

# **UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

## **Valorização Integrada de Resíduos e Subprodutos da Extração do Azeite: Extração e Caracterização de Compostos Bioativos do Bagaço de Azeitona**

**Romilson Fernando Brito**

Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Engenharia da Universidade do  
Algarve para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Faro

2016

# **UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

## **Valorização Integrada de Resíduos e Subprodutos da Extração do Azeite: Extração e Caracterização de Compostos Bioativos do Bagaço de Azeitona**

**Romilson Fernando Brito**

Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Engenharia da Universidade do  
Algarve para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientado por:

Professora Doutora Maria Margarida Cortês Vieira

Professor Doutor Rui Mariano Sousa da Cruz

Faro

2016

# **Valorização Integrada de Resíduos e Subprodutos da Extração do Azeite: Extração e Caracterização de Compostos Bioativos do Bagaço de Azeitona**

## **Declaração de autoria de trabalho**

“Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.”

---

(Romilson Fernando Brito)

©2016 Romilson Fernando Brito

“A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos, reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

## **Agradecimentos**

A realização deste trabalho nunca teria sido possível sem o apoio e contributo de várias pessoas, a quem eu gostaria de expressar o meu agradecimento.

Em primeiro lugar aos meus orientadores, Professora Doutora Maria Margarida Cortês Vieira e o Professor Doutor Rui Mariano Sousa da Cruz pela transmissão de conhecimentos, apoio, dedicação, respeito e compreensão que sempre demonstraram comigo.

Agradeço a todos os outros professores que tive ao longo do meu percurso académico que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação.

Quero agradecer do fundo do meu coração a Professora Doutora Patrícia de Jesus Palma por tudo o que fez por mim e por ter tido a oportunidade de receber os seus ensinamentos, é claramente uma excelente profissional, foi e será um grande exemplo para mim.

A todos os técnicos dos laboratórios, em especial a Vera Gonçalves e Clarisse Ramalho, pela dedicação, paciência, compreensão e disponibilidade que tiveram comigo sempre que eu precisei. Agradeço ainda a Dona Luísa Silva pela amizade e pelo carinho que sempre demonstrou comigo.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório: Eduardo Panguila, Mirien Sousa, Nívea Vieira, Margarida Castro, Vera Alves, Tânia Barros, Tânia Mateus, Marijana Fiket e a Tina Krištić por serem excelentes colegas de trabalho e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos meus amigos Andreia Marques, Jacinto Brito, Sérgio Soares, Tânia Andrade, Ilídio Costa, Mauro Pedro, Pedro Dias e Wilson Semedo por todo o apoio e por todos os momentos inesquecíveis que partilhamos ao longo de todos estes anos.

Aos meus colegas do Projeto Querença, João Ministro, Bruno Rodrigues e Sara Fernandes pelo apoio, motivação e força.

A toda a minha família, em especial aos meus pais, irmãs, irmãos e sobrinhos por todo o carinho e amor dado ao longo de todo o meu percurso académico.

Agradeço ainda a todos aqueles que sempre me apoiaram na escola e que se preocuparam comigo.

## Resumo

Os subprodutos da indústria oleica têm-se revelado como uma das mais promissoras fontes de compostos bioativos, apresentando elevada atividade antioxidante. Contudo, a sua valorização na criação de novos produtos e oportunidades não tem sido devidamente considerada.

Este trabalho consistiu em otimizar um método de extração dos compostos bioativos do bagaço de azeitona, a partir de processos emergentes, entre eles, o micro-ondas e os ultrassons. Foram testados tempos entre 10 a 30 segundos e 5 a 15 minutos para as extrações assistida por micro-ondas e ultrassons, respetivamente e combinações entre eles. A otimização foi efetuada tendo em consideração o teor de compostos fenólicos totais.

Comparativamente com os ultrassons, o micro-ondas foi o processo mais eficiente, obtendo-se um valor de compostos fenólicos totais de  $990,5 \pm 217,8$  mg EAG/100 g de bagaço seco para um tempo máximo de 30 s e na ausência de combinações.

Procedeu-se também ao aumento da escala de produção através de uma panela de evaporação a 100 °C durante 10 minutos, tendo sido determinado o conteúdo em compostos fenólicos totais ( $69 \pm 1,76$  mg/100 mL), flavonoides ( $11 \pm 0,22$  mg/100 mL) e a capacidade antioxidante ( $57,4 \pm 3,5$  mM/100 mL).

Paralelamente procedeu-se ao encapsulamento dos compostos bioativos extraídos através de um material encapsulante (maltodextrina). O material extratado foi ainda aproveitado para substituir parte de farinha de trigo no desenvolvimento de uma nova formulação de pães.

Este trabalho provou que a aplicação de micro-ondas é um método eficiente na extração dos compostos bioativos provenientes do bagaço de azeitona. Os compostos extraídos poderão ser encapsulados e utilizados em diversas aplicações na indústria com vista ao desenvolvimento de produtos de valor acrescentado.

### **Palavras-chave:**

Bagaço de Azeitona, Compostos Bioativos, Atividade Antioxidante, Micro-ondas, Ultrassons, Encapsulamento.

## Abstract

The by-products of the olive oil extraction industry have proved to be one of the most promising sources of bioactive compounds with high antioxidant activity. However, their valorization, by the development of new products and opportunities has not been properly considered.

The objective of this work was to optimize a method of extraction of bioactive compounds from olive pomace using emerging technologies, including microwave and ultrasound processes. Different times of processing for microwave and ultrasound, 10 to 30 s and 5 min to 15, respectively and also combinations of those treatments were tested.

The optimization was carried out taking into account the content of the total phenolic compounds. The microwave treatment, compared with ultrasound, was the most efficient process, showing values of  $990.51 \pm 217.77$  mg GAE / 100 g of dry pomace when a maximum time of 30 s was applied and in the absence of combinations.

A scale-up of the process was also run with an evaporation pan at 100 °C for 10 minutes, and the total phenolic content ( $1.76 \pm 69$  mg / 100 mL), flavonoids ( $11 \pm 0.22$  mg / 100 ml) and antioxidant activity ( $57.4 \pm 3.5$  mM / 100 ml) were determined.

In parallel, the extracted bioactive compounds were encapsulated with maltodextrin. The remaining material was further used to replace part of wheat flour in the development of a new formulation of bread rolls.

This work proved that the application of microwaves is an efficient method for the extraction of bioactive compounds from olive pomace. The extracted compounds may be encapsulated and used in various applications in the industry to develop products with added-value.

### Keywords:

Olive pomace, Bioactive Compounds, Antioxidant activity, Microwave, Ultrasound, Encapsulation.

## Lista De Abreviaturas

*a* – Parâmetro para cor verde ou vermelha.

Abs – Absorvância.

AG – Ácido gálico.

$a_w$  – Atividade da água.

*b* – Parâmetro para cor amarela ou azul.

BA – Bagaço de azeitona.

CAET– Capacidade antioxidante em equivalentes de trolox.

CA– Capacidade antioxidante.

CF – Compostos fenólicos.

DP – Desvio padrão.

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

EAG – Equivalentes em ácido gálico.

EAM – Extração assistida por micro-ondas.

EAU – Extração assistida por ultrassons.

ha – Hectares.

IP – Índice de peróxidos.

*L* – Parâmetro para luminosidade.

meq O<sub>2</sub>/kg – Miliequivalentes de oxigénio ativo por quilograma.

mg – Miligrama.

mL – Mililitro.

MO – Micro-ondas.

nm – Nanometro.

PA – Placa de aquecimento.

$R^2$  – Coeficiente de determinação.

rpm – Rotações por minuto.

TPA – Análise do perfil de textura.

US – Ultrassons.

$\lambda$  – Comprimento de onda.

% – Percentagem.

°C – Graus Celsius.

# Índice

1.	Introdução.....	1
1.1	Olivicultura e a Indústria de Extração do Azeite .....	1
1.1.1	Caracterização da Árvore .....	3
1.1.2	Caracterização do Fruto.....	4
1.1.3	Resíduos ou Subprodutos da Indústria do Azeite.....	6
1.1.4	Caracterização do Bagaço de Azeitona .....	7
1.1.5	Impacto Ambiental dos Resíduos da Indústria do Azeite .....	8
1.1.6	Valorização dos Resíduos ou Subprodutos da Indústria do Azeite.....	10
1.2	Compostos Bioativos .....	12
1.2.1	Conceitos e Funções .....	12
1.2.2	Atividade Antioxidante .....	12
1.2.3	Compostos Fenólicos.....	14
1.2.4	Compostos Fenólicos no Bagaço de Azeitona .....	17
1.3	Extração de Compostos Bioativos .....	19
1.3.1	Conceitos e Fundamentos.....	19
1.3.2	Processos Emergentes .....	20
1.4	Microencapsulação .....	27
1.4.1	Conceito de Microencapsulação.....	27
1.4.2	Técnicas de Microencapsulação .....	28
1.4.3	Materiais Encapsulantes .....	31
1.4.4	Encapsulamento de Compostos Bioativos.....	33
1.5	Objetivos.....	34
2.	Materiais e Métodos .....	35
2.1	Esquematização do Trabalho Laboratorial .....	35
2.2	Seleção da Matéria-prima .....	36
2.3	Caraterização da Matéria-prima.....	36

2.3.1	Limpeza do Bagaço de Azeitona.....	36
2.3.2	Secagem do Bagaço de Azeitona.....	36
2.3.3	Redução de Dimensões e Classificação Granulométrica .....	37
2.4	Caracterização Físico-química do Bagaço de Azeitona.....	37
2.4.1	Teor de Humidade .....	37
2.4.2	Índice de Peróxidos .....	38
2.4.3	Ácidos Gordos Totais .....	39
2.5	Extração dos Compostos Bioativos .....	40
2.5.1	Extração por Ultrassons.....	40
2.5.2	Extração por Micro-ondas .....	40
2.5.3	Processos Emergentes Combinados .....	41
2.5.4	Extração em Placa de Aquecimento .....	41
2.5.5	Extração em Escala Piloto .....	42
2.6	Caracterização dos Extratos.....	44
2.6.1	Conteúdo em Compostos Fenólicos Totais .....	44
2.6.2	Conteúdo em Flavonóides .....	45
2.6.3	Capacidade Antioxidante.....	46
2.7	Encapsulamento dos Compostos Bioativos.....	47
2.7.1	Preparação dos Extratos com Maltodextrina.....	47
2.7.2	Secagem por Atomização .....	48
2.8	Caracterização dos Encapsulados .....	48
2.8.1	Rendimento.....	48
2.8.2	Teor de Humidade .....	48
2.8.3	Atividade da Água ( $a_w$ ).....	49
2.8.4	Avaliação da Cor .....	49
2.8.5	Caraterização das Amostras Encapsuladas.....	49
2.8.5.1	Conteúdo em Compostos Fenólicos Totais .....	49

2.8.5.2	Conteúdo em Flavonóides .....	50
2.8.5.3	Capacidade Antioxidante .....	50
2.9	Aplicação do Bagaço de Azeitona Extratado na Produção de Pães .....	50
2.9.1	Seleção do Bagaço de Azeitona Extratado .....	50
2.9.2	Produção de Pães .....	51
2.9.3	Avaliação da Cor .....	52
2.9.4	Teor de Humidade .....	52
2.9.5	Atividade da Água ( $a_w$ ).....	52
2.9.6	Textura.....	52
2.9.7	Determinações Químicas .....	53
2.9.7.1	Conteúdo em Compostos Fenólicos Totais .....	53
2.9.7.2	Conteúdo em Flavonóides .....	53
2.9.7.3	Capacidade Antioxidante .....	53
2.10	Análise Estatística .....	54
3.	Resultados e Discussão.....	55
3.1	Seleção e Caracterização do Bagaço de Azeitona .....	55
3.1.1	Redução de Dimensões e Classificação Granulométrica .....	55
3.1.2	Teor de Humidade .....	56
3.1.3	Índice de Peróxidos .....	57
3.1.4	Ácidos Gordos Totais .....	57
3.2	Extração dos Compostos Bioativos .....	57
3.2.1	Extração por Técnicas Emergentes.....	57
3.2.2	Combinação das Técnicas Emergentes de Extração.....	59
3.2.3	Extração em Placa de Aquecimento .....	61
3.2.4	Extração em Escala Piloto .....	62
3.2.4.1	Conteúdo em Compostos Fenólicos .....	63
3.2.4.2	Conteúdo em Flavonóides .....	64

3.2.4.3	Capacidade Antioxidante .....	65
3.3	Extratos Encapsulados por Atomização com Maltodextrina .....	66
3.3.1	Rendimento.....	66
3.3.2	Teor de Humidade .....	67
3.3.3	Atividade da Água ( $a_w$ ).....	67
3.3.4	Avaliação da Cor .....	67
3.3.5	Conteúdo em Compostos Fenólicos Totais .....	69
3.3.6	Conteúdo em Flavonóides .....	70
3.3.7	Capacidade Antioxidante.....	71
3.4	Aplicação do Bagaço de Azeitona Extratado .....	72
3.4.1	Avaliação da Cor .....	72
3.4.2	Teor de Humidade .....	75
3.4.3	Atividade da Água .....	75
3.4.4	Análise do Perfil de Textura.....	75
3.4.5	Conteúdo em Compostos Fenólicos Totais .....	77
4.	Considerações Finais .....	79
5.	Perspetivas de Trabalho Futuro .....	80
6.	Referências Bibliográficas.....	81

## Índice De Figuras

<b>Figura 1.1:</b> Produção de azeite em Portugal (INE, 2014). .....	2
<b>Figura 1.2:</b> Exemplar de uma oliveira, ( <i>Olea europaea</i> L).....	4
<b>Figura 1.3:</b> Fruto da Oliveira (Azeitona).....	5
<b>Figura 1.4:</b> Classificação dos antioxidantes. Adaptado de Liu (2004).....	13
<b>Figura 1.5:</b> Principais classes de compostos fenólicos (Rasteiro, 2012).....	15
<b>Figura 1.6:</b> Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (1.6a) e hidroxicinâmicos (1.6b) (Ângelo & Jorge, 2007). .....	15
<b>Figura 1.7:</b> Estrutura química dos flavonoides (Ângelo & Jorge, 2007). .....	16
<b>Figura 1.8:</b> Espectro Eletromagnético. Adaptado de Silva (2012).....	21
<b>Figura 1.9:</b> Estrutura das micropartículas (Adaptado de Silva <i>et al.</i> , 2003). .....	27
<b>Figura 1.10:</b> Esquematização das principais etapas da microencapsulação por <i>spray drying</i> (Silva, 2012).....	30
<b>Figura 1.11:</b> Composição química da maltodextrina (Machado & Carvalho, 2015). ...	32
<b>Figura 2.1:</b> Esquematização do trabalho laboratorial.....	35
<b>Figura 2.2:</b> Esquematização da extração em escala piloto. ....	43
<b>Figura 2.3:</b> Curva de calibração do ácido gálico, utilizada para a determinação dos compostos fenólicos totais.....	45
<b>Figura 2.4:</b> Curva de calibração da quercetina, utilizada para a determinação dos flavonóides. ....	46
<b>Figura 2.5:</b> Curva de calibração de trolox, utilizada para a determinação da capacidade antioxidante. ....	47
<b>Figura 2.6:</b> Farinha de bagaço de azeitona utilizado na formulação dos pães. ....	51
<b>Figura 3.1:</b> Distribuição normal do tamanho médio das partículas. ....	55
<b>Figura 3.2:</b> Conteúdo em compostos fenólicos totais. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos ( $P < 0,05$ ).....	58
<b>Figura 3.3:</b> Efeito dos diferentes tratamentos nos compostos fenólicos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos ( $P < 0,05$ ).....	59
<b>Figura 3.4:</b> Comparação entre os métodos de extração.....	61
<b>Figura 3.5:</b> Conteúdo em compostos fenólicos totais dos extratos das diferentes extrações. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre extrações ( $P < 0,05$ ). .....	63

<b>Figura 3.6:</b> Conteúdo em flavonóides dos extratos das diferentes extrações. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre extrações (P<0,05). .....	64
<b>Figura 3.7:</b> Capacidade antioxidante dos extratos das diferentes extrações. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre extrações (P<0,05). .....	65
<b>Figura 3.8:</b> Rendimento da secagem por <i>spray dryer</i> . .....	66
<b>Figura 3.9:</b> Parâmetro <i>L, a e b</i> da cor dos encapsulados. ....	68
<b>Figura 3.10:</b> Conteúdo em compostos fenólicos totais dos encapsulados das diferentes extrações. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre extrações (P<0,05). .....	69
<b>Figura 3.11:</b> Conteúdo em flavonóides dos encapsulados das diferentes extrações. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre extrações (P<0,05).....	70
<b>Figura 3.12:</b> Capacidade antioxidante dos encapsulados das diferentes extrações. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre extrações (P<0,05). .....	71
<b>Figura 3.13:</b> Etapas da produção dos pães. ....	72
<b>Figura 3.14:</b> Representação dos pães cozidos e corte transversal. ....	73
<b>Figura 3.15:</b> Parâmetro <i>L, a e b</i> da cor na superfície dos pães. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os pães (P<0,05).....	73
<b>Figura 3.16:</b> Parâmetro <i>L, a e b</i> da cor do interior dos pães. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os pães (P<0,05).....	74
<b>Figura 3.17:</b> Conteúdo em compostos fenólicos totais dos pães. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os pães (P<0,05).....	77

## Índice De Tabelas

<b>Tabela 1.1:</b> Principais Países produtores de azeite (COI, 2014). .....	1
<b>Tabela 1.2:</b> Produção de azeite na EU (COI, 2014). .....	2
<b>Tabela 1.3:</b> Produção de azeitona para azeite por região (INE, 2014). .....	3
<b>Tabela 1.4:</b> Produção de azeitona de mesa por região (INE 2014). .....	3
<b>Tabela 1.5:</b> Quantidades de resíduos produzidos durante a extração do azeite (Sempiterno & Fernandes, 2014).....	6
<b>Tabela 1.6:</b> Composição média do bagaço de azeitona por método de extração e do bagaço extratado (Ferraz, 2012). .....	7
<b>Tabela 1.7:</b> Técnicas de microencapsulação (Sanguansri <i>et al.</i> , 2010).....	29
<b>Tabela 1.8:</b> Exemplos de matrizes de encapsulamento (adaptado de Ribeiro, 2007). ..	31
<b>Tabela 2.1:</b> Combinações dos métodos. ....	41
<b>Tabela 2.2:</b> Extrações na placa de aquecimento. ....	42
<b>Tabela 2.3:</b> Receitas da confeção dos pães.....	51
<b>Tabela 3.1:</b> Diâmetro das partículas. ....	56
<b>Tabela 3.2:</b> Análise do perfil de textura dos pães.....	76

# 1. Introdução

## 1.1 Olivicultura e a Indústria de Extração do Azeite

A prática de extrair o azeite das azeitonas vem ganhando força desde os tempos remotos. Esta atividade está fortemente representada pelos países do Mediterrâneo que dominam a produção mundial com cerca de 95% da produção oleícola. Isto deve-se ao facto desta zona ter condições climáticas propícias, tais como horas de sol e clima seco para o cultivo das oliveiras (COI, 2014).

