,050 ± 0,006	6,127 ± 0,451	0,071 ± 0,005	3,237 ± 0,316	0,0125 ± 0,00122	2,610 ± 0,033	0,0217 ± 0,0003
Outros Esteróis	3,695 ± 0,148	0,042 ± 0,002	6,959 ± 0,505	0,080 ± 0,006	5,716 ± 0,677	0,0222 ± 0,00262	6,912 ± 0,811	0,0574 ± 0,0067

Tabela A.9 – Quantificação dos esteróis presentes nos extractos de Carço de azeitona em miligramas de esterol existentes por gramas de extracto (mg de esterol/ g de extracto) e em miligramas de esterol por grama de matriz (Carço de Azeitona) (mg esterol/ g matriz) utilizando metodologias diferentes: a extracção em soxhlet com hexano durante 1 hora e 3 horas (Carço Hexano 1H e Carço Hexano 3H, respectivamente) e extracção com sc-CO₂ durante 1 hora e 3 horas (Ext. SC Carço 1H e Ext. SC Carço 3H, respectivamente)¹.

	Carço Hexano 1H		Carço Hexano 3H		Ext. sc-Carço 1H		Ext. sc-Carço 3H	
	mg de esterol/ g extracto	mg esterol/ g matriz	mg de esterol/ g extracto	mg esterol/ g matriz	mg de esterol/ g extracto	mg esterol/ g matriz	mg de esterol/ g extracto	mg esterol/ g matriz
Glicerol	0,124 ± 0,005	0,012 ± 0,001	1,838 ± 0,044	0,188 ± 0,004	0,077 ± 0,004	0,005 ± 0,000	0,132 ± 0,007	0,011 ± 0,001
Monoleína	nd ± -	nd ± -	nd ± -	nd ± -	0,107 ± 0,037	0,007 ± 0,003	0,170 ± 0,006	0,015 ± 0,001
Esqualeno	0,803 ± 0,036	0,078 ± 0,003	2,182 ± 0,073	0,224 ± 0,008	9,927 ± 0,422	0,685 ± 0,029	9,214 ± 0,618	0,788 ± 0,053
β-Tocoferol	nd ± -	nd ± -	nd ± -	nd ± -	0,265 ± 0,216	0,018 ± 0,015	1,135 ± 0,054	0,097 ± 0,005
d - Tocoferol	0,256 ± 0,025	0,025 ± 0,002	0,562 ± 0,083	0,058 ± 0,008	0,252 ± 0,114	0,017 ± 0,008	0,194 ± 0,000	0,017 ± 0,000
g - Tocoferol	0,059 ± 0,005	0,006 ± 0,000	nd ± -	nd ± -	0,098 ± 0,125	0,007 ± 0,009	0,064 ± 0,029	0,005 ± 0,002
Colesterol	0,727 ± 0,018	0,070 ± 0,002	1,474 ± 0,048	0,151 ± 0,005	0,193 ± 0,290	0,013 ± 0,020	0,040 ± 0,013	0,003 ± 0,001
Campesterol	nd ± -	nd ± -	nd ± -	nd ± -	0,383 ± 0,308	0,026 ± 0,021	1,006 ± 0,189	0,086 ± 0,016
Stigmasterol	nd ± -	nd ± -	nd ± -	nd ± -	nd ± -	nd ± -	0,034 ± 0,023	0,003 ± 0,002
β-sitosterol	0,661 ± 0,005	0,064 ± 0,000	0,934 ± 0,291	0,096 ± 0,030	0,726 ± 0,284	0,160 ± 0,020	2,516 ± 0,274	0,215 ± 0,023
Outros Esteróis	0,406 ± 0,010	0,039 ± 0,001	0,842 ± 0,083	0,088 ± 0,009	1,048 ± 0,778	0,040 ± 0,005	8,615 ± 0,135	0,064 ± 0,009

¹ nd – significa que o esterol não foi detectado.