Os países da União Europeia são responsáveis por 71,7% da produção mundial (Tabela 1.1). A Espanha, é o maior produtor, representa 61,6% da produção Europeia. Itália e Grécia posicionam-se, como 2.º (21,1%) e 3.º (13,5%) no ranking de produtores (Tabela 1.2). Portugal situa-se, atualmente, na 4.ª posição do ranking Europeu e 8.ª no ranking mundial com 3,2% (COI, 2014).

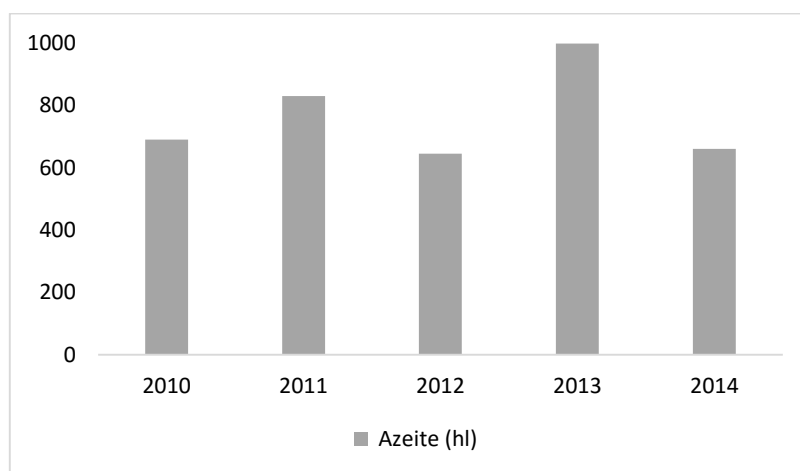
**Tabela 1.1:** Principais Países produtores de azeite (COI, 2014).

Países	% Média da produção entre: 2008/09 – 2013/2014
Albânia	0,3
Argélia	1,7
Argentina	0,8
Croácia	0,2
Egito	0,3
Irão	0,2
Israel	0,4
Jordânia	0,8
Líbano	0,6
Líbia	0,5
Marrocos	3,9
Síria	5,6
Tunísia	5,1
Turquia	5,7
UE	71,7

**Tabela 1.2:** Produção de azeite na EU (COI, 2014).

Países	% Média da produção entre: 2008/2009 – 2013/2014
Espanha	61,6
Itália	21,1
Grécia	13,5
Portugal	3,2
França	0,3
Chipre	0,2

A produção oleica em Portugal vem ganhando força a cada ano, sendo, atualmente, o quarto maior produtor a nível Europeu. Estima-se que, no presente, a área de produção seja cerca de 352 351 hectares, incluindo também o olival destinado à produção de azeitona de mesa (8794 ha) distribuídos pelas principais regiões olivícolas nacionais (Tabelas 1.3 e 1.4): Trás-os-Montes e Alto Douro, Beira Interior, Ribatejo e Alentejo (INE, 2014). No ano de 2014, a produção nacional de azeite registou uma considerável redução face à campanha anterior que alcançou os 999,9 mil hectolitros (Figura 1.1). As condições climáticas e fisiológicas são as principais razões para este decréscimo. As precipitações e as temperaturas elevadas de setembro e início de outubro conduziram a fortes ataques de agentes patogénicos (p.e fungo *Colletotrichum spp.*, causador da doença da gafa). Em muitos destes olivais, grande parte da produção acabou por diminuir drasticamente ou apresentou condições sanitárias incapazes de serem colhidas (INE, 2014).



**Figura 1.1:** Produção de azeite em Portugal (INE, 2014).

Segundo a estatística agrícola de 2014, o Alentejo foi a região que mais contribuiu com a produção de azeite (304 733 t) e azeitonas de mesa (8 704 t), a região Norte aparece logo a seguir com 87 804 e 7 849 t, respetivamente (Tabelas 1.3 e 1.4).

**Tabela 1.3:** Produção de azeitona para azeite por região (INE, 2014).

Região	Azeitona para Azeite		Azeite Produção (hl)
	Superfície (ha)	Produção (t)	
Continente	343 557	437 974	665 325
Norte	77 309	87 804	140 326
Centro	79 668	43 205	66 042
Área Metropolitana de Lisboa	596	148	82
Alentejo	177 404	304 733	456 055
Algarve	8 580	2 084	2 820

É de realçar que cerca de 96% da produção de azeitona em Portugal tem como destino final a sua transformação em azeite, sendo que apenas 4% é destinado à produção de azeitona de mesa. Esta última é produzida, principalmente, na Região do Alentejo e de Trás-os-Montes (INE, 2014).

**Tabela 1.4:** Produção de azeitona de mesa por região (INE 2014).

Região	Azeitona de Mesa	
	Superfície (ha)	Produção (t)
Continente	8 794	17 399
Norte	3 744	7 849
Centro	1 534	748
Área Metropolitana de Lisboa	26	13
Alentejo	3 254	8 704
Algarve	236	85

### 1.1.1 Caracterização da Árvore

A oliveira, *Olea europaea* L. (Figura 1.2), pertence à família botânica das *Oleaceae* e é considerada uma das árvores mais importantes dos países do mediterrâneo. O género *Olea* é composto por mais de 30 espécies diferentes, repartidas pelos cinco continentes. Distingue-se das outras espécies frutíferas pela sua longevidade, existindo exemplares

centenários e milenares, sendo considerada um símbolo de paz, de sabedoria e de glória (Alarcão, 1995).



**Figura 1.2:** Exemplar de uma oliveira, (*Olea europaea* L).

A sua origem está intimamente associada às diferentes civilizações que se desenvolveram na orla mediterrânica e cruza-se com as aventuras dos descobrimentos, as conquistas constantes e alternadas ou com os intercâmbios mercantis destes povos. Admite-se que a sua origem tenha sido na Síria ou talvez na Ásia Menor. No entanto, foi com as invasões romanas que esta cultura teve a sua maior difusão (Alarcão, 1995).

Em Portugal, a oliveira encontra-se dispersa por todo o país, sendo em Trás-os-Montes, Beira Interior, Alentejo, Ribatejo e Oeste os locais de maior predomínio (Monteiro, 1999).

Trata-se de uma das árvores cultivadas mais antigas do mundo, possuindo um elevado interesse tanto económico como ambiental. O seu maior potencial reside na importância dos seus frutos (azeitonas), quer pela produção de azeite quer pela produção de azeitona de conserva (Guinda, 2006).

### **1.1.2 Caracterização do Fruto**

O fruto da oliveira (Figura 1.3) é uma drupa de mesocarpo carnudo rica em lípidos. É constituído ainda por um endocarpo ou caroço duro estriado, mais ou menos pontiagudo, geralmente ovoide, mas também com formas obovoides, esferoidais, elipsoidais ou alongadas e, o seu tamanho varia muito, de pequeno (até 1,9 g) a muito

grande (> 8 g), com rendimentos em azeite de 14 a 28% e períodos de maturação entre 25 a 50 dias (Monteiro, 1999).

A colheita do fruto decorre a partir de setembro até ao início do Inverno, e a sua maturação varia de forma dependente tanto do cultivo, como das características desejadas para o produto final. A azeitona pode apresentar colorações distintas, variando desde o verde ao negro-púrpura (Galanakis, 2011).



**Figura 1.3:** Fruto da Oliveira (Azeitona).

Segundo Monteiro (1999), a polpa na altura da maturação representa 65 a 90% do peso total, a pelicula 1 a 2%, o caroço 10 a 30% e a semente apenas 2 a 5%, dependendo da variedade, estado de maturação, técnicas de cultivo e condições climáticas. Por sua vez, a polpa é formada por: água (70 a 75% do seu peso total), matérias gordas (15 a 30% do peso do fruto), açúcares simples (importantes para os processos de fermentação das azeitonas de mesa), outros hidratos de carbono (polissacáridos 3 a 6%), proteínas (1 a 3% da polpa e em que a arginina é o aminoácido mais importante), pectinas, ácidos orgânicos (cítrico, málico e oxálico), taninos (1,5 a 2% do peso da polpa e são responsáveis pela adstringência a acidez elevada nas azeitonas), oleuropeína, substâncias corantes (p.e. as antocianinas desempenham um papel primordial quando a azeitona se destina a ser transformada em negra) e sais minerais (potássio, cálcio, fósforo, magnésio, enxofre, cloro, ferro, cobre e manganésio).

### 1.1.3 Resíduos ou Subprodutos da Indústria do Azeite

As indústrias de extração do azeite fornecem grande quantidade de biomassa, quer através do material de poda quer através da laboração da azeitona nos lagares (Monteiro, 1999).

Segundo o Regulamento CE 1234/2007, os subprodutos da produção de azeite estão classificados de acordo com o modo de extração utilizado. Os lagares que laboram com o sistema de prensa hidráulica e o sistema de extração de três fases geram para além do azeite (20%), mais dois tipos de resíduos, sendo um deles um líquido com uma tonalidade escura e com um cheiro desagradável denominado águas ruças (50%) e o outro um sólido constituído por uma mistura de caroços, peles e celulose, denominado bagaço de azeitona (30%). Por sua vez, o sistema de extração de duas fases gera, para além do azeite (20%), um único resíduo, o bagaço de azeitona húmido (80%).

Em média, por cada 100 kg de azeitona são produzidos cerca de 20 kg de azeite, e em termos médios, um quilograma de bagaço extratado tem 400 gramas de polpa e 600 gramas de caroço. Estas percentagens variam consoante os sistemas de extração (prensas, centrifugação de três e duas fases), variedade da azeitona e as condições edafo-climáticas (Freitas, 2007).

Na tabela 1.5 estão quantificados as produções de resíduos da indústria oleícola para uma tonelada de azeitona, utilizando as diferentes técnicas de extração do azeite (Sempiterno & Fernandes, 2014).

**Tabela 1.5:** Quantidades de resíduos produzidos durante a extração do azeite (Sempiterno & Fernandes, 2014).

Sistemas de Extração	Bagaço Azeitona (kg)	Águas Ruças (m <sup>3</sup> )
Prensas	400	0,60
Contínuos de 2 fases	800 - 950	0,12
Contínuos de 3 fases	500 - 600	1,0 – 1,2

Atualmente, mais de 60% dos lagares obtêm o azeite pelo sistema de extração de duas fases, levando assim, a uma redução considerável do volume de águas ruças. Este facto leva a uma grande redução do impacto ambiental (Costa *et al.*, 2002).

### 1.1.4 Caracterização do Bagaço de Azeitona

O bagaço de azeitona, como referido anteriormente é um subproduto obtido durante a extração do azeite. Compreende a água de constituição da azeitona, a água de adição e lavagem e uma percentagem variável de produto sólido (30 a 35% de película e polpa e 30 a 35% de pedaços de caroço). A quantidade de água presente neste subproduto depende muito dos sistemas de extração utilizados. O bagaço resultante do sistema tradicional têm cerca de 35% de humidade, enquanto que, nos sistemas de centrifugação de três e duas fases o teor de humidade é de 60% e 40-50% respetivamente (Costa *et al.*, 2002).

Na tabela 1.6 estão apresentadas as características dos diferentes tipos de bagaço consoante o processo de extração utilizado bem como do bagaço extratado (Ferraz, 2012).

**Tabela 1.6:** Composição média do bagaço de azeitona por método de extração e do bagaço extratado (Ferraz, 2012).

Parâmetros	Prensas	Contínuos de 2 fases	Contínuos de 3 fases	Bagaço Extratado
Humidade (%)	35	75	65	10
Azeite Residual (%)	8	5	3	1
Matéria Mineral (%)	40	40	40	50
Poder Colorífico kcal/kg	<2000	<3000	<4000	<4200

O bagaço resultante poderá ainda ser reprocessado para remoção do óleo residual (8 a 10% dependendo do sistema de extração) que não é possível extrair por meios físicos. Se for submetida apenas a prensagem, o óleo obtido é denominado óleo de bagaço de azeitona; no caso de a extração realizar-se com solventes orgânicos (geralmente o hexano), designa-se por óleo de bagaço de azeitona refinado (Regulamento CE 1234/2007).

Este óleo para ser introduzido na alimentação humana como óleo de bagaço de azeitona, terá que sofrer uma refinação para eliminar alguns compostos indesejáveis, como

produtos primários e secundários de oxidação, pigmentos, ácidos gordos livres, resíduos de solventes, gomas e mucilagens (Proctor & Clark, 1993).

Dependendo do método de extração, o bagaço de azeitona poderá ter várias designações: Bagaço bruto ou virgem - resíduo da primeira extração do azeite, com teores elevados de água e de azeite; Bagaço extratado ou esgotado - resíduo obtido após a extração do azeite remanescente recorrendo a um solvente orgânico; Bagaço descarado - resulta da separação parcial do caroço da polpa, por depuração ou ventilação (Igor, 2004).

O bagaço de azeitona contém um elevado conteúdo orgânico e mineral. Com base no seu peso seco, contém cerca de 15% de gordura, 6% de proteínas, 16% de hidratos de carbono e 63% de fibras (Albuquerque *et al.*, 2004).

### **1.1.5 Impacto Ambiental dos Resíduos da Indústria do Azeite**

A olivicultura vem ganhando força desde os tempos remotos até aos dias de hoje. Há cada vez mais oliveiras a serem introduzidas no solo, estima-se que existam cerca de 750 milhões de oliveiras em todo o mundo (COI, 2014). Este facto deve-se ao reconhecimento do azeite como sendo um produto de extrema importância para a alimentação humana (elevado poder dietético e nutricional). Porém, a sua extração poderá estar associado a grandes problemas de contaminação ambiental devido às quantidades de resíduos produzidos (Oreopoulou *et al.*, 2007).

A extração do azeite pode originar grandes quantidades de resíduos sólidos e efluentes líquidos. A natureza dos resíduos ou a carga poluente depende muito da tecnologia empregue e do sistema de extração utilizado (Duarte *et al.*, 2011).

O sistema de 3 fases envolve a adição de grandes quantidades de água (cerca de 50 L/100 kg pasta de azeitona), resultando numa produção de águas ruças de cerca de 30 milhões m<sup>3</sup> só a nível europeu. Este facto levou à criação de legislação (Despacho 626 - Junho 2000) que obriga o tratamento deste tipo de resíduos antes da sua descarga nos meios hídricos ou nos solos (Duarte, 2011).

Entre os sistemas de extração do azeite, o sistema de centrifugação de duas fases posiciona-se como o mais ecológico, uma vez que gera um único resíduo, o bagaço de

azeitona húmido. O consumo de água durante o processo é reduzido, logo, os efluentes líquidos também serão reduzidos ou mesmo inexistentes (Duarte *et al.*, 2011). Este sistema de extração elimina praticamente a produção de águas ruças, mas conduz à produção de bagaços com uma maior quantidade de humidade e um grau mais elevado de toxicidade, não sendo, por isso, utilizados na obtenção de óleo de bagaço de azeitona (Monteiro, 1999).

Atualmente o bagaço é encaminhado para as indústrias de extração de óleo, com o intuito de extrair a pequena quantidade de óleo restante no resíduo (8-10% dependendo do sistema de extração). Este resíduo poderá ainda ser usado como combustível sólido no processo de obtenção de energia elétrica, devido ao seu alto poder calorífico. Para além destas valorizações, o bagaço de azeitona poderá ser utilizado como fertilizante (após o processo de compostagem) e ração na alimentação animal (Pagnanelli *et al.*, 2003). Com estas valorizações o bagaço não representa qualquer problema para a gestão lagareira. O mesmo não se passa com as águas ruças, que constituem um problema ambiental, sem soluções atuais de viabilidade técnico-económica (Monteiro, 1999). São inúmeras as tentativas para solucionar o problema, já são mais de 50 anos de investigação por parte dos países de maior produção, no entanto, tem havido pouco sucesso em encontrar uma alternativa ambientalmente amigável e economicamente viável para ser adotada (Oreopoulou *et al.*, 2007).

Embora as quantidades de efluentes (águas ruças) produzidas sejam muito menores do que os efluentes domésticos, isto porque a produção é sazonal, a sua contribuição na poluição ambiental é muito importante por causa de algumas peculiaridades como: cheiro forte; elevada carga orgânica, dificilmente degradável (valores de CQO – Carência Química de Oxigénio até 220 g/L); pH muito ácido (3 a 5,9); elevado teor em polifenóis totais (até 80 g/L) que não são facilmente biodegradáveis e são tóxicos para a maioria dos microrganismos; alto teor em sólidos (sólidos totais até 20 g/L) (Oreopoulou *et al.*, 2007).

Tendo em vista os efeitos da poluição e a toxicidade das águas ruças, 1 m<sup>3</sup> de águas ruças equivale a 100-200 m<sup>3</sup> de efluente doméstico. A deposição não controlada no meio ambiente desencadeia graves problemas para todo o ecossistema, (reservatórios de água subterrâneos, barragens, rios, etc.). O principal efeito da contaminação por parte deste efluente é a mudança de cor (escurecimento), resultado da oxidação e

consequentemente polimerização dos taninos. As águas ruças ainda contêm uma quantidade considerável de açúcares redutores (contribuem para o crescimento exponencial dos microrganismos) e um elevado teor em fósforo (aceleraram o crescimento das algas e consequente eutrofização do meio aquático). A elevada carga poluente poderá levar à morte ou contaminação dos organismos aquáticos (peixes crustáceos etc.) pela exposição ao meio contaminado (Fiorentino *et al.*, 2004).

A deposição das águas ruças no solo pode ser vista como: boa forma de enriquecimento dos campos de cultivo; fonte de matéria orgânica e nutrientes, em especial, fósforo, azoto e potássio; aumento da estabilidade da estrutura dos solos; fonte alternativa de água para rega. Porém, elevadas concentrações de nutrientes poderão causar danos nos solos e nas plantas (inibição no crescimento de culturas e germinações precoce de outros tipos de culturas); o baixo valor em pH originará solos ácidos; o elevado teor em polifenóis irá conferir características fitotóxicas e antimicrobianas que podem danificar as culturas existentes (Oreopoulou *et al.*, 2007).

A gestão dos resíduos nas indústrias de extração de azeite é ainda uma incógnita. A alta carga poluente e a toxicidade associada corresponde a um grande desafio. Podem constituir um grave problema ambiental, impondo assim um encargo económico significativo neste sector. Muitas estratégias tanto físicas, térmicas, físico-químicas e biológicas já foram propostas, porém, uma solução ecológica e economicamente viável ainda não foi apresentada (Duarte *et al.*, 2011). É neste sentido que tem surgido a cada ano diversos trabalhos de investigação com intuito de encontrar alternativas para reaproveitar, extrair, transformar e/ou eliminar estes tipos de resíduos, evitando assim o seu impacto no meio ambiente.

### **1.1.6 Valorização dos Resíduos ou Subprodutos da Indústria do Azeite**

Os subprodutos da extração do azeite têm nestes últimos anos merecido uma especial atenção. Todos os anos a indústria oleícola produz cerca de 4,6 milhões de toneladas de águas ruças e 7 milhões de toneladas de bagaços. Embora estes resíduos contenham compostos valorizáveis, tais como grandes quantidades de matéria orgânica e uma vasta gama de nutrientes recicláveis, o não tratamento constitui uma forma de poluição muito

grave dada a toxicidade dos seus componentes para as plantas, solo e água (Oreopoulou *et al.*, 2007).

A estratégia para uma correta gestão centra-se na prevenção evitando a geração de grandes volumes dos mesmos. Para conseguir, os esforços devem estar centrados no aperfeiçoamento das técnicas utilizadas, desenvolvimento de novas tecnologias de minimização e conseqüentemente aproveitamento no próprio processo produtivo. Depois de otimizar os processos e aplicar as estratégias de redução, deve-se potenciar a valorização dos volumes produzidos e, apenas em última instância, proceder à sua eliminação (VALUE 2012).

A melhor estratégia de gestão dos resíduos é a redução da sua produção. O uso alimentar (humano e na alimentação animal) surge como alternativa, seguido do aproveitamento industrial (p.e. valorização energética), e agrícola (compostagem). A última opção será sempre a deposição em aterros sanitários (VALUE, 2012).

Embora as vias tradicionais para a valorização dos resíduos sólidos obtidos na extração do azeite, seja a alimentação animal, a incineração e a compostagem, estas valorizações nem sempre demonstram eficiência e podem acarretar custos elevados para as empresas (Duarte *et al.*, 2007). Por estas razões, e atendendo às características específicas dos subprodutos da extração do azeite (presença de grandes quantidades de compostos fitoquímicos com atividade antioxidante), é cada vez mais importante o desenvolvimento de alternativas viáveis para a extração e valorização desses compostos.

## **1.2 Compostos Bioativos**

### **1.2.1 Conceitos e Funções**

A dieta habitual fornece, além dos macro e micronutrientes essenciais, alguns compostos químicos, presentes, em sua maioria, em frutas e hortaliças, que exercem uma potente atividade biológica, já comprovada por vários investigadores. Esses compostos são chamados de compostos bioativos e podem desempenhar diversos papéis em benefício da saúde humana (Carratù & Sanzini, 2005).

Segundo Silva *et al.* (2006), os compostos bioativos são considerados metabolitos secundários das plantas, que desempenham um papel importante na resistência às doenças, proteção contra pragas e disseminação de espécies. O interesse neles cresce a cada ano e está relacionado com sua atividade antioxidante e promoção dos benefícios para a saúde. Pertencem a um grupo complexo de produtos que ocorrem naturalmente nas plantas e estão presentes na dieta mediterrânica, que inclui azeitonas de mesa e azeite.

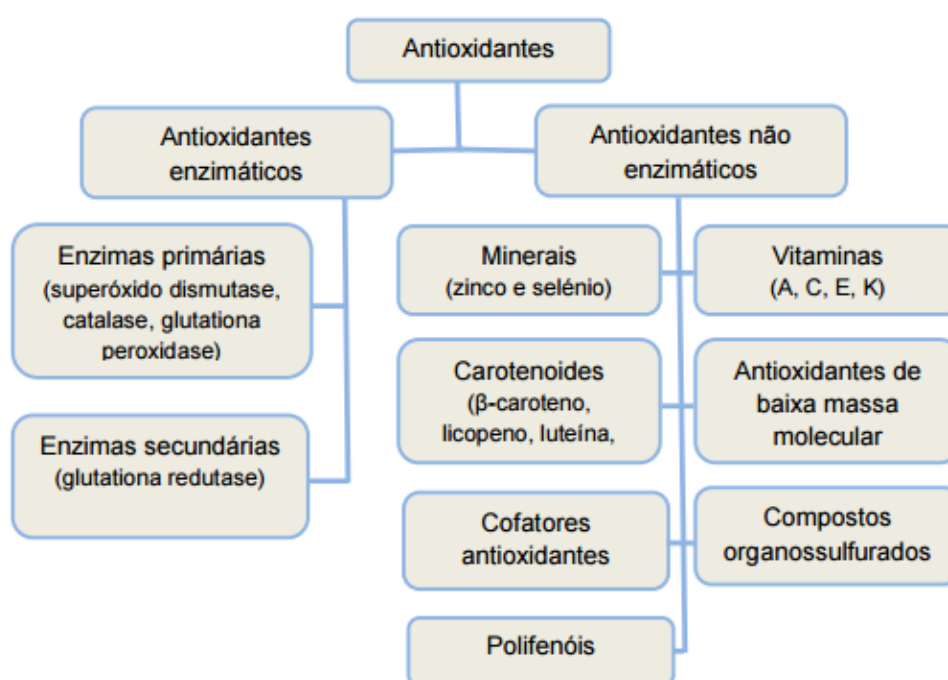
### **1.2.2 Atividade Antioxidante**

Segundo Halliwell (2001), os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que quando presentes nos alimentos a determinadas concentrações retardam ou inibem a oxidação de substratos oxidáveis, tais como, lípidos e proteínas.

A oxidação consiste num processo essencial aos organismos aeróbios e ao nosso metabolismo humano, sendo os radicais livres produzidos naturalmente, em consequência desse processo de oxidação ou de alguma disfunção biológica (Barreiros *et al.*, 2006).

Os antioxidantes desempenham um papel fundamental na defesa do organismo contra os radicais livres e espécies reativas de oxigénio, reduzindo assim, o risco de surgirem diversas doenças (problemas cardiovasculares, cancro e doenças neurodegenerativas) causadas pelos efeitos negativos dos radicais livres (Kaliora & Dedoussis, 2007).

Os antioxidantes podem ser classificados em dois grandes grupos: antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não enzimáticos (Figura 1.4). Os antioxidantes enzimáticos constituem o primeiro nível de defesa contra os radicais livres, ocorrem naturalmente no organismo, e não são obtidos através da alimentação (Halliwell, 2011). Estes antioxidantes incluem as enzimas primárias e secundárias, como o superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase e glutathione reductase. Vitaminas (A, C, E e K), minerais (zinco e selênio) e os compostos fenólicos constituem alguns dos exemplos de antioxidantes não enzimáticos (Liu, 2004; Ratnam *et al.*, 2006).



**Figura 1.4:** Classificação dos antioxidantes. Adaptado de Liu (2004).

As substâncias antioxidantes podem apresentar diferentes propriedades protetoras e agir em diversas etapas do processo oxidativo, funcionando por diferentes mecanismos e são, portanto, classificadas em duas categorias principais: antioxidantes primários e antioxidantes secundários. Os antioxidantes primários são compostos de ação antioxidante, capazes de inibir ou retardar a oxidação por inativação de radicais livres pela cedência de átomos de hidrogênio ou de elétrons, o que transforma os radicais em substâncias estáveis. Os antioxidantes secundários podem apresentar uma grande variedade de mecanismos de ação, como por exemplo, a ligação de íons metálicos (alteração de valência), a inativação das espécies reativas de oxigênio, a conversão de

hidroperóxidos em espécies não-radicalares ou a absorção de radiação ultravioleta (Silva *et al.*, 2010).

Os antioxidantes estão presentes em praticamente todas as plantas, microrganismos e tecidos animais. Aqueles que são obtidos de fontes alimentares são divididos em vários grupos. Outras classes de antioxidantes provenientes da alimentação englobam as vitaminas, carotenoides, compostos organossulfurados e os minerais. Os compostos fenólicos incluem os ácidos fenólicos, os taninos, os estilbenos, as cumarinas e os flavonoides (Ratnam *et al.*, 2006; Halliwell, 2011).

A oxidação lipídica é uma das principais causas de deterioração dos alimentos podendo ser prevenida pela adição de antioxidantes. O cheiro, o sabor a ranço e a diminuição da qualidade nutricional surgem como consequências da oxidação nos alimentos, devido à formação de compostos secundários potencialmente tóxicos (Silva *et al.*, 2010).

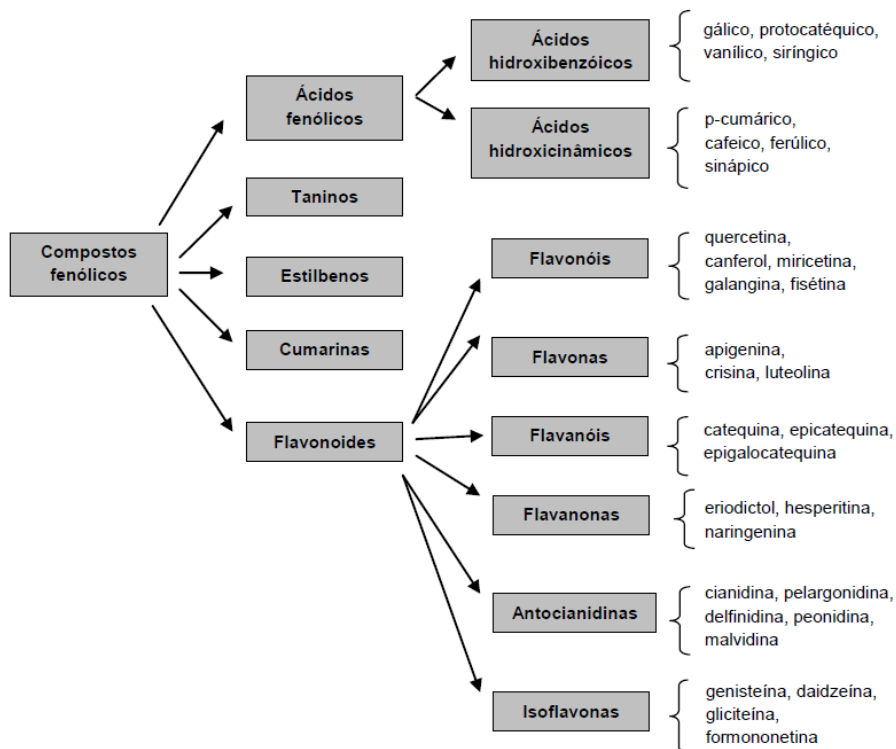
Em consequência da crescente preocupação com a saúde, a procura de produtos naturais por parte dos consumidores é cada vez mais frequente. Esta preocupação surge como resultado de uma maior percepção do ser humano acerca dos possíveis efeitos negativos da presença de aditivos sintéticos nos alimentos e traduz-se num aumento do consumo de alimentos ricos em compostos naturais com capacidade antioxidante (Blasa *et al.*, 2007; Javanmardi *et al.*, 2002).

Os subprodutos da indústria oleica têm revelado ser uma fonte promissora de compostos fenólicos, dada a sua forte atividade antioxidante (Blasa *et al.*, 2007; Javanmardi *et al.*, 2002). Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse em valorizar estes produtos, não só pelas razões ambientais, mas também, pelas características dietéticas e nutricionais. Neste contexto, têm sido desenvolvidos vários estudos no sentido de tentar compreender o papel do elevado número de compostos naturais presentes nestes subprodutos, no que se refere a efeitos e benéficos.

### **1.2.3 Compostos Fenólicos**

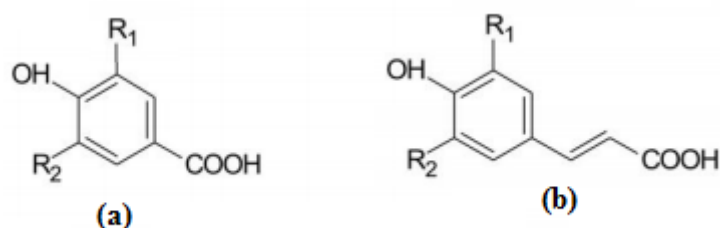
Liu (2004), refere os compostos fenólicos como substâncias que possuem anel aromático, com um ou mais substituintes hidroxilo, incluídos nos seus grupos

funcionais. Estes compostos são classificados em cinco classes (figura 1.5), das quais se destacam os flavonoides e os ácidos fenólicos (Liu, 2004).



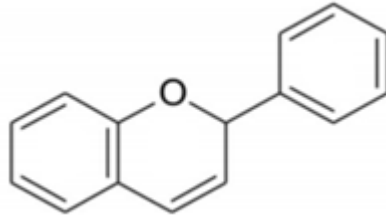
**Figura 1.5:** Principais classes de compostos fenólicos (Rasteiro, 2012).

Por sua vez, os ácidos fenólicos, dividem-se no grupo de compostos que derivam do ácido hidroxibenzoico (figura 1.6a), ou que derivam do ácido hidroxicinâmico (figura 1.6b) (Rasteiro, 2012).



**Figura 1.6:** Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoicos (1.6a) e hidroxicinâmicos (1.6b) (Ângelo & Jorge, 2007).

Os flavonoides (figura 1.7), por sua vez, podem ser divididos em três subclasses com estrutura semelhante: flavonóis, flavonas e flavanonas (Rasteiro, 2012).



**Figura 1.7:** Estrutura química dos flavonoides (Ângelo & Jorge, 2007).

Os compostos fenólicos são os antioxidantes mais abundantes na dieta humana, e o seu consumo diário pode atingir até 1 g, o que é superior ao consumo de todos os outros fitoquímicos com propriedades benéficas (Rockenbach, 2008).

Estudos epidemiológicos, que abordam principalmente uma dieta rica em alimentos de origem vegetal, apresentam resultados interessantes, sugerindo que esses alimentos são capazes de exercer influência na redução do risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, cancro e doenças neurodegenerativas (Carratù *et al.*, 2005).

Além disso, inibem a oxidação lipídica, a proliferação de fungos e participam nos processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma de vários alimentos (Soares, 2002).

Devido às diferentes aplicações e propriedades desses compostos, a competitividade entre a indústria alimentar, cosmética e farmacêutica por fontes ricas nestes compostos tem sido cada vez maior. Apesar de já serem conhecidas várias fontes de origem vegetal, os subprodutos agroindustriais têm recebido uma atenção especial dada a sua abundância em compostos fenólicos e o seu baixo custo de exploração (Ferreira *et al.*, 2015).

Os subprodutos da produção do vinho, azeite, alfarroba e maçã têm-se revelado como algumas das mais promissoras fontes de compostos fenólicos dada a forte atividade antioxidante de extratos obtidos a partir destes subprodutos. A alguns destes extratos já foram associadas atividades biológicas importantes, nomeadamente a ação anti-inflamatória, anti-proliferativa e inibitória a nível da oxidação do LDL responsável pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Estas propriedades permitem assim expandir a aplicação de compostos fenólicos no desenvolvimento de alimentos funcionais, isto é, alimentos que potenciam uma ação benéfica na saúde do consumidor, para além da sua normal função nutricional. Outros estudos avaliam também o potencial

de incorporação dos subprodutos agroalimentares em pão, pastelaria e bebidas com o objetivo de extensão do seu tempo de vida (Ferreira *et al.*, 2015).

#### **1.2.4 Compostos Fenólicos no Bagaço de Azeitona**

Os compostos fenólicos têm sido alvo de estudos científicos devido à correlação da potencial atividade antioxidante e possíveis efeitos contra doenças degenerativas (Artajo *et al.*, 2007).

Segundo Aliakbarian *et al.*, (2015), os compostos fenólicos apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antivirais e antibacterianas. Estas propriedades levam a que estes compostos sejam considerados agentes terapêuticos contra doenças como o cancro, diabetes, oxidação das células e/ou problemas cardiovasculares, etc. Por estas razões, é de extrema importância a recuperação e valorização dos compostos fenólicos presentes nos subprodutos das indústrias de extração do azeite.

Alúdatt *et al.*, (2010) afirmam que o azeite contém na sua composição 2% do total do conteúdo fenólico das azeitonas inteiras, enquanto que, os 98% restantes estão presentes no bagaço de azeitona e nas águas ruças. Este facto é justificado pela natureza polar da maioria dos compostos. Quanto maior for a quantidade de água utilizada durante os processos de extração, menor é a quantidade de compostos fenólicos presentes no azeite. A quantidade de água utilizada durante os processos de extração afeta diretamente a concentração final dos compostos fenólicos (solubilização dos compostos polares). Este facto é verificado nos sistemas de extração de duas fases, em que os azeites produzidos apresentam concentrações mais altas em compostos fenólicos, tornando-os mais estáveis à auto-oxidação.

A ocorrência destes compostos no bagaço de azeitona dependem de diversos fatores, entre os quais, o grau de maturação da azeitona, a cultivar, condições edafo-climáticas, tempo de armazenamento e método de extração do azeite (Obied *et al.*, 2005).

Alúdatt *et al.*, (2010) afirmam ainda que a maior parte dos compostos fenólicos presentes nos subprodutos da oliveira encontram-se na forma livre, (75% - 90% do conteúdo total em fenólicos), enquanto que, uma pequena parte (10% - 25%) encontra-se na forma ligada.

De um modo geral, e comparada com a maioria dos outros frutos e vegetais a superioridade destes compostos no bagaço de azeitona é claramente evidenciada. Os principais compostos fenólicos encontrados têm sido hidroxitirosol, oleuropeína, tirosol, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido elenólico, catecol e rutina, além de pequenas concentrações de flavonoides e lignanas (acetoxipinoresinol e pinoresinol). (Garcia *et al.*, 2008).

Estes compostos têm despertado interesse na comunidade científica no âmbito da biodisponibilidade e metabolismo humano para estabelecer efeitos benéficos para a saúde (Artajo *et al.*, 2007; De Leonardis *et al.*, 2008).

## 1.3 Extração de Compostos Bioativos

### 1.3.1 Conceitos e Fundamentos

A extração dos compostos bioativos a partir de materiais vegetais vem sendo estudada já há alguns anos. Basicamente, as extrações iniciam-se com as operações de secagem, redução de dimensões e homogeneização das amostras em estudo. Depois do tratamento inicial, as amostras são conduzidas para a extração dos compostos bioativos neles presentes (Stalikas, 2007).