Anexo 14 - Rendimentos Obtidos Para o Processo Global de Extração do Refugo de Cereja

Tabela A. 10 – Rendimentos em % (g extracto/ g de matéria no extractor) obtidos para a extração supercrítica da cereja e dos extractos de cereja (segundo passo do processo global de extração) obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente).

		Rendimentos da extração supercrítica %(g de extracto/ g matéria no extractor)		
Cereja	Fracção 1	0,1892	±	0,044
	Fracção 2	0,5703	±	0,104
	Fracção 3	-	±	-
EtOH:H ₂ O (50:50)	Fracção 1	0,3432	±	0,077
	Fracção 2	0,2655	±	0,067
	Fracção 3	0,1795	±	0,110
100% EtOH	Fracção 1	0,0525	±	0,016
	Fracção 2	0,3680	±	0,046
	Fracção 3	0,1342	±	0,002
100% MetOH	Fracção 1	0,0695	±	0,001
	Fracção 2	0,1954	±	0,061
	Fracção 3	0,0058	±	0,003

Tabela A. 11 - Rendimentos em % (g extracto/ g de cereja) obtidos para o processo global de extração da cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente).

		Rendimentos global do processo de extração %(g extracto/ g de cereja)		
Cereja	Fracção 1	0,1892	±	0,044
	Fracção 2	0,5703	±	0,104
	Fracção 3	-	±	0,000
EtOH:H ₂ O (50:50)	Fracção 1	0,1498	±	0,051
	Fracção 2	0,1301	±	0,085
	Fracção 3	0,0913	±	0,039
100% EtOH	Fracção 1	0,0249	±	0,007
	Fracção 2	0,1747	±	0,022
	Fracção 3	0,0637	±	0,001
100% MetOH	Fracção 1	0,0370	±	0,001
	Fracção 2	0,1033	±	0,028
	Fracção 3	0,0031	±	0,002

Anexo 15 - Espectros de HPLC-DAD a dos Extractos convencionais e Supercríticos de Cereja Saco

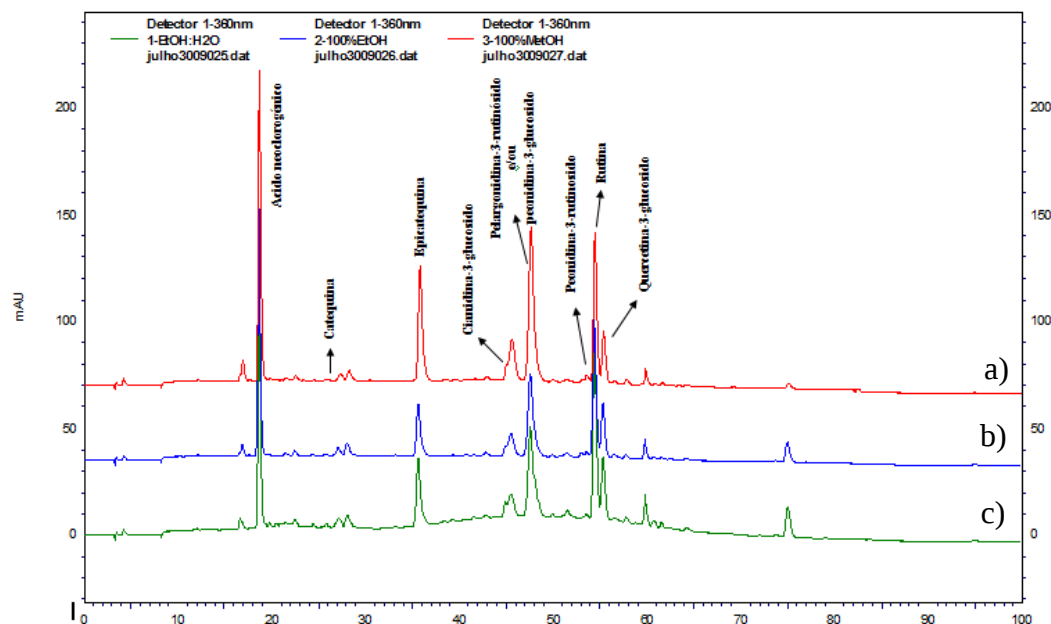


Figura A.38 - Perfis cromatográficos determinado por HPLC-DAD no c.d.o 360nm do extracto de cereja saco EtOH:água 50:50 (v/v)(c), extracto de cereja saco 100% EtOH (b) e extracto de cereja 100% MetOH (a)).