Porém, as extrações estão dependentes de características específicas como: a natureza química da planta, método de extração utilizado (tempo de extração, temperatura, rácio solvente/amostra, solvente utilizado, número de extrações realizadas), tamanho das partículas, tempo e condições de armazenamento e presença de substâncias interferentes. Para além desses fatores, o tipo de compostos que se pretendem extrair (frações solúveis ou insolúveis) também têm de ser tidos em conta, uma vez que, na extração das frações insolúveis são necessários pré-tratamentos à extração como a hidrólise ácida, extração alcalina, ou enzimática, de forma a conseguirem quebrar-se as ligações entre os compostos fenólicos conjugados (Naczki, 2004; Khoddami, 2013).

O comportamento das extrações nem sempre é linear. Existe uma grande variabilidade no material vegetal. As amostras podem apresentar concentrações distintas de vários compostos, levando à obtenção de extratos com diferentes características. Por vezes, dentro do mesmo tipo de subprodutos é possível observar variações composicionais como consequência da variabilidade entre espécies, fatores ambientais e extensão do processamento da matéria-prima que podem ter impacto na sua atividade antioxidante e propriedades biológicas (Ferreira *et al.*, 2015).

A escolha dos solventes de extração é sempre um momento importante, visto que o rendimento dos processos depende das matrizes e das combinações utilizadas. As extrações líquido-líquido e sólido-líquido são as técnicas comumente utilizadas, tendo como matrizes de extração solventes polares: água, acetona, álcoois, como o metanol e etanol, e combinações entre solventes (Khoddami, 2013).

Normalmente, o aumento do tempo e da temperatura promovem a solubilidade das amostras. Contudo, temperaturas elevadas e longos períodos de exposição levarão a degradação dos compostos fenólicos (Morais, 2012).

Para a extração destes compostos, os processos de natureza física surgem como alternativa aos processos convencionais de extração, que exigem a utilização de solventes a elevadas temperaturas e que podem conduzir à termodegradação dos compostos de interesse. Assim, têm sido desenvolvidos processos emergentes de extração tais como altas pressões hidrostáticas, ultrassons, micro-ondas, pulsos de campo elétrico e extração com fluídos supercríticos (Morais, 2012).

### **1.3.2 Processos Emergentes**

A extração dos compostos de elevado valor tem vindo a ganhar interesse a cada ano. Vários estudos já foram realizados e todos centram-se no mesmo objetivo: valorização dos subprodutos vegetais. Porém, o interesse não se confina somente em desenvolver uma nova técnica de extração. A busca por alternativas menos poluentes tem sido uma constante preocupação, os investigadores procuram oferecer processos alternativos de natureza física em detrimento dos processos convencionais (Artajo *et al.*, 2007; de Leonardis *et al.*, 2008).

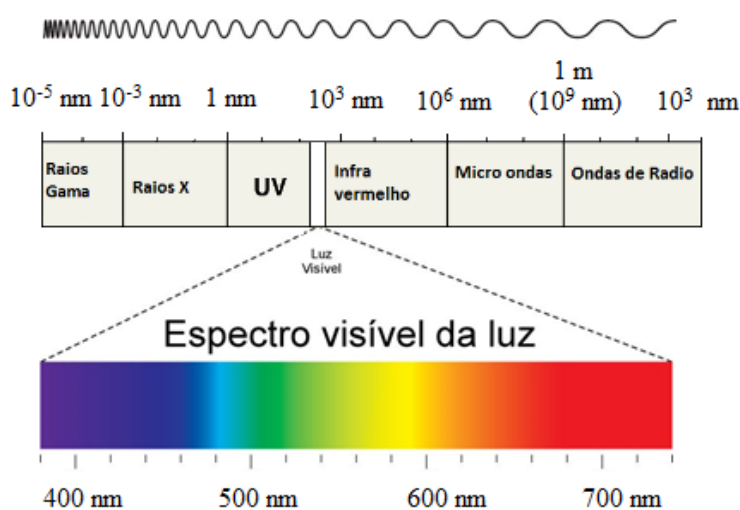
O processo tradicional de extração de compostos de elevado valor por meio de um solvente envolve geralmente duas etapas principais: Dissolução dos compostos solúveis presentes nas amostras e a transferência de massa para a solução por difusão e pressão osmótica dos compostos solúveis presentes no material vegetal (chamado de extração lenta). A última fase é muito mais lenta do que a primeira etapa e é o principal responsável pela limitação da taxa de extração. Para além disso, extrações lentas requerem grandes equipamentos para aumentar o rendimento, em contrapartida a longa exposição ao solvente, poderá causar a degradação dos componentes de interesse (Alupului *et al.*, 2012).

Por estas razões, é constante a procura de alternativas capazes de aumentar o rendimento das extrações e conseqüentemente a produtividade. Os processos emergentes, para além de diminuírem os custos de produção, diminuem também o

impacto ambiental. Entre os processos emergentes, destacam-se extração assistida por micro-ondas (EAM) e a extração assistida por ultrassons (EAU) como técnicas promissoras e “limpas” na extração de compostos de elevado valor. Estes métodos para além de aumentarem a produtividade, diminuem os tempos de processamentos, reduzem a libertação de poluentes tóxicos pela redução do consumo de solventes orgânicos e são relativamente simples de executar (Khoddami *et al.*, 2013).

### 1.3.2.1 Extração Assistida por Micro-ondas

As micro-ondas (Figura 1.8) são radiações eletromagnéticas não ionizantes, que possuem uma frequência na gama entre 300 a 300000 MHz, que corresponde a comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 1 mm a 1 m. A região de micro-ondas situa-se entre a região do infravermelho e as ondas de rádio no espectro eletromagnético (Sanseverino, 2002).



**Figura 1.8:** Espectro Eletromagnético. Adaptado de Silva (2012).

Os princípios envolvidos no aquecimento por micro-ondas são: temperatura, ligação química, estrutura molecular, momento dipolar, polarização, capacidade calorífica e constante dielétrica. Basicamente, o processo de extração envolve três etapas principais: primeiro, separação dos compostos presentes nos pontos ativos das matrizes vegetais através do aumento da temperatura e da pressão; segundo, difusão do solvente através

da amostra sólida; terceiro, libertação dos compostos para o solvente (Alupului *et al.*, 2012).

O mecanismo de aquecimento pelas micro-ondas ocorre de maneira diferente do aquecimento convencional (condução, irradiação e convecção). No aquecimento convencional, o recipiente e todo o material contido no mesmo sofre aquecimento, resultando num gradiente de temperatura do meio mais aquecido para o menos aquecido. O aquecimento por micro-ondas ocorre de forma contrária ao convencional, decorrente do mecanismo de aquecimento envolvido no sistema, a rotação de dipolo e condução iónica (Tsukui, 2014).

As micro-ondas produzem um rápido aquecimento da matriz, facilitando a extração dos compostos bioativos, além de utilizar um equipamento pequeno e proporcionar um alto rendimento do extrato (Alupului *et al.*, 2012).

A extração ocorre durante o aquecimento da matriz sólida, realizada por impulsos de micro-ondas. Deste modo, forma-se um gradiente térmico, o que leva a uma extração dos compostos de interesse de maneira mais eficiente e seletiva (Value, 2012).

A extração dos compostos bioativos resulta de um aquecimento rápido no micro-ondas. Cada molécula exposta ao campo de micro-ondas é diretamente afetada. Durante o processo, a energia do micro-ondas é convertida em energia cinética, permitindo assim o aquecimento seletivo do material vegetal em estudo. O aquecimento promovido leva ao aumento do volume e conseqüente explosão das células, libertando assim o seu conteúdo para a fase líquida. Quando a fase líquida absorve as micro-ondas, a energia cinética das moléculas aumentam, a velocidade da difusão também aumenta, resultando assim numa rápida transferência de massa (Alupului *et al.*, 2012).

Em geral, substâncias polares absorvem bem as radiações micro-ondas (como a água, metanol e o etanol), enquanto que, as substâncias menos polares (hidrocarbonetos alifáticos ou aromáticos) não são recomendados para extrações no micro-ondas (Sanseverino, 2002). A temperatura aparece também como um fator importante no rendimento da extração. Por um lado, uma correta aplicação aumentará o rendimento das extrações, por outro lado, temperaturas elevadas poderão degradar os compostos presentes nos extratos. Por último, mas não menos importante, o tamanho de partícula das amostras também contribui para a eficiência das extrações. Normalmente, o

tamanho de partícula na gama de 0,01 a 2 mm é adequado para o processo de extração (Di Khanh, 2015).

### **1.3.2.2 Extração Assistida por Ultrassons**

Para além de ser uma alternativa viável, eficiente e rápida comparativamente com as extrações convencionais, a extração assistida pelos ultrassons é também caracterizada como sendo um das técnicas mais económicas e de fácil aplicação em larga escala industrial (Di Khanh, 2015).

O método de ultrassons utiliza a energia das ondas sonoras (mecânicas) que são transmitidas em frequência superior à da capacidade auditiva humana. As ondas sonoras propagam-se na matéria, em frequências de 20,0 - 100,0 kHz, criando no meio que se propagam ciclos de expansão e compressão. Num líquido, estes ciclos produzem uma pressão negativa, podendo gerar bolhas ou cavitação, causando mudanças físicas e químicas permanentes, como rutura dos sólidos e instabilidade na interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás (Luque-García, 2003).

As transformações observadas são a consequência da grande quantidade de energia gerada pelo fenómeno de cavitação que é definido como o fenómeno de formação e subsequente rotura das microbolhas no centro de um líquido. A importância da cavitação não está em como são formadas as bolhas mas sim no que acontece quando elas colapsam. Em certo momento, as bolhas não absorvem mais energia dos ultrassons e implodem, facilitando assim a difusão do solvente extrator para o interior da matriz (Suslick *et al.*, 1999).

A energia associada a altas temperaturas e pressões destrói as paredes das células das amostras, libertando facilmente os compostos (Di Khanh, 2015).

Outro efeito que ocorre durante a cavitação é a formação de radicais, que podem eventualmente reagir com os compostos de interesse presentes na amostra, ocasionando a oxidação dos mesmos (Soria & Villamiel, 2010). Esses radicais são formados devido à dissociação da molécula da água ou de outros gases que possam migrar para o interior da bolha causada pelo calor e a alta pressão produzida durante a implosão das bolhas de cavitação (Castro & Capote 2007).

Existem dois tipos comuns de equipamentos de ultrassons, denominados por banho de ultrassons (direto ou indireto) e sonda ultrassônica (Suslick *et al.*, 1999).

O banho de ultrassons é um dispositivo relativamente simples e comumente utilizado nos laboratórios. Entretanto, com o passar do tempo, a energia ultrassônica tende a perder a intensidade e a ser distribuída de maneira não uniforme, interferindo assim nos resultados. Além disso, a posição em que a amostra é colocada no interior do recipiente e o tamanho do mesmo contribuem para a variação dos resultados. Por outro lado, a sonda ultrassônica tem a vantagem de aplicar a energia em qualquer ponto da mistura, favorecendo os processos de extração. Porém, temperaturas elevadas poderão degradar os compostos de interesse (Luque-Garcia & Castro, 2003).

Assim como a temperatura de extração, outros parâmetros devem ser analisados. A frequência utilizada geralmente nos banhos de ultrassom encontra-se entre 20 a 40 kHz, intervalo proporcionado pela maioria dos equipamentos de laboratório (Castro & Capote, 2007). Baixas frequências como as de 20 kHz são eficazes para a extração de compostos provenientes de fontes vegetais, sendo predominantes os efeitos físicos gerados pela cavitação. As bolhas formadas em baixas frequências são maiores que as formadas em altas frequências e implodem de maneira mais violenta, sendo conseqüentemente mais eficazes nos processos de extração. A cavitação também pode ser influenciada por fatores como: intensidade da sonicação, presença de gases, tamanho das partículas; pressão externa aplicada; viscosidade, tensão superficial e pressão de vapor do solvente, entre outros. Por isso, torna-se necessário otimizar as condições de extração anteriormente referidas de modo a obter bons rendimentos no final do processo (Castro & Capote, 2007).

### **1.3.2.3 Vantagens e Desvantagens dos Processos Emergentes**

Durante a pesquisa bibliográfica, verificou-se a existência de inúmeros estudos acerca da extração de compostos bioativos. As técnicas de extração são variadas, passando por extrações com fluídos supercríticos, micro-ondas, ultrassons, pulsos de campos elétricos entre outros. Estes métodos, embora descritos como sendo menos poluentes em relação aos que utilizam solventes orgânicos, acabam por tornar-se em métodos muito dispendiosos, tendo em conta os equipamentos necessários. Pelo referido, é de extrema

importância a otimização dos processos extrativos para obter produções máximas de compostos valiosos como é o caso dos antioxidantes.

Estes compostos, para além de poderem ser utilizados como suplementos alimentares ou alimentos funcionais, na prevenção de inúmeras doenças, a sua valorização garante a sustentabilidade ambiental (Aliakbarian *et al.*, 2015).

Perante isto, existe uma grande necessidade de estudar aprofundadamente cada técnica para se obter os melhores rendimentos durante as extrações. Desta forma, as extrações assistidas pelo micro-ondas e pelo ultrassons surgem como principais suportes deste trabalho. Assim, não se pode deixar de enumerar as vantagens e as desvantagens de cada método de extração.

Segundo os autores Alupului *et al.*, (2012), as micro-ondas produzem um rápido aquecimento da matriz, facilitando assim a extração dos compostos bioativos.

Uma das principais vantagens da extração assistida pelo micro-ondas é a redução do tempo de extração comparativamente com uma extração convencional. Extrações assistidas pelo micro-ondas permitem uma redução significativa no consumo de solventes e a possibilidade de múltiplas extrações (Costa, 2004).

Di Khanh (2015), aponta também como principais vantagens a conclusão do processo em curtos espaços de tempo; menor quantidade de solventes utilizados; processo simples e de baixo custo comparativamente com os processos em que são utilizados fluídos supercríticos. O mesmo autor aponta ainda, como desvantagens, a necessidade de haver passos adicionais no processo (centrifugação ou filtração) e a correta escolha do solvente de extração.

Value (2012) afirma que a extração assistida por micro-ondas proporciona menores consumos de energia, menores volumes de solventes, menor toxicidade (em ocasiões) dos solventes utilizados e, de um modo geral, menor quantidade de resíduos.

Relativamente aos ultrassons, Di Khanh (2015) qualifica esta técnica como sendo eficiente, simples, barata e uma boa alternativa para os processos convencionais de extração. Para além disso, os equipamentos são fáceis de manusear e menos dispendiosas comparativamente com outros métodos, como o micro-ondas ou com fluído supercrítico. Di Khanh (2015), aponta ainda como desvantagens os seguintes pontos: a cinética e o rendimento do processo dependem muito do tipo e natureza do

material vegetal. Value (2012) afirma ainda que a aplicação de ultrassons permite reduzir o tempo de extração ao produzir-se um incremento na pressão, que favorece a penetração e o transporte dos compostos, e um incremento da temperatura que aumenta a solubilidade e favorece a difusividade.

Luque-García *et al.*, (2003) apontam como desvantagens dos ultrassons, a falta de uniformidade na distribuição da energia ultrassónica e o declínio da potência durante o processo. Os mesmos autores apresentam como vantagens a possibilidade de utilização para uma ampla faixa de tamanho da amostra, a rapidez no processamento da amostra e o baixo custo.

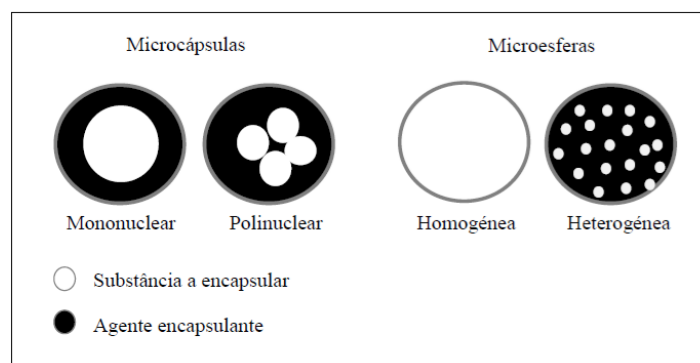
## 1.4 Microencapsulação

### 1.4.1 Conceito de Microencapsulação

A extração de compostos bioativos tem vindo a ganhar cada vez mais interesse por parte dos investigadores. Os benefícios presentes nestes compostos tem sido a principal razão para a constante procura de técnicas e/ou alternativas capazes de melhorar os rendimentos. Porém, a extração não é suficiente, é necessário encontrar alternativas para conservar ou proteger estes compostos. Exposto isto, a microencapsulação surge então como uma das alternativas de conservação dos compostos bioativos.

Segundo Fang & Bhandari (2010), o processo de microencapsulação foi desenvolvido há aproximadamente 60 anos e define-se como uma tecnologia capaz de encapsular materiais sólidos, líquidos ou gasosos em pequenas cápsulas fechadas, permitindo a libertação do seu conteúdo a taxas controladas sob condições específicas.

O processo de microencapsulação origina micropartículas de forma esférica, aspeto sólido e tamanho muito variável (entre 1 e 1000  $\mu\text{m}$ ) (Vyas & Khar, 2006). Relativamente à estrutura interna e morfologia, as micropartículas podem ser divididas em duas formas mais comuns: as microcápsulas e as microesferas (figura 1.9), de acordo com os materiais e métodos envolvidos na sua preparação (Silva *et al.*, 2003). Nas microesferas o material a encapsular (princípio ativo) encontra-se uniformemente distribuído na matriz do material encapsulante, enquanto nas microcápsulas existe um núcleo único envolvido por uma cápsula do agente encapsulante (Munin & Edwards-Lévy, 2011).



**Figura 1.9:** Estrutura das micropartículas (Adaptado de Silva *et al.*, 2003).

O material secundário, conhecido como agente encapsulante forma um revestimento de proteção em torno do material a ser encapsulado, isolando-o do seu ambiente envolvente até a sua libertação no meio pretendido. Este facto, evita interações indesejáveis dos compostos encapsulados com outros componentes de alimentos e/ou reações químicas que poderão levar à degradação do material a ser encapsulado. Isto evita possíveis consequências indesejáveis no sabor, aroma assim como efeitos negativos para a saúde (Sanguansri, & Augustim, 2010).

As principais substâncias de interesse para o encapsulamento são lípidos, proteínas, vitaminas e pigmentos naturais. O encapsulamento de corantes naturais pode aumentar a estabilidade destes compostos e a conservação da cor ao ser aplicado em alimentos, fármacos e embalagens. Além disso, esta técnica pode preservar características benéficas dos compostos bioativos como ação antioxidante e antimicrobiana (Assunção *et al.*, 2014).

Pode recorrer-se à encapsulação por três razões: proteção dos ingredientes, melhoria dos produtos alimentares e simplificação do processo de fabrico (Clark, 2002).

#### **1.4.2 Técnicas de Microencapsulação**

A escolha do método baseia-se sobretudo no tipo de micropartícula pretendida (tamanho e aplicações), nas propriedades físicas e químicas do composto a encapsular e do agente encapsulante (principalmente, a solubilidade), a aplicação ou finalidade das micropartículas nos mecanismos de libertação e na escala de produção (Azeredo, 2005). O processo de microencapsulação pode ser dividido em três classes: químicas, físico-químicas ou físicas conforme descrito na tabela 1.7.

**Tabela 1.7:** Técnicas de microencapsulação (Sanguansri *et al.*, 2010).

<b>Técnicas</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Exemplo de aplicações</b>
<b>Químicas</b>	Policondensação	----
	Polimerização interfacial	----
	Inclusão molecular	Produtos de confeitaria, bebidas instantâneas, snacks extrudidos.
<b>Físico-químicas</b>	Coacervação complexa	Pastilhas elásticas, pasta de dentes, alimentos processados termicamente.
	Emulsão	----
	Lipossomas	----
<b>Físicas</b>	Spray-drying	Produtos de confeitaria, leite em pó, sobremesas instantâneas, produtos aromáticos, bebidas instantâneas.
	Spray-cooling	Pratos preparados, gelados.
	Extrusão	Bebidas instantâneas, produtos de confeitaria, chás.
	Processos usando fluídos supercríticos	----
	Co-cristalização	----
	Liofilização (Freeze drying)	----

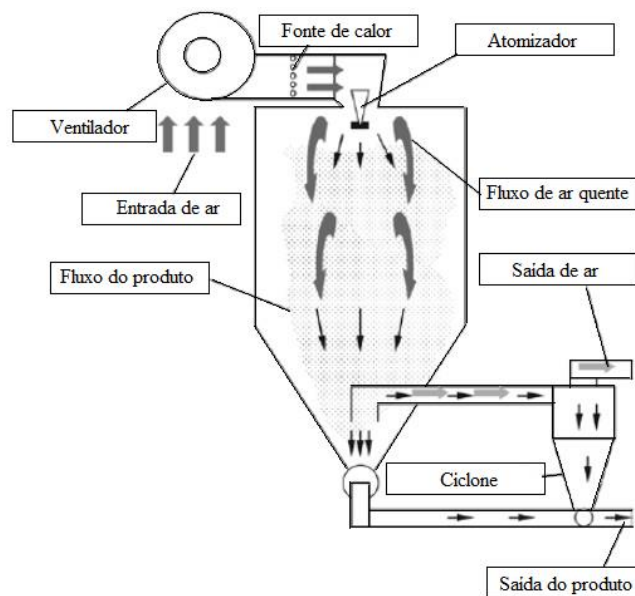
#### 1.4.2.1 Spray-drying

A secagem por atomização ou *spray-drying* é uma técnica física de microencapsulação amplamente utilizado na indústria alimentar (EL-Abbassi *et al.*, 2015).

A secagem por atomização define-se como sendo um processo rápido, fácil de reproduzir e de custo relativamente reduzido quando comparado com outras tecnologias utilizadas na microencapsulação (Pu *et al.*, 2011).

A secagem pelo *spray-drying* consiste na formação de micropartículas pela atomização (através de um atomizador) de uma solução contendo o princípio ativo e o material encapsulante. Basicamente, esta técnica consiste na pulverização de uma solução para uma câmara de secagem por intermédio de um atomizador que de seguida entrará em contacto com um gás (ar ou azoto) aquecido, promovendo a evaporação do solvente. As micropartículas são recolhidas após depositarem num ciclone ou num filtro (Fang & Bhandari, 2010; Augustin & Hemar, 2009).

A Figura 1.10 esquematiza as etapas envolvidas na técnica de microencapsulação por *spray drying*.



**Figura 1.10:** Esquematização das principais etapas da microencapsulação por *spray drying* (Silva, 2012).

### 1.4.3 Materiais Encapsulantes

Existe uma variedade de substâncias que podem ser utilizadas para revestir ou encapsular sólidos, líquidos ou gases de diferentes tipos e propriedades (Nedovic *et al.*, 2011).

O agente encapsulante deve ser capaz de proteger a matriz encapsulada de condições ambientais adversas (p.e. humidade e luz), proteger os ingredientes ativos da oxidação, retardar a libertação das substâncias ativas impedindo a vaporização dos compostos voláteis, separar substâncias incompatíveis ou ainda condicionar o local de libertação consoante as suas características (Nedovic *et al.*, 2011).

Dependendo das propriedades da matriz, o material de encapsulamento é geralmente selecionado a partir de uma variedade de proteínas, hidratos de carbono, lípidos ou ceras, ao qual se podem usar sozinhos ou combinados (Sanguansri *et al.*, 2010).

Segundo Brazel (1999), os principais materiais usados na indústria alimentar são os polissacáridos, as proteínas e os lípidos. Na tabela 1.8 estão representados alguns exemplos de matrizes encapsulantes.

**Tabela 1.8:** Exemplos de matrizes de encapsulamento (adaptado de Ribeiro, 2007).

<b>Classe</b>	<b>Exemplos</b>
<b>Proteínas</b>	Gelatina caseína, glúten, albumina.
<b>Glúcidos</b>	Amido nativo e modificado, maltodextrina, sacarose.
<b>Gomas</b>	Goma-arábica, agar, alginato de sódio, carragenina.
<b>Celuloses</b>	Carboximetilcelulose, metilcelulose.
<b>Lípidos</b>	Cera, parafina, óleos, ácidos gordos.

De acordo com Sanguansri *et al.*, (2010), os materiais escolhidos como agentes encapsulantes são tipicamente flexíveis, inodoros, não higroscópicos e solúveis em meios aquosos e solventes.

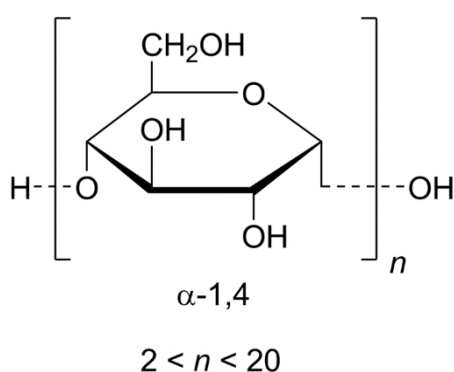
A escolha do agente encapsulante mais adequado influencia diretamente as propriedades físicas e químicas das micropartículas obtidas. O agente encapsulante para além de formar uma película coesa para proteger o material encapsulado, deverá apresentar

características específicas como flexibilidade, resistência, impermeabilidade e estabilidade na preparação (Venkatesan *et al.*, 2009).

### 1.4.3.1 Maltodextrina como Agente Encapsulante

As maltodextrinas ( $C_{6n}H_{(10n+2)}O_{(5n+1)}$ ) formam-se pela hidrólise parcial do amido com ácidos ou enzimas. A sua medida é dada em valores de dextrose equivalente (DE) e podem ser obtidas de amidos de diferentes fontes vegetais. A dextrose equivalente é uma medida que caracteriza a dimensão da hidrólise do amido e o peso molecular. Conforme aumenta o grau de hidrólise, a média do peso molecular diminuí e a DE aumenta. Esta é uma medida essencialmente empírica da quantidade de açúcar redutor presente no produto e é expressa na base seca (Yoshii *et al.*, 2001).

A maltodextrina (figura 1.11) possui uma média de cinco a dez unidades de glicose por molécula. A composição e propriedade do produto final depende muito da natureza do amido e o processo utilizado na hidrólise. As maltodextrinas podem ser produzidas por hidrólise enzimática ( $\alpha$ -amilase), ácida ou uma combinação dos dois métodos (Machado & Carvalho, 2015).



**Figura 1.11:** Composição química da maltodextrina (Machado & Carvalho, 2015).

Estes compostos têm a vantagem de ser obtidos a baixo custo, de sabor suave, boa capacidade de proteção dos aromas contra a oxidação e manifestam ainda uma boa capacidade na formação de microcápsulas. O facto de possuírem baixa viscosidade,

altas concentrações de sólidos e de estarem disponíveis em vários pesos moleculares, fazem destas bons agentes encapsulantes (Apintanapong & Noomhorm, 2003).

Normalmente, a maltodextrina é aplicada nas indústrias alimentares pelas suas propriedades funcionais específicas, quando comparadas com outros agentes de encapsulamento. Este agente encapsulante é frequentemente utilizada em formulações de molhos para saladas, bebidas, produtos lácteos, panificação, doçarias, e encapsulamento de aromas (Madene *et al.*, 2005).

A maltodextrina é amplamente utilizada como aditivo alimentar pelas suas características gelificante e espessante. Em geral, as maltodextrinas são solúveis em água, possuem baixa densidade, não apresentam sabor adocicado e não possuem sabor de amido. Devido à sua baixa viscosidade a altas concentrações, as maltodextrinas têm sido estudadas como possíveis substitutos para a goma-arábica em emulsões atomizadas. Por outro lado, maltodextrinas têm baixa capacidade emulsificante (Madene *et al.*, 2005).

#### **1.4.4 Encapsulamento de Compostos Bioativos**

Os compostos fenólicos apresentam benefícios reconhecidos para a saúde humana, destacando-se em particular as suas propriedades antioxidantes, sendo a sua inclusão na dieta humana considerada de grande importância. Porém, estes compostos são classificados como substâncias instáveis e quando são isoladas da sua fonte natural necessitam de ser protegidos do ambiente e das interações indesejáveis que poderá ocorrer com outros componentes (El-Abbassi, 2015).

A eficácia dos compostos fenólicos depende muito da preservação da sua estabilidade, bioatividade e biodisponibilidade. A utilização de compostos fenólicos encapsulados em vez de compostos livres, poderá resolver problemas como: o sabor desagradável dos compostos fenólicos, que aparece como uma das razões que limita a sua aplicação em concentrações mais elevadas; Estes compostos quando administrados pela via oral, apenas uma pequena parte das moléculas permanecem disponíveis após ingestão. Este facto é desencadeado pelo reduzido tempo de residência gástrica e pela baixa permeabilidade e solubilidade do intestino. Para além disso, a instabilidade encontrada quando são submetidos a processamentos e armazenamentos (temperatura, oxigénio,

luz) ou no trato gastrointestinal (pH, enzimas, presença de outros nutrientes), acaba por limitar as características e os potenciais benefícios para a saúde (Nedovic *et al.*, 2011).

O processo de microencapsulação surge então como possível alternativa às limitações apresentadas. Este processo permite a proteção do composto encapsulado, mantendo a bioatividade dos compostos que de outro modo poderia perder-se (Dueñas *et al.*, 2010; Nedovic *et al.*, 2011).

Há cada vez mais interesse em desenvolver e produzir substâncias com características funcionais para serem incorporados nos alimentos. Estas substâncias deverão satisfazer as exigências sensoriais dos consumidores e assegurar que a bioatividade seja entregue na respetiva zona do trato gastrointestinal, exercendo assim o desejado benefício para a saúde (Sanguansri *et al.*, 2010).

A microencapsulação tem sido aplicada a um grande número de matrizes alimentares, como é o caso dos compostos fenólicos com capacidade antioxidante existente em muitos dos materiais vegetais (Azeredo, 2005).

## **1.5 Objetivos**

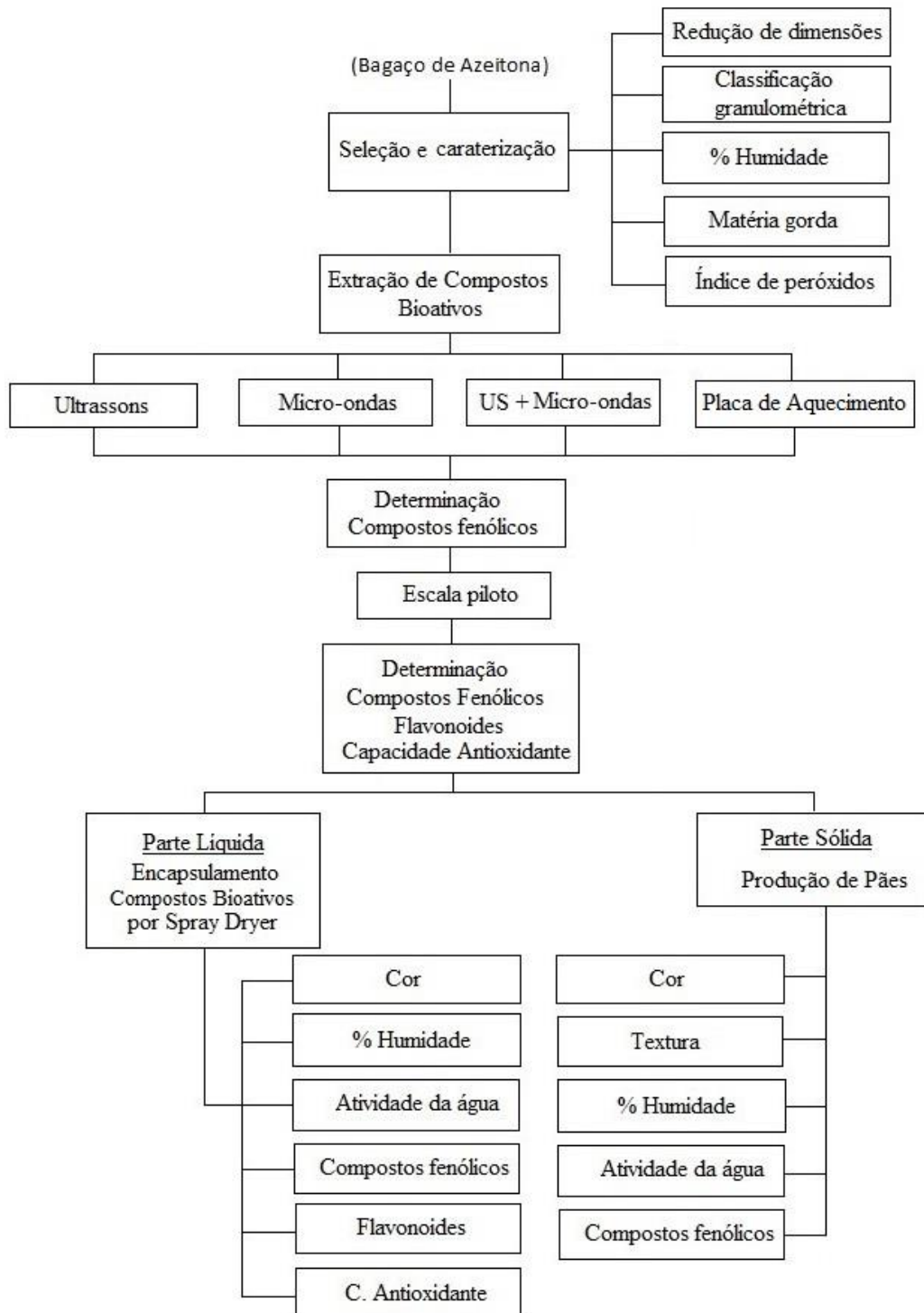
Os objetivos principais deste estudo foram:

- a) - Otimização de um método de extração dos compostos bioativos do bagaço de azeitona assistida por processos emergentes (ultrassons e micro-ondas).
- b) - Desenvolvimento de: 1) microcápsulas de extratos bioativos do bagaço de azeitona e 2) utilização de parte do bagaço de azeitona para formulação de novos produtos de panificação.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Esquemática do Trabalho Laboratorial

A figura 2.1 apresenta as diferentes etapas do trabalho experimental.



**Figura 2.1:** Esquemática do trabalho laboratorial.

## **2.2 Seleção da Matéria-prima**

Para realização deste trabalho utilizou-se amostras de bagaço de azeitona bruto ou virgem das cultivares Maçanilha e Cobrançosa. As amostras foram adquiridas na Cooperativa Agrícola dos Produtores de Azeite, situada em Santa Catarina da Fonte do Bispo, Concelho de Tavira, em meados do mês de novembro de 2014.

As amostras selecionadas provinham de azeitonas que foram colhidas entre os meses de Outubro e Novembro de 2014.

## **2.3 Caracterização da Matéria-prima**

Antes da extração dos compostos bioativos, foi necessário realizar algumas operações importantes para caracterizar a matéria-prima, nomeadamente, a limpeza, secagem, redução de dimensões e determinação do resíduo seco.

### **2.3.1 Limpeza do Bagaço de Azeitona**

Após a seleção das amostras, e já em laboratório, realizou-se a limpeza do bagaço de azeitona. Foram retiradas algumas partículas sólidas, nomeadamente pedras, objetos provenientes da apanha das azeitonas, folhas e ramos de oliveira que ainda estavam presentes na mistura.

### **2.3.2 Secagem do Bagaço de Azeitona**

As amostras (2,5 kg) foram colocadas em vários tabuleiros de inox, formando uma camada fina para facilitar a secagem. A secagem ocorreu em estufa com a temperatura compreendida entre 45 a 50 °C até a obtenção do peso constante (aproximadamente 48 horas). Ao longo do processo de secagem, foram retiradas várias amostras e determinada a percentagem de humidade numa balança de infravermelhos (Mettler, LP16 e PM100, Suíça) até se obter um valor constante.

### 2.3.3 Redução de Dimensões e Classificação Granulométrica

A redução de dimensões foi efetuada com o auxílio de um moinho de martelos (Retsch mühle, modelo SK1, Alemanha), ao qual as amostras foram trituradas por etapas sucessivas, pela ordem seguinte: trituração livre (sem crivo à saída do moinho) e trituração com crivos de 3, 2 e 1 mm.

Após a redução das dimensões, procedeu-se à classificação granulométrica, recorrendo a um peneiro vibratório (Retsch, Modelo 3D, Alemanha), constituído por uma sequência de peneiros com aberturas de malha 1,00 mm, 0,600 mm, 0,212 mm, 0,106 mm, 0,063 mm e coletor.

A dimensão das partículas foi determinada através do diâmetro médio em massa ( $D_w$ ), utilizando a seguinte equação:

$$\bar{D}_m = \frac{\sum N_i d_{pi}}{\sum N_i} = \bar{D}_m = \sum x_i d_{pi} \quad (\text{Equação 1})$$

$N_i$  – Número de partículas na fração  $i$ .

$x_i$  – fração em massa na fração  $i$ .

$d_{pi}$  – diâmetro médio de partícula na fração  $i$ .

As frações em massa foram obtidas pela pesagem das amostras retidas em cada peneiro. O diâmetro médio das partículas foi obtido pela diferença das dimensões das malhas do peneiro que reteve as partículas e a do peneiro da malha superior.