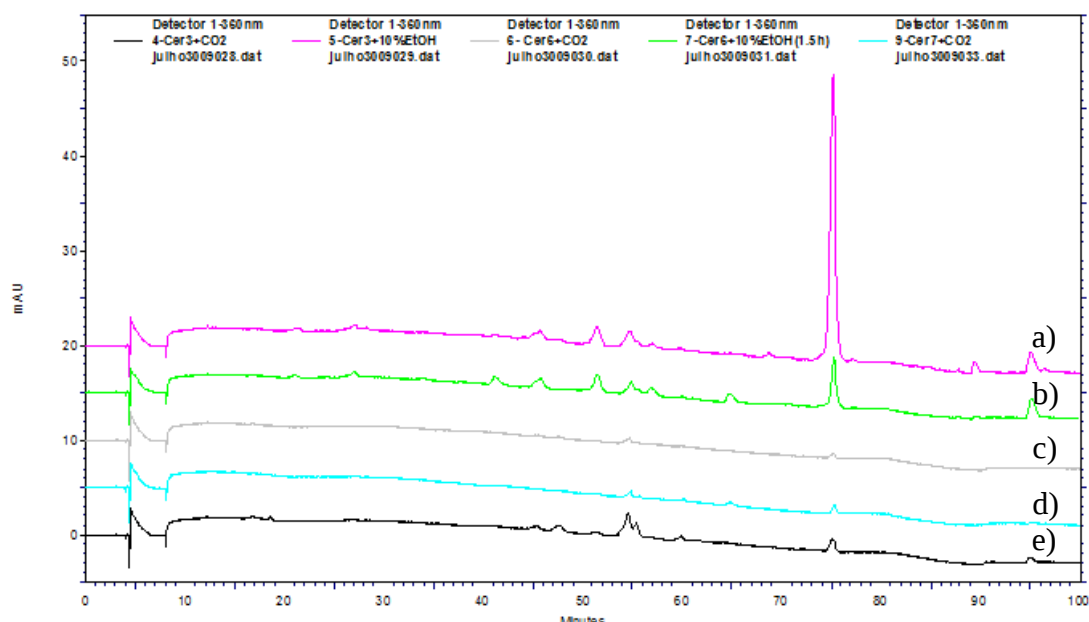


Figura A.39- Perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD no c.d.o 360nm dos extractos supercríticos: extracção da cereja com sc-CO₂ durante 1 hora – Fracção 1 (e), extracção da cereja com sc-CO₂ + 10% etanol durante 1,5 horas – Fracção 2 (a), extracção do extracto EtOH:H₂O 50:50 (v/v) com sc-CO₂ durante 1 hora –Fracção 1 (c), extracção do extracto EtOH:H₂O 50:50 (v/v) com sc-CO₂ durante 1,5 horas – Fracção 2 (b), extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO₂ durante 1 hora – Fracção 1 (d)).