## 2.4 Caracterização Físico-química do Bagaço de Azeitona

### 2.4.1 Teor de Humidade

Para determinar a percentagem de humidade, recorreu-se ao método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Pesou-se cerca de 2 a 3 g de amostra para uma placa de Petri previamente seca numa estufa a 105 °C durante 30 minutos, seguido do seu

arrefecimento num exsiccador até atingir a temperatura de 25 °C. A placa contendo a amostra foi então colocada em estufa a 105 °C até obtenção do peso constante. Após este período colocou-se a placa contendo a amostra no exsiccador para arrefecer e proceder à sua pesagem. Repetiu-se o passo de secagem até a amostra atingir peso constante. Após a obtenção do peso constante, a percentagem de humidade da amostra foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Humidade} = \frac{\text{Massa de água (g)}}{\text{Massa inicial da amostra (g)}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

#### 2.4.2 Índice de Peróxidos

O índice de peróxidos de uma amostra constitui a quantidade de oxigénio ativo, expressa em miliequivalentes, contido num quilograma de gordura ou óleo. Para a determinação do índice de peróxidos (IP) da gordura remanescente no bagaço de azeitona, recorreu-se ao método descrito no anexo III do Regulamento (CEE) nº 2568/91, posteriormente alterado pelo Regulamento (UE) nº. 61/2011 da Comissão de 24 de Janeiro de 2011. 1 g de amostra foi dissolvida em 10 ml de clorofórmio, sob agitação rápida. De seguida adicionou-se 15 mL de ácido acético glacial e 1 mL de uma solução saturada de iodeto de potássio. A solução foi deixada em repouso durante 5 minutos ao abrigo da luz. Após o período de repouso, foi adicionado 75 mL de água destilada e procede-se à titulação com uma solução de tiosulfato de sódio (0,01N), usando-se o cozimento de amido como indicador. A titulação foi realizada sob agitação constante até se obter uma coloração negra. Após realização da análise, o índice de peróxidos foi determinado pela equação seguinte:

$$\text{Índice de peróxidos} = \frac{10 \times V}{m} \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo:

- m- massa da amostra (g);
- V- Volume de titulante gasto no ensaio (cm<sup>3</sup>).

### 2.4.3 Ácidos Gordos Totais

Entende-se por gordura bruta a fração da amostra extraída por um solvente orgânico num extrator de *Soxhlet*.

A determinação do teor em matéria gordura foi realizada, de acordo com o método baseado no anexo XV do Regulamento (CEE) n.º 2568/91, posteriormente alterado pelo Regulamento (UE) n.º 61/2011 da Comissão de 24 de Janeiro de 2011 com algumas alterações e adaptações, usando éter de petróleo como solvente.

Inicialmente, colocou-se numa estufa (Selecta) a 105 °C durante aproximadamente 2 horas um balão de fundo plano de 250 mL contendo algumas esferas de vidro (reguladores de ebulição). Após a secagem, o balão foi arrefecido num exsiccador até temperatura ambiente. Num cartuxo de extração (Schleider & Schüell) foram pesados 10 g de amostra, obtida anteriormente na determinação do teor de humidade, o cartuxo foi então preenchido com algodão para evitar eventuais perdas de amostra. Num balão de extração foram adicionados cerca de 200 mL de éter de petróleo (40 – 60). Procedeu-se à extração da amostra sobre refluxo, numa manta de aquecimento (Selecta) durante 16 horas. Terminada a extração, o solvente foi evaporado a vácuo recorrendo a um evaporador rotativo (Heidolph, Laborota 4000) com a temperatura regulada para 60 °C. Após esta operação, o balão contendo a amostra da gordura foi colocado numa estufa (Selecta) a 105 °C durante 10 minutos, para remoção da humidade. O balão contendo a gordura foi arrefecido no exsiccador até atingir temperatura ambiente. O teor em matéria gorda livre foi determinada de acordo com a fórmula seguinte:

$$(\%) \text{ Matéria Gorda} = \frac{M2 - M1}{RS} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Sendo:

- M1- massa do balão sem amostra (g);
- M2 - massa do balão com amostra (g);
- RS – massa resíduo seco (g).

## **2.5 Extração dos Compostos Bioativos**

Para a extração dos compostos bioativos, cerca de 5 g do bagaço seco foi dissolvido em 75 mL de água ou numa mistura de etanol e água (70/30 v/v), consoante o processo pretendido.

### **2.5.1 Extração por Ultrassons**

Ápos a preparação dos extratos, a mistura foi processada por um homogeneizador Sonicador (Ultrasonic Homogenizer 4710 series, Cole-Parmer, EUA) com uma frequência de 20 KHz e uma sonda V1A com 13 mm de diâmetro (Cole-Parmer, EUA). Utilizou-se uma potência de 125 W. A eficiência da extração foi estudada usando diferentes solventes e diferentes tempos de extração (entre 0 a 15 minutos). Após esta operação, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga refrigerada, Sigma 3K20, Alemanha) durante 10 min a 10.000 rpm. Em seguida, as amostras foram filtradas com auxílio do filtro de papel Whatman n°. 4.

### **2.5.2 Extração por Micro-ondas**

Os extratos foram processados no micro-ondas (Miero-Chef 2535, Moulinex, França) com uma potência de 850 W. Durante o tempo de extração, as amostras atingiram temperaturas de 73 e 76 °C para extratos aquosos e extratos etanólicos respectivamente. Após alguns testes preliminares optou-se por definir 30 segundos como o tempo máximo para as extrações, isto porque o aquecimento promovido pelas micro-ondas levaria rapidamente ao aumento do volume do líquido extrator, libertando assim o seu conteúdo para fora do recipiente de extração.

Testou-se diferentes misturas de solventes e diferentes tempos de tratamentos (entre 0 a 30 segundos). Após esta operação, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga refrigerada, Sigma 3K20, Alemanha) durante 10 min a 10.000 rpm. Em seguida, as amostras foram filtradas com auxílio do filtro de papel Whatman n°. 4.

### 2.5.3 Processos Emergentes Combinados

Com o objetivo de aumentar a eficiência e o rendimento da extração, optou-se por combinar os métodos de extração (micro-ondas e ultrassons). As combinações estão apresentados na tabela 2.1.

**Tabela 2.1:** Combinações dos métodos.

Combinações	
Micro-ondas (s)	Ultrassons (min)
10	5
10	10
10	15
20	5
20	10
20	15
30	5
30	10
30	15

Os extratos foram processados inicialmente num micro-ondas (Miero-Chef 2535, Moulinex, França) com uma potência de 850 W, durante 10, 20 e 30 segundos, consoante a combinação pretendida. Após a aplicação dos micro-ondas, as amostras foram de seguida processadas por um homogeneizador Sonicador (Ultrasonic Homogenizer 4710 series, Cole-Parmer, EUA) com uma frequência de 20 KHz e uma sonda V1A com 13 mm de diâmetro (Cole-Parmer, EUA) e uma potência de 125 W durante 5, 10 e 15 minutos consoante a combinação pretendida. Após esta operação, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga refrigerada, Sigma 3K20, Alemanha) durante 10 min a 10.000 rpm. Em seguida, as amostras foram filtradas com um filtro de papel Whatman n°. 4.

### 2.5.4 Extração em Placa de Aquecimento

Depois da aplicação das técnicas emergentes de extração (micro-ondas e ultrassons) optou-se ainda por extrair os compostos bioativos numa placa de aquecimento. Decidiu-

se comparar as extrações assistidas pelo micro-ondas e ultrassons com uma extração utilizando uma técnica tradicional de aquecimento (placa de aquecimento). Os compostos bioativos foram extraídos com água e uma mistura de etanol e água (70/30 v/v).

Como a mistura de etanol e água (70/30 v/v) atingiu uma temperatura média de 76 °C após 30 segundos no processo com micro-ondas, decidiu-se manter a mesma temperatura na placa de aquecimento, variando-se somente o tempo de extração. Paralelamente, testou-se ainda uma extração utilizando apenas água como solvente e uma temperatura de 100 °C. As extrações estão apresentados na tabela 2.2.

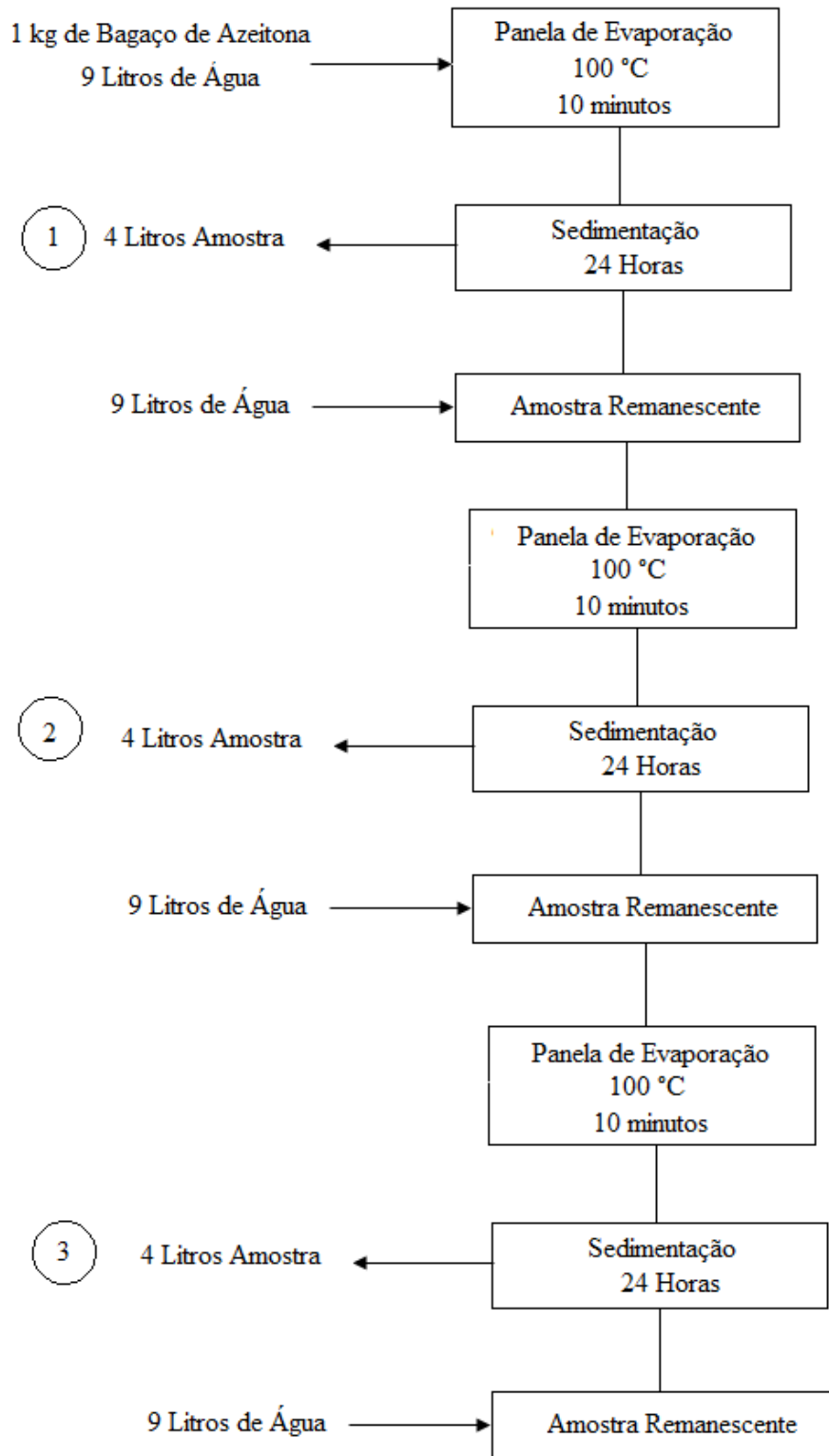
**Tabela 2.2:** Extrações na placa de aquecimento.

<b>Solvente Extrator</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (min)</b>
Água/etanol (70/30 v/v)	76	7
Água	76	9
Água	100	21

Os extratos foram processados numa placa de aquecimento (Namora blue, modelo 656), durante 7, 9 e 21 minutos, consoante o tipo de extração pretendido. Após esta operação, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga refrigerada, Sigma 3K20, Alemanha) durante 10 min a 10.000 rpm. Em seguida, as amostras foram filtradas com auxílio do filtro de papel Whatman nº. 4.

### **2.5.5 Extração em Escala Piloto**

A extração em escala piloto foi efetuada em três fases, como se pode visualizar na figura 2.2. 1 kg do bagaço de azeitona foi misturado com 9 litros de água. A mistura foi processada dentro de uma panela de evaporação (Armfield, modelo B2182) a 100 °C e 2 bar.



**Figura 2.2:** Esquematização da extração em escala piloto.

## 2.6 Caracterização dos Extratos

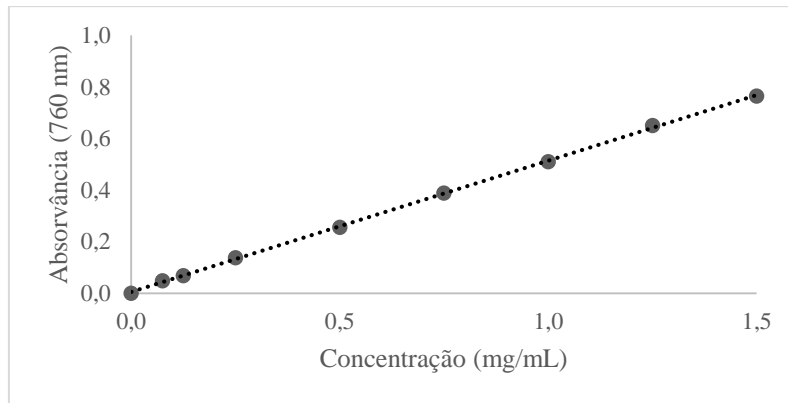
Para cada extrato determinou-se o conteúdo em compostos fenólicos totais, flavonoides, e a atividade antioxidante. Foi construída uma curva de calibração para cada método, utilizando para o efeito diferentes concentrações do respetivo padrão, sendo a concentração dos compostos na amostra calculada pela reta de calibração. Todos os ensaios descritos neste bloco foram realizados em triplicado.

### 2.6.1 Conteúdo em Compostos Fenólicos Totais

O conteúdo em compostos fenólicos totais foi determinado de acordo com o método de *Folin-Ciocalteu* seguindo o procedimento do Malik e Bradford (2006) por espectrofotometria de UV. Adicionou-se a um tubo de ensaio 10 µL do extracto (amostra) e 190 µL de água destilada. De seguida, adicionou-se 1 mL do reagente *Folin-Ciocalteu* 0,2 N (diluição 1:10) seguido de 800 µL de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (75%, w/v). Após a agitação, estes foram mantidos no escuro durante 30 minutos e depois analisados a 760 nm num espectrofotómetro (Hitachi U-2000, Japão).

A quantidade em compostos fenólicos totais foi expressa em equivalentes de ácido gálico (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>) por grama de bagaço seco (mg GAE/g de bagaço seco). A reta de calibração (Figura 2.3) foi calculada utilizando-se concentrações de ácido gálico de 0,075 a 1,5 mg/mL, com um coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) de 0,999 e a seguinte equação:

$$\text{Absorvância} = 0,509 * [\text{ácido gálico}] + 0,0059 \text{ (Equação 5)}$$



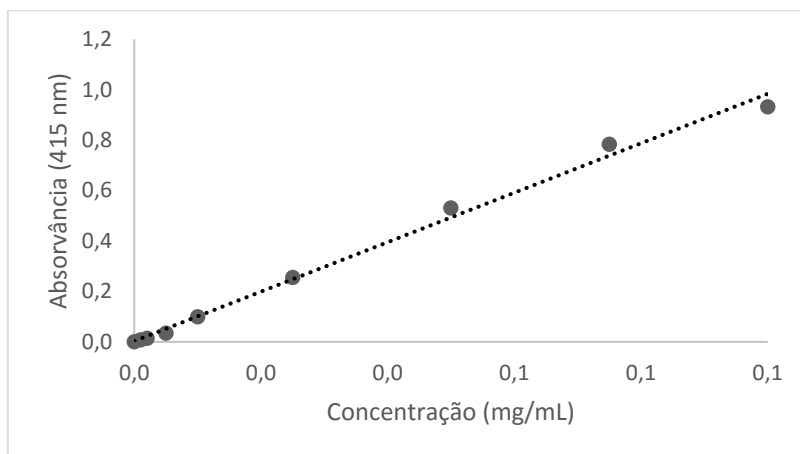
**Figura 2.3:** Curva de calibração do ácido gálico, utilizada para a determinação dos compostos fenólicos totais.

### 2.6.2 Conteúdo em Flavonóides

Os flavonóides foram determinados por um método colorimétrico seguindo o procedimento do Chang *et al.*, (2002). 500  $\mu\text{L}$  do extracto (amostra) foi misturado com 100  $\mu\text{L}$  de solução metanólica de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) a 10%, 100  $\mu\text{L}$  de acetado de potássio ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{KO}_2$ ) e 2800  $\mu\text{L}$  de água destilada. Após a agitação, estes foram mantidos no escuro durante 30 minutos e posteriormente analisados a 415 nm num espectrofotómetro (Hitachi U-2000, Japão).

A quantidade de flavonóides foi expressa em equivalentes de quercetina ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ ) por grama de bagaço seco (mg EQ/g de bagaço seco). A recta de calibração (Figura 2.4) foi calculada utilizando-se concentrações de quercetina de 0,2 a 1 mg/mL, com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,993 e a seguinte equação:

$$\text{Absorvância} = 9,814 * [\text{quercetina}] + 0,0031 \text{ (Equação 6)}$$



**Figura 2.4:** Curva de calibração da quercetina, utilizada para a determinação dos flavonóides.

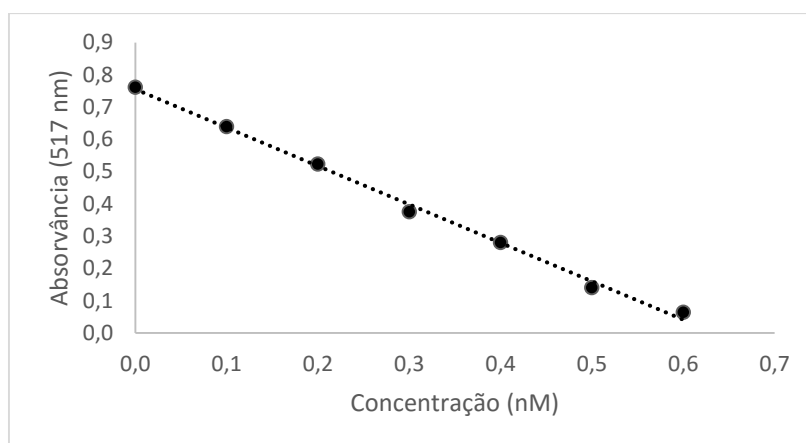
### 2.6.3 Capacidade Antioxidante

A capacidade de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) foi avaliada a partir do método reportado por Sevim & Tuncay (2013). O método DPPH baseia-se na captura por parte dos antioxidantes do radical livre DPPH, reduzindo-o e promovendo consequentemente um decréscimo da absorvância a 517 nm. O radical DPPH apresenta uma coloração violeta em solução de metanol que ao ser colocado em contato com a amostra é consumido de acordo com o poder antioxidante que a mesma apresenta, passando, gradualmente, para uma tonalidade amarela. Quanto maior for a quantidade de radical consumido, maior é a capacidade antioxidante da amostra e, consequentemente, a absorvância após reação será menor (Sevim & Tuncay, 2013). Para tal, preparou-se previamente uma solução de DPPH ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ) 0.02718 mM em 25 mL de metanol. Num tubo de ensaio contendo 100  $\mu$ L do extrato (amostra) juntou-se 1900  $\mu$ L da solução de DPPH. Após agitação no vortex, estes foram mantidos ao abrigo da luz durante 15 minutos e posteriormente analisados a 517 nm num espectrofotómetro (Hitachi U-2000, Japão).