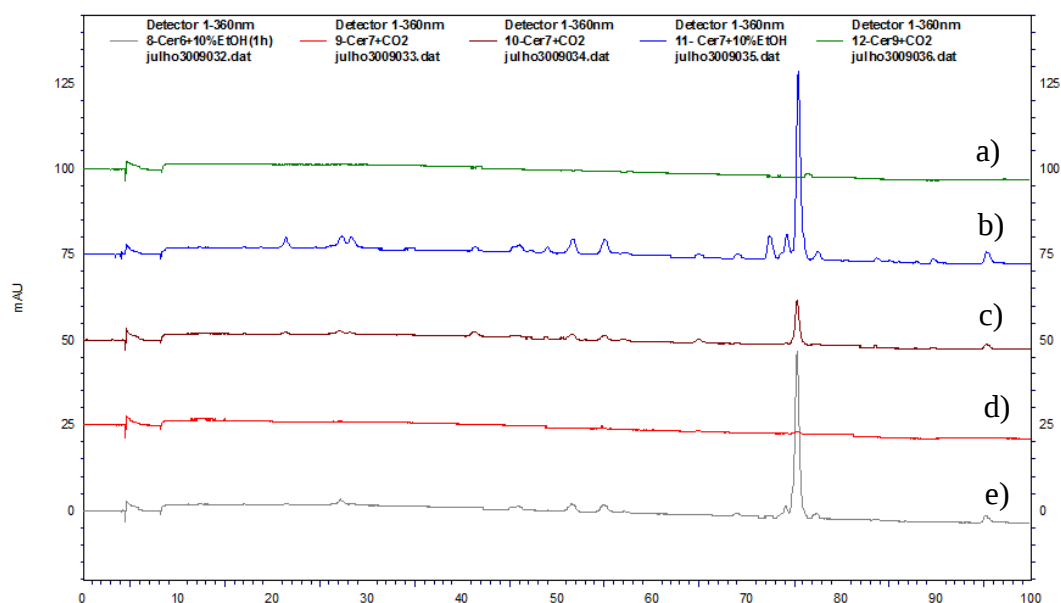


Figura A.40 - Perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD no c.d.o 360nm dos extractos supercríticos: extracção do extracto EtOH:H₂O 50:50 (v/v) com sc-CO₂ durante 1 horas – Fracção 3 (e)), extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO₂ durante 1 hora – Fracção 1 (d)), extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO₂ + 10%EtOH durante 1,5 horas – Fracção 2 (c)), extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO₂ + 10%EtOH durante 1 hora – Fracção 3 (b)), extracção do extracto 100% MetOH com sc-CO₂ durante 1 hora – Fracção 1 (a)).

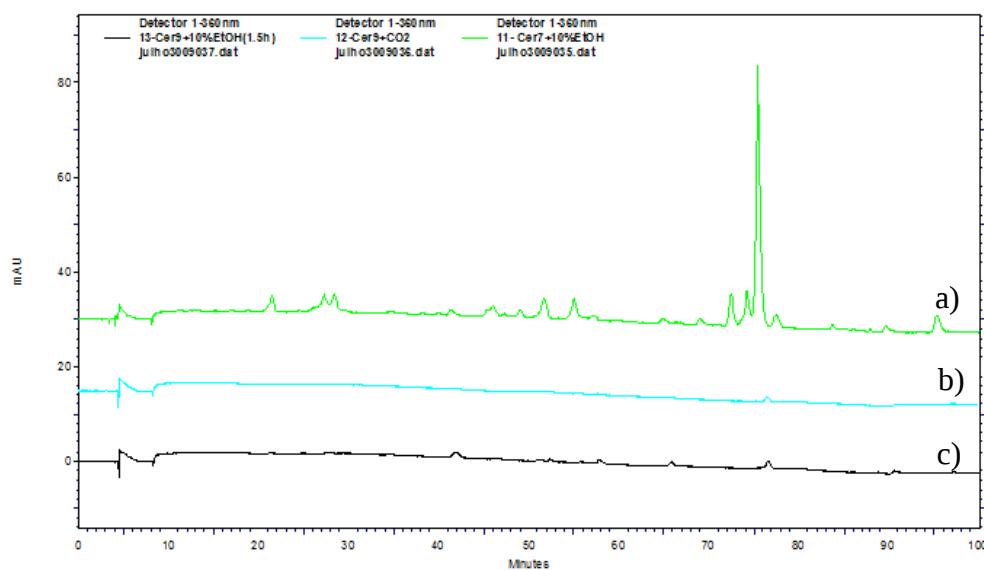


Figura A.41 – Perfis cromatográficos determinados por HPLC-DAD no c.d.o 360nm dos extractos supercríticos: extracção do extracto 100% EtOH com sc-CO₂ + 10%EtOH durante 1,5 horas – Fracção 2 (a)), extracção do extracto 100% MetOH com sc-CO₂ + 10%EtOH durante 1,5 horas – Fracção 2 (b)), extracção do extracto 100% MetOH com sc-CO₂ durante 1 hora – Fracção 3 (c)).