A atividade antioxidante foi calculada com base numa recta de calibração, utilizando-se o trolox ( $C_{14}H_{18}O_4$ ) como antioxidante padrão de referência, cujos resultados foram expressos em  $\mu$ mol equivalente de trolox por grama de bagaço seco.

A curva de calibração (Figura 2.5) foi calculada utilizando-se concentrações de trolox de 0,1 a 0,6 mM, com um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,996 e a seguinte equação:

$$\text{Absorvância} = -1,1911 * [\text{trolox}] + 0,7556 \text{ (Equação 7)}$$



**Figura 2.5:** Curva de calibração de trolox, utilizada para a determinação da capacidade antioxidante.

## 2.7 Encapsulamento dos Compostos Bioativos.

Para o encapsulamento dos compostos bioativos presentes no bagaço de azeitona, optou-se por usar a secagem por atomização (*spray dryer*), usando como agente encapsulante a maltodextrina. Os extratos utilizados na microencapsulação foram obtidos na extração à escala piloto referida na secção 2.5.5.

### 2.7.1 Preparação dos Extratos com Maltodextrina.

Após as sucessivas extrações, procedeu-se à filtração dos extratos para remover os sólidos presentes na mistura. Decidiu-se preparar uma solução com uma concentração de 5% de maltodextrina. Para tal, adicionou-se 475 mL de cada extrato, num gobelé de 1000 mL, seguido de 25 g de maltodextrina. Esta solução foi mantida sob agitação constante até haver dissolução completa da maltodextrina e até ser utilizada na secagem por atomização.

## 2.7.2 Secagem por Atomização

A secagem foi realizada por pulverização utilizando um Atomizador Niro (Copenhagen-Dinamarca). As condições de secagem por atomização estabelecidas e utilizadas foram as seguintes: caudal 17 mL/min, pressão 6 bar, volume de solução de 500 mL, temperatura de entrada e de saída do ar foi de 150 e 85 °C, respetivamente. A solução foi mantida sob agitação constante durante todo o processo de secagem.

## 2.8 Caracterização dos Encapsulados

### 2.8.1 Rendimento

Esta experiência teve como finalidade principal determinar o rendimento do processo de secagem por atomização. O rendimento foi calculado, através da razão da massa em pó obtida no processo de secagem e a quantidade de sólidos presentes em cada amostra.

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{M1}{M2} \times 100 \text{ (Equação 8)}$$

Sendo:

- M1- massa obtida após a secagem (g);
- M2 - massa de sólidos da mistura inicial (g);

### 2.8.2 Teor de Humidade

O método foi efetuado como descrito anteriormente na secção 2.4.1.

### **2.8.3 Atividade da Água ( $a_w$ )**

A atividade da água foi determinada colocando cerca de 2 g de amostra no medidor de  $a_w$  (Rotronic Hydrolab AG, Suíça) a uma temperatura de 25 °C. As amostras foram analisadas em triplicado.

### **2.8.4 Avaliação da Cor**

A cor foi determinada a partir de um colorímetro (Dr. Lange, Neurtek Instruments, Alemanha), com as seguintes características: Escala de Hunter *Lab*, ângulo de observador de 10° e iluminante D65. Para cada medição teve-se em conta os parâmetros *L*, *a*, e *b*. O parâmetro *L* traduz a variação da luminosidade clara/escuro, variando entre 0 (preto) e 100 (branco), o parâmetro *a* varia entre -60 (verde) e +60 (vermelho) e o parâmetro *b* varia entre -60 (azul) e +60 (amarelo). As amostras foram analisadas em triplicado.

### **2.8.5 Caracterização das Amostras Encapsuladas**

Para determinar a capacidade antioxidante, os compostos fenólicos e o conteúdo em flavonóides, foi necessário hidratar o material encapsulado com maltodextrina. O método consistiu em dissolver num gobelé, cerca de 1 g do pó em 10 mL de etanol (96% v/v), com auxílio do homogeneizador Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Alemanha). Após esta operação, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga refrigerada Sigma 3K20, Alemanha) durante 10 min a 10.000 rpm. Em seguida, as amostras foram filtradas com auxílio do filtro de papel Whatman n°. 4.

#### **2.8.5.1 Conteúdo em Compostos Fenólicos Totais**

O método foi efetuado como descrito anteriormente na secção 2.6.1.

### **2.8.5.2 Conteúdo em Flavonóides**

O método foi efetuado como descrito anteriormente na secção 2.6.2.

### **2.8.5.3 Capacidade Antioxidante**

O método foi efetuado como descrito anteriormente na secção 2.6.3.

## **2.9 Aplicação do Bagaço de Azeitona Extratado na Produção de Pães**

### **2.9.1 Seleção do Bagaço de Azeitona Extratado**

Após a extração dos compostos bioativos, os sólidos remanescentes foram sujeitos a secagem e determinação granulométrica. O bagaço de azeitona por ser uma mistura heterogénea contém na sua composição uma grande quantidade de caroços. Trata-se de um material fibroso, com alguma dureza e de difícil digestão. Por esta razão foi de extrema importância fazer a sua remoção. Assim, a determinação granulométrica serviu-se para fazer a remoção deste material.

Para a formulação dos pães, utilizou-se as duas últimas frações da determinação granulométrica (Figura 2.6), por serem as frações com menor diâmetro de partículas (0,106 mm, 0,063 mm) e por serem aquelas que apresentavam menor quantidade de caroços. Este fator é muito importante, visto que, o bagaço apresenta uma textura rígida e isso seria desconfortável durante o processo de mastigação.



**Figura 2.6:** Farinha de bagaço de azeitona utilizado na formulação dos pães.

## 2.9.2 Produção de Pães

Na tabela 2.2 estão apresentados as percentagens das matérias-primas utilizadas na formulação dos pães.

**Tabela 2.3:** Receitas da confeção dos pães.

Ingredientes	Receita original	Receita mista
	%	%
Farinha de trigo tipo 65	57,8	53
Bagaço de Azeitona	---	4,8
Sal	1,16	1,16
Água	40,46	40,46
Fermento desidratado	0,58	0,58

Após a primeira fase, e já com as características desejadas de elasticidade/retractilidade na massa, esta foi retirada da amassadeira, e deixada em repouso durante 50 minutos numa estufa húmida (80 – 85 %) a 37 °C. Seguidamente a massa foi dividida (porções de 50 g) e moldadas para se obter o formato desejado. Após a moldagem, colocou-se os pães pela segunda vez na estufa durante cerca de 30 minutos a 37 °C, onde foi observado um aumento do volume. Após a fermentação realizou-se o corte da superfície da massa e a etapa de cozedura, por 20 minutos a 180 °C, num forno (Teka, Modelo HI435ME). Por último, os pães foram arrefecidos durante 30 minutos a 25 °C.

### **2.9.3 Avaliação da Cor**

A cor do miolo e da crosta dos pães foram analisadas utilizando 3 pães de cada formulação e realizadas 3 leituras a cada pão. A análise instrumental da cor foi realizada de acordo com o método descrito anteriormente na secção 2.8.4.

### **2.9.4 Teor de Humidade**

Para a determinação do teor de humidade, os pães foram sujeitos a uma redução de dimensões numa picadora (A320R1/APO-1212R, Moulinex, Indonésia). Após obtenção da massa homogénea, pesou-se cerca de 2 g da amostra no prato da balança de infravermelhos (Mettler, LP16 e PM100, Suíça), e foram distribuídas numa camada homogénea. A temperatura de secagem foi de 120 °C.

### **2.9.5 Atividade da Água ( $a_w$ )**

O método foi efetuado como descrito anteriormente na secção 2.8.3.

### **2.9.6 Textura**

A textura das amostras foi realizada através de um texturometro (Brookfield, LFRA 1500, EUA), sonda de forma esférica e em aço inox de 12,7 mm de diâmetro, referenciada de TA18. Para a determinação deste parâmetro utilizou-se um teste de compressão mecânica, que consiste em comprimir as amostras duas vezes, imitando a ação da mandíbula (uma trincada no pão). As amostras foram comprimidas até 50% da sua altura original, seguido de um relaxamento e de uma segunda compressão. A resistência oferecida pela amostra à compressão durante o teste traduz-se graficamente na força *versus* tempo, do qual é possível calcular os parâmetros da textura que caracterizam a amostra (Martinez *et al.*, 2004). Os atributos da amostra estudados foram: dureza, gomosidade, adesividade, coesividade, mastigabilidade, elasticidade e

percentagem de deformação. Estes parâmetros foram determinados de igual forma nas duas receitas do pão.

### **2.9.7 Determinações Químicas**

Para determinar a capacidade antioxidante, os compostos fenólicos e o conteúdo em flavonóides, os pães foram sujeitos a uma redução de dimensões numa picadora (A320R1/APO-1212R, Moulinex, Indonésia). Após esta operação, pesou-se numa balança analítica (Mettler, AE 240) ( $\pm 0,0001$  g), cerca de 5 g do pão, que foi dissolvido em 75 mL de etanol e água (70/30 v/v) com auxílio do homogeneizador Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Alemanha). As amostras foram então centrifugadas (Sigma, 3K20, Alemanha) durante 10 min, 10.000 rpm e a 4 °C. Para finalizar as amostras foram filtradas com auxílio do filtro de papel Whatman nº. 4.

#### **2.9.7.1 Conteúdo em Compostos Fenólicos Totais**

O método foi efetuado como descrito anteriormente na secção 2.6.1.

#### **2.9.7.2 Conteúdo em Flavonóides**

O método foi efetuado como descrito anteriormente na secção 2.6.2.

#### **2.9.7.3 Capacidade Antioxidante**

O método foi efetuado como descrito anteriormente na secção 2.6.3.

## 2.10 Análise Estatística

Com o objetivo de avaliar as diferenças entre os tratamentos, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA). O teste das diferenças mínimas significativas (LSD) foi efetuado para detetar entre que pares de tratamentos existiam diferenças. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos com um nível de significância ( $\alpha$ ) 0,05. Todos os cálculos foram efetuados com recurso ao *software* IBM SPSS Statistics Versão 22. Todos os resultados foram expressos como médias  $\pm$  desvio padrão (DP).

### 3. Resultados e Discussão

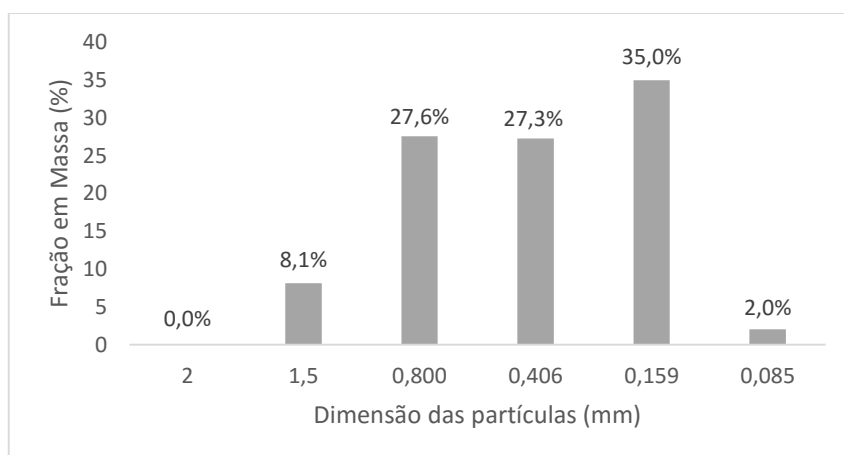
#### 3.1 Seleção e Caracterização do Bagaço de Azeitona

Para a caracterização do bagaço de azeitona foram determinadas propriedades físicas (redução de dimensões e classificação granulométrica) e químicas (teores em humidade, matéria gorda, índice de peróxidos e atividade da água).

##### 3.1.1 Redução de Dimensões e Classificação Granulométrica

A redução de dimensões poderá ser um parâmetro importante no rendimento das extracções, uma vez que, uma redução significativa do tamanho das partículas permitirá um aumento significativo da área superficial da moenda. Quanto maior for a área superficial maior é o contacto com o solvente, maior é a extração.

O gráfico que se segue (Figura 3.1) representa a distribuição normal das partículas da moenda do bagaço de azeitona.



**Figura 3.1:** Distribuição normal do tamanho médio das partículas.

Através da figura 3.1 pode-se verificar que a moenda permitiu centralizar os valores das partículas para diâmetros intermédios, tendo obtido maiores resultados nos diâmetros compreendidos entre 0,800 a 0,159 milímetros. O bagaço por ser um resíduo de origem

vegetal e por conter uma heterogeneidade de materiais na sua composição é sempre difícil obter amostras idênticas, o que foi confirmado pela determinação granulométrica. Grande parte do bagaço de azeitona é constituído pelas sementes e/ou caroços. Este material é caracterizado pela sua rigidez, e a sua moenda torna-se cada vez mais difícil. Durante a determinação granulométrica foi possível visualizar uma grande quantidade de caroços no peneiro de 1,5 mm, correspondendo assim a 8,1% do bagaço triturado. Enquanto, cerca de 54,9% da amostra triturada (fração 0,800 e 0,406 mm) correspondeu aos restantes constituintes do bagaço, entre eles os caroços de dimensões reduzidas, polpa e as películas da azeitona. As frações com as dimensões das partículas compreendidas entre 0,159 e 0,085 mm corresponderam a 37%. Pela granulometria das amostras e pela dureza dos caroços foi possível verificar que estas frações seriam constituídas quase na sua totalidade pela polpa e película da azeitona.

Para os parâmetros diâmetro médio em superfície (DS), diâmetro médio em volume (DV) e diâmetro médio em massa (DM), foram obtidos os seguintes valores (Tabela 3.1):

**Tabela 3.1:** Diâmetro das partículas.

DS - Diâmetro médio em superfície (mm)	DV - Diâmetro médio em volume (mm)	DM - Diâmetro médio em massa (mm)
0,285	0,200	0,511

### 3.1.2 Teor de Humidade

O bagaço de azeitona apresenta por norma alto conteúdo em água (dependendo do método de extração), o que foi confirmado pelos resultados encontrados nas amostras estudadas neste trabalho, aos quais apresentaram valores médios de 50,2% de água para o bagaço “fresco”. Estes dados estão de acordo com Costa *et al.*, (2002) que reportaram valores de humidade entre 40 a 50% para sistemas de extração de duas fases e 60% para sistemas de centrifugação de três fases. Após a secagem, as amostras apresentaram um teor médio de humidade de 3,4%.

### **3.1.3 Índice de Peróxidos**

O índice de peróxidos foi determinado dois dias depois da receção da matéria-prima, tendo obtido um valor de 5,9 meq O<sub>2</sub>/kg. O valor obtido está dentro dos parâmetros legais. O limite máximo do índice de peróxido para que o azeite seja considerado próprio para o consumo humano é de 20 meq O<sub>2</sub>/kg. (Mailer *et al.*, 2006).

O índice de peróxidos (IP) mede o estado de oxidação do azeite e indica o seu estado de deterioração. Os peróxidos são os produtos primários da oxidação que levam à formação do ranço, e daí a sua formação ter um impacto considerável no tempo de prateleira e na aceitação do produto pelo consumidor.

### **3.1.4 Ácidos Gordos Totais**

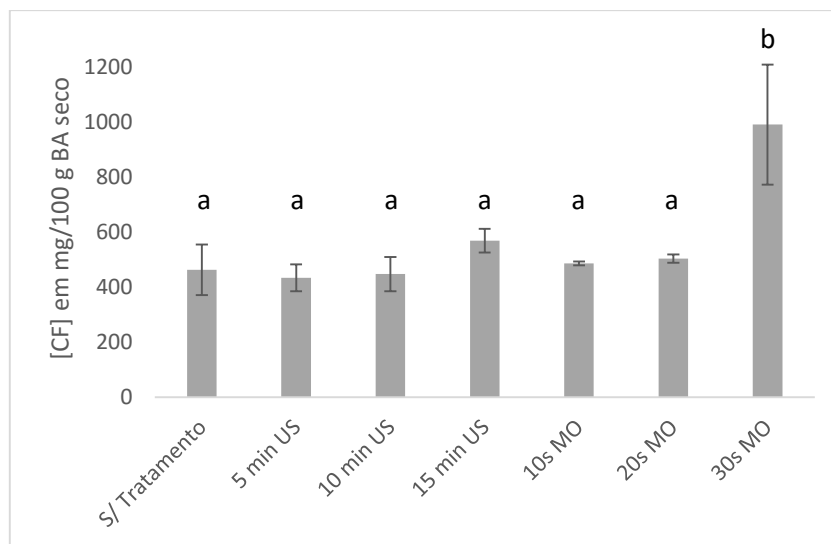
Relativamente ao teor em matéria gorda, obteve-se um valor médio de 6,7% de gordura. O bagaço de azeitona contém ainda uma quantidade de azeite residual (5 a 8%), que já não é possível extrair por meios físicos sendo a sua extração conseguida recorrendo a solventes orgânicos, permitidos por lei para a indústria alimentar (Ganhão, 2003; Proctor & Clark, 1993).

## **3.2 Extração dos Compostos Bioativos**

Para quantificar os compostos fenólicos nas amostras de bagaço de azeitona, recorreu-se às técnicas de extração assistidas por micro-ondas, ultrassons e combinações entre elas, placa de aquecimento e panela de evaporação (extração em escala piloto).

### **3.2.1 Extração por Técnicas Emergentes**

A Figura 3.2 apresenta o conteúdo em compostos fenólicos totais após a aplicação individual dos tratamentos (Micro-ondas e Ultrassons).



MO – Micro-ondas; US – Ultrassons.

**Figura 3.2:** Conteúdo em compostos fenólicos totais. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos ( $P < 0,05$ ).