Anexo 16 - Quantificação dos Polifenóis Totais dos Extractos de Cereja Recorrendo a Cromatografia Líquida: HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

Tabela A. 12 - Polifenóis totais extraídos para o processo global de extração da cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente) em mg de EAG/ g extracto.

	mg EAG/g extracto	
	Fracção 1	
Cereja	Fracção 1	0,17
	Fracção 2	1,88
	Fracção 3	-
EtOH:H ₂ O (50:50)	Fracção 1	0,07
	Fracção 2	0,94
	Fracção 3	4,10
100% EtOH	Fracção 1	0,20
	Fracção 2	1,07
	Fracção 3	3,81
100% MetOH	Fracção 1	0,10
	Fracção 2	0,47
	Fracção 3	nd

Tabela A. 13 - Polifenóis totais extraídos para o processo global de extração da cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente) em mg de EAG/ g cereja.

	mg EAG/g cereja	
	Fracção 1	
Cereja	Fracção 1	0,00040
	Fracção 2	0,00876
	Fracção 3	-
EtOH:H ₂ O (50:50)	Fracção 1	0,00031
	Fracção 2	0,00154
	Fracção 3	0,00336
100% EtOH	Fracção 1	0,00015
	Fracção 2	0,00066
	Fracção 3	0,00389
100% MetOH	Fracção 1	0,00004
	Fracção 2	0,00044
	Fracção 3	nd

Anexo 17 - Avaliação da Capacidade Antioxidante dos Extractos Supercríticos de Cereja – Método de ORAC e Método de HORAC

Tabela A. 14 - Capacidade Antioxidante (μmol de CAET/ g de matriz) dos extractos supercríticos de cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente), nomeadamente o capacidade de resgate do radical peróxido determinada pelo método de ORAC.

	μmol CAET/ g matriz			
	Fracção 1		±	
Cereja	Fracção 1	0,064	±	0,01
	Fracção 2	0,233	±	0,03
	Fracção 3	-	±	0,00
EtOH:H ₂ O (50:50)	Fracção 1	0,053	±	0,02
	Fracção 2	0,104	±	0,04
	Fracção 3	0,151	±	0,02
100% EtOH	Fracção 1	0,013	±	0,00
	Fracção 2	0,117	±	0,00
	Fracção 3	0,164	±	0,01
100% MetOH	Fracção 1	0,012	±	0,00
	Fracção 2	0,062	±	0,01
	Fracção 3	0,014	±	0,02

Tabela A. 15 - Capacidade Antioxidante (μmol de CAET/ g de extracto) dos extractos supercríticos de cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente), nomeadamente o capacidade de resgate do radical peróxido determinada pelo método de ORAC.

	μmol CAET/ g extracto			
	Fracção 1		±	
Cereja	Fracção 1	26,989	±	2,13
	Fracção 2	50,907	±	5,48
	Fracção 3	-	±	-
EtOH:H ₂ O (50:50)	Fracção 1	12,265	±	4,22
	Fracção 2	41,436	±	7,60
	Fracção 3	199,015	±	27,24
100% EtOH	Fracção 1	64,561	±	3,85
	Fracção 2	74,355	±	1,39
	Fracção 3	256,891	±	13,22
100% MetOH	Fracção 1	29,126	±	7,82
	Fracção 2	66,652	±	12,99
	Fracção 3	269,515	±	3,88

Tabela A.16 - Capacidade Antioxidante (μmol de CAEAC/ g de matriz) dos extractos supercríticos de cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente), nomeadamente o capacidade de resgate do radical hidroxilo determinada pelo método de HORAC.

	μmol CAEAC/ g matriz			
	Fracção 1		$\pm$	
Cereja	Fracção 1	6,036	$\pm$	0,343
	Fracção 2	12,008	$\pm$	0,700
	Fracção 3	-	$\pm$	-
EtOH:H ₂ O (50:50)	Fracção 1	10,337	$\pm$	1,136
	Fracção 2	3,787	$\pm$	0,053
	Fracção 3	4,795	$\pm$	0,081
100% EtOH	Fracção 1	1,254	$\pm$	0,013
	Fracção 2	5,884	$\pm$	0,668
	Fracção 3	2,754	$\pm$	0,563
100% MetOH	Fracção 1	1,748	$\pm$	0,046
	Fracção 2	2,460	$\pm$	0,187
	Fracção 3	0,689	$\pm$	0,024

Tabela A.17 -Capacidade Antioxidante (μmol de CAEAC/ g de extracto) dos extractos supercríticos de cereja e dos extractos de cereja obtidos utilizando etanol:água na proporção 50:50(v/v), etanol e metanol (EtOH:H₂O (50:50), 100%EtOH e 100%MetOH, respectivamente), nomeadamente o capacidade de resgate do radical hidroxilo determinada pelo método de HORAC.

	μmol CAEAC/ g extracto			
	Fracção 1		$\pm$	
Cereja	Fracção 1	2545,361	$\pm$	144,468
	Fracção 2	2625,302	$\pm$	152,967
	Fracção 3	-	$\pm$	-
EtOH:H ₂ O (50:50)	Fracção 1	2396,846	$\pm$	263,412
	Fracção 2	2318,708	$\pm$	32,231
	Fracção 3	6303,831	$\pm$	106,688
100% EtOH	Fracção 1	6458,665	$\pm$	65,839
	Fracção 2	3726,324	$\pm$	423,107
	Fracção 3	4315,030	$\pm$	882,722
100% MetOH	Fracção 1	4126,323	$\pm$	107,625
	Fracção 2	2632,198	$\pm$	200,099
	Fracção 3	13608,900	$\pm$	1153,233

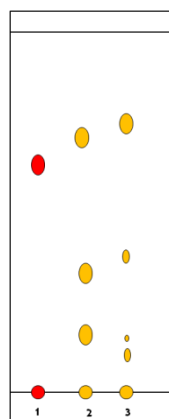
Anexo 18 - Identificação do Álcool Perilílico através de TLC

Figura A. 42 – Esquema do TLC para os extractos supercríticos de cereja onde: 1 – álcool perilílico (padrão), 2 – extracto de cereja obtido $sc\text{-CO}_2$ e 3 – extracto de cereja obtido após a extração com $sc\text{-CO}_2$ utilizando $sc\text{-CO}_2+10\%\text{EtOH}$.

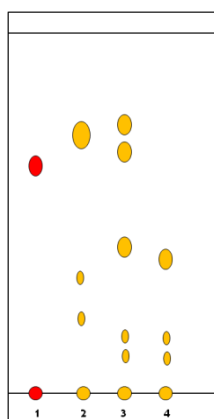


Figura A. 43 - Esquema do TLC para os extractos supercríticos do extracto de cereja $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ 50:50 onde: 1 – álcool perilílico (padrão), 2 – extracto obtido utilizando $sc\text{-CO}_2$, 3 – extracto obtido utilizando $\text{CO}_2+10\%\text{EtOH}$ durante 1h30 e 4 – extracto obtido utilizando $\text{CO}_2+10\%\text{EtOH}$ após extração durante mais 1h.

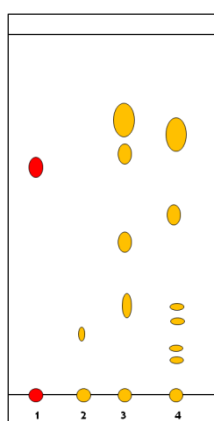


Figura A. 44 - Esquema do TLC para os extractos supercríticos do extracto de cereja 100%EtOH onde: 1 – álcool perilílico (padrão), 2 – extracto obtido utilizando $sc\text{-CO}_2$, 3 – extracto obtido utilizando $\text{CO}_2+10\%\text{EtOH}$ durante 1h30 e 4 – extracto obtido utilizando $\text{CO}_2+10\%\text{EtOH}$ após extração durante mais 1h.