Obteve-se um conteúdo em compostos fenólicos de  $462,8 \pm 92,2$  mg EAG/100 g de bagaço nas extrações sem tratamento. A adição de um novo tratamento, aumentou ligeiramente os resultados. Obteve-se conteúdos em compostos fenólicos de  $568,6 \pm 43,3$  e  $990,5 \pm 217,8$  mg EAG/100 g de bagaço para os tempos máximos da extração assistida pelo ultrassons e pelo micro-ondas respetivamente. Os tempos máximos mostraram ser mais eficazes do que os tempos intermédios (5 e 10 minutos de ultrassons ou 10 e 20 segundos de micro-ondas). A aplicação dos micro-ondas resultou numa extração mais eficiente na extração de compostos fenólicos comparativamente com os ultrassons. Apesar de ter havido um ligeiro aumento dos compostos fenólicos passado os 15 minutos de sonificação, não houve diferenças significativas em nenhuma das extrações (5 minutos -  $433,3 \pm 48,9$ , 10 minutos -  $447,2 \pm 62,7$  e 15 minutos  $568,6 \pm 43,3$  mg EAG/100 g de bagaço). Este facto mostra que o tempo de sonificação poderá ser um parâmetro importante na extração dos compostos bioativos.

Ahmad-Qasem *et al.*, (2013) refere que longos tempos de sonificação tornam-se ineficazes na extração de compostos fenólicos de folhas de oliveira em matrizes etanólicas (80/20 v/v). Os mesmos autores referem que em experiências de extração assistidas por ultrassons, o aumento do teor em fenóis nos extratos é quase insignificante, depois dos 15 min de extração.

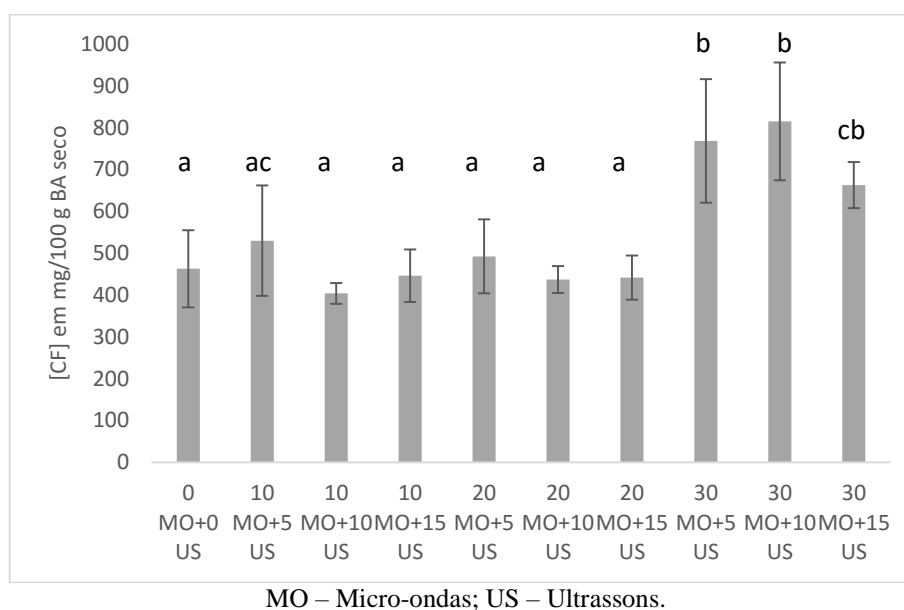
Por outro lado Rodrigues, Pinto e Fernandes (2008), também relataram que 15 minutos de sonificação seria suficiente para extrair os compostos fenólicos em amostras de coco.

Este facto poderá ser explicado pelo efeito do aquecimento e da exposição excessiva ao tratamento, o que levará à degradação dos compostos de especial interesse.

### 3.2.2 Combinação das Técnicas Emergentes de Extração

Os resultados mostraram que a técnica assistida pelo micro-ondas foi a que permitiu uma maior extração dos compostos fenólicos. Por esta razão optou-se por combinar os métodos de extração para testar o máximo de rendimento possível.

A combinação dos métodos, teve como principal objetivo, aumentar a eficiência das extrações. Os resultados obtidos para cada combinação estão apresentados na Figura 3.3.



**Figura 3.3:** Efeito dos diferentes tratamentos nos compostos fenólicos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos ( $P < 0,05$ ).

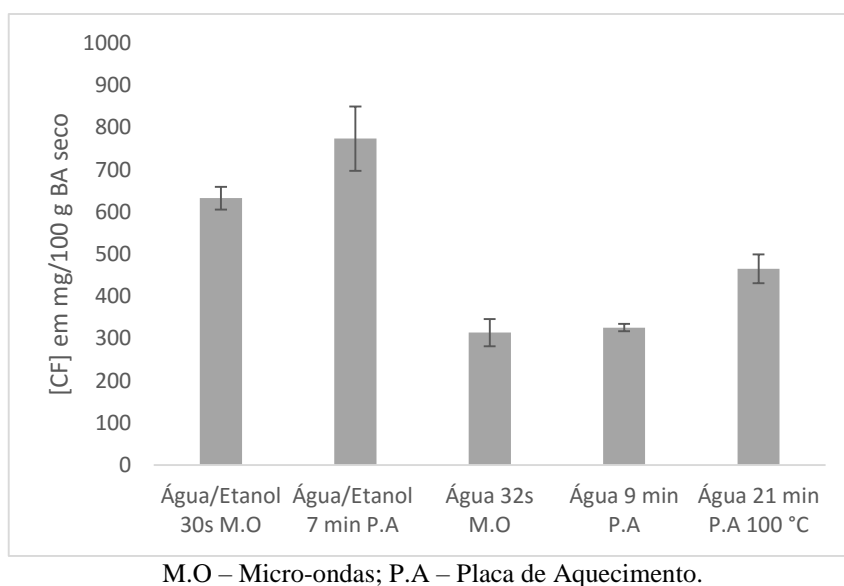
Quando o bagaço foi sujeito aos tratamentos combinados (ultrassons e micro-ondas), o teor em compostos fenólicos totais não aumentou significativamente, exceto quando foi

aplicado o máximo de tempo no micro-ondas, ou seja, houve diferenças significativas ( $P < 0,05$ ; anexo 1) em todas as combinações em que foi aplicado o tempo máximo de extração (30 segundos). O fator calor atingiu rapidamente a matriz em estudo, levando-o a libertar os compostos fenólicos para o solvente. A combinação 30 segundos de micro-ondas com 10 minutos de ultrassons revelou ser o mais eficaz na extração de compostos fenólicos comparativamente com as outras combinações, obtendo cerca de  $814,9 \pm 140,9$  mg EAG/100 g de bagaço seco. Porém, observando o gráfico da figura 3.2 em que estão apresentados os valores das experiências realizadas sem combinações, podemos verificar que a aplicação dos ultrassons não trouxe diferenças significativas ( $P > 0,05$ ; anexo 1) comparativamente com o micro-ondas. A experiência que apresentou melhores vantagens foi a extração assistida pelo micro-ondas, quando este foi aplicado o máximo do tempo (30 segundos) e na ausência de combinações. Obteve-se valores médios de  $990,5 \pm 217,8$  mg EAG/100 g de bagaço seco, o que levou a concluir que o efeito necessário na extração dos compostos fenólicos não seria de pressão sobre as amostras, mas sim de calor.

Este método possui características peculiares como promoção do aquecimento de forma rápida, uniforme e em pequenos intervalos de tempo. A extração dá-se ao aquecer o interior e o exterior da matriz por impulsos de micro-ondas. O aquecimento promovido leva ao aumento do volume e consequente rotura das células, libertando assim o seu conteúdo para a fase líquida (Alupului *et al.*, 2012). Esta poderá ser a principal razão para o aumento dos compostos fenólicos passado 30 segundos de extração. Ao comparar a extração assistida pelo micro-ondas com a extração assistida pelos ultrassons e a extração sem qualquer tratamento, é visível graficamente e estatisticamente a não existência de diferenças significativas ( $P > 0,05$ ; anexo 1). Com exceção do tempo máximo de extração pelo micro-ondas (30 segundos), não existiram diferenças significativas nas outras experiências, sendo eles combinados ou não. Este facto poderá ser explicado pela granulometria das matrizes em estudo. As amostras sofreram vários processos de moagem, o que permitiu aumentar a área superficial da moenda. O contacto entre a matriz e o solvente extrator aumentou só por si a quantidade de compostos fenólicos extraídos. O processo de moagem contribuiu para a rotura das células e consequente libertação dos compostos. Logo, a redução de dimensões poderá ter contribuído na extração dos compostos fenólicos.

### 3.2.3 Extração em Placa de Aquecimento

A aplicação dos micro-ondas resultou numa extração mais eficiente comparativamente com os ultrassons. O calor provocado pelos micro-ondas poderia ser o efeito necessário para extrair os compostos bioativos. Perante isto, decidiu-se testar a extração dos compostos bioativos utilizando uma placa de aquecimento. Os resultados obtidos para cada extração estão apresentados na Figura 3.4.



**Figura 3.4:** Comparação entre os métodos de extração.

Analisando a figura 3.4 é possível visualizar algumas diferenças entre os solventes de extração. Obteve-se melhores resultados para as matrizes etanólicas (70/30 v/v). Quando foi utilizada água como solvente, tanto na extração assistida pelo micro-ondas como na placa de aquecimento a 76 °C, o teor em compostos fenólicos totais não aumentou significativamente, exceto quando foi utilizado etanol e água (70/30 v/v) como solvente extrator em ambas as técnicas. Portanto, se compararmos as extrações etanólica com as extrações em água é possível concluir a existência de diferenças significativas. A extração etanólica processada na placa de aquecimento (7 minutos a 76 °C) revelou ser a mais eficaz na extração dos compostos fenólicos comparativamente com as outras extrações, obtendo cerca de  $773,8 \pm 76,4$  mg EAG/100 g de bagaço seco. A extração etanólica assistida pelo micro-ondas também revelou ser eficaz, porém, a

quantidade de compostos fenólicos obtidos foi menor que os compostos extraídos da placa de aquecimento. Por outro lado, a extração em água durante 21 minutos a 100 °C também revelou ser eficaz, aumentando consideravelmente os resultados. Esta experiência mostrou que é possível extrair uma grande quantidade de compostos fenólicos utilizando somente água como solvente, diminuindo assim os custos dos reagentes. Porém, o tempo de processamento será sempre superior ao tempo de processamento dos processos emergentes.

As extrações etanólicas permitiram extrair maiores quantidades de compostos fenólicos, todavia, a diferença reside no tempo e nos custos de processamento. Foi possível obter uma grande quantidade de compostos fenólicos utilizando a placa de aquecimento. No entanto, o tempo de processamento gasto foi muito superior comparativamente com as extrações etanólicas no micro-ondas.

#### **3.2.4 Extração em Escala Piloto**

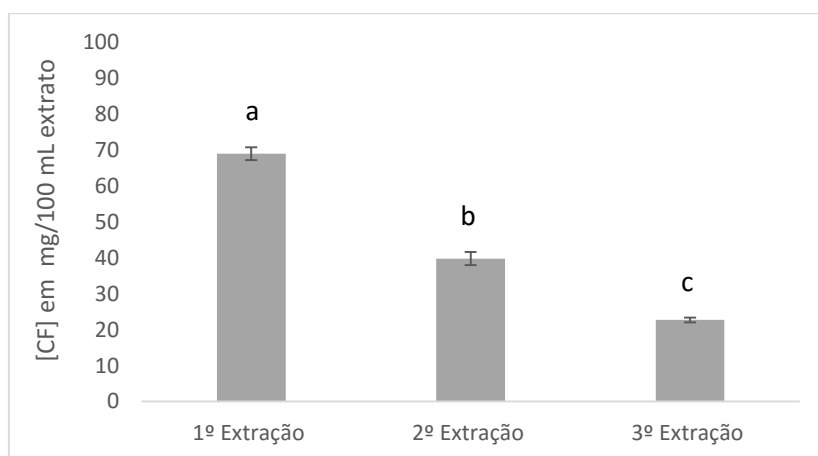
As extrações realizadas na placa de aquecimento serviram como suporte para o aumento da escala de produção. Os resultados mostraram uma grande eficácia na extração dos compostos fenólicos. Visto isto, e com o intuito de reduzir os custos de produção, decidiu-se fazer o aumento da escala de produção utilizando o mesmo conceito da placa de aquecimento. Portanto, optou-se por fazer o aumento da escala de produção numa panela de evaporação a 100 °C, durante 10 minutos utilizando água como solvente na extração.

A extração em escala piloto representa um aumento das condições de trabalho e dos resultados finais. Esta etapa é essencial para qualquer transferência de energia, visto anteceder a escala industrial.

Para caracterizar os extratos obtidos, recorreu-se à determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais, flavonóides e a capacidade antioxidante.

### 3.2.4.1 Conteúdo em Compostos Fenólicos

Relativamente ao conteúdo em compostos fenólicos, os resultados obtidos para as três extrações estão representados no gráfico que se segue figura 3.5.



**Figura 3.5:** Conteúdo em compostos fenólicos totais dos extratos das diferentes extrações. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre extrações ( $P < 0,05$ ).

A figura 3.5 apresenta valores em compostos fenólicos totais de  $69 \pm 1,8$ ;  $39,8 \pm 1,8$  e  $22,7 \pm 0,7$  mg/100 mL de extrato para a primeira, segunda e terceira extrações, respetivamente. Como já era de esperar, e seguindo a lógica das extrações, a quantidade de compostos extraídos tendeu a diminuir após a primeira extração verificando-se diferenças significativas ( $P < 0,05$ ; anexo 2) em todos os casos.

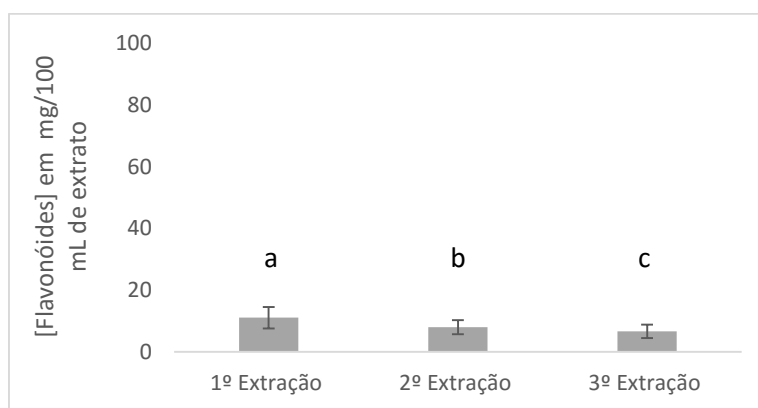
As sucessivas extrações permitiram extrair maiores quantidades de compostos bioativos. Para além disso, provou-se que é necessário realizar mais do que uma extração para se obter bons rendimentos. Contudo, o rendimento obtido poderá não compensar o gasto energético necessário para a terceira extração. Outro fator importante a ter em conta será a excessiva exposição dos compostos ao calor. Normalmente, o aumento do tempo e da temperatura promovem a solubilidade das amostras, mas poderá também contribuir para a degradação dos compostos fenólicos.

Vitagliano (2013), nas suas experiências também conseguiu extrair cerca de 60 e 100 mg/mL de EAG para a primeira e segunda extração respetivamente em folhas de oliveira (2 etapas de 90 minutos entre 70 e 90 °C utilizando água).

Segundo Ferreira, *et al.*, (2015), o comportamento das extrações nem sempre é linear, podendo existir uma grande variabilidade no material vegetal. As amostras podem apresentar concentrações distintas de vários compostos, levando à obtenção de extratos com diferentes características. Por vezes, dentro do mesmo tipo de subprodutos é possível observar variações composicionais como consequência da variabilidade entre espécies, fatores ambientais e extensão do processamento da matéria-prima que podem ter impacto na sua atividade antioxidante e propriedades biológicas.

### 3.2.4.2 Conteúdo em Flavonóides

Relativamente ao conteúdo em flavonóides, os resultados obtidos para as três extrações estão representados na figura 3.6.



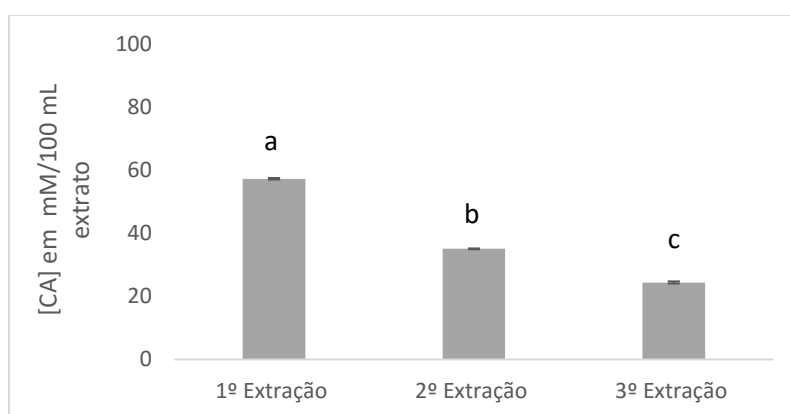
**Figura 3.6:** Conteúdo em flavonóides dos extratos das diferentes extrações. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre extrações ( $P < 0,05$ ).

Obteve-se valores em flavonóides de  $11,1 \pm 0,2$ ;  $8 \pm 0,2$  e  $6,7 \pm 0,4$  mg/100 mL de extrato para a primeira, segunda e terceira extrações, respetivamente. Apesar de se ter obtido uma gama de valores inferiores aos compostos fenólicos, mais uma vez conseguiu-se demonstrar que é possível extrair mais compostos à medida que se avança no número de extrações. A diferença é mínima, porém significativa ( $P < 0,05$ ; anexo 2).

### 3.2.4.3 Capacidade Antioxidante

A capacidade antioxidante foi o último parâmetro analisado para este bloco de experiências. Seguindo a lógica dos outros parâmetros, este não teve comportamento diferente. Portanto, houve diferenças significativas ( $P < 0,05$ ; anexo 2) em todas as extrações.

Através da figura 3.7, foi possível constatar que a primeira extração apresentou uma elevada capacidade antioxidante, tendo obtido valores na ordem dos  $57,4 \pm 3,5$  mM/100 mL de extrato. No entanto, quando o bagaço foi sujeito às sucessivas extrações (2ª e 3ª extração) houve uma diminuição de  $35,1 \pm 2,3$  e  $24,4 \pm 2,2$  mM/100 mL de extrato sobre a capacidade antioxidante da segunda e terceira extrações.



**Figura 3.7:** Capacidade antioxidante dos extratos das diferentes extrações. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre extrações ( $P < 0,05$ ).

Duarte (2011), durante as suas pesquisas também obteve valores da capacidade antioxidantes na ordem de 50 a 60 mM/100 mL nos extratos aquosos obtidos a partir do bagaço de azeitona.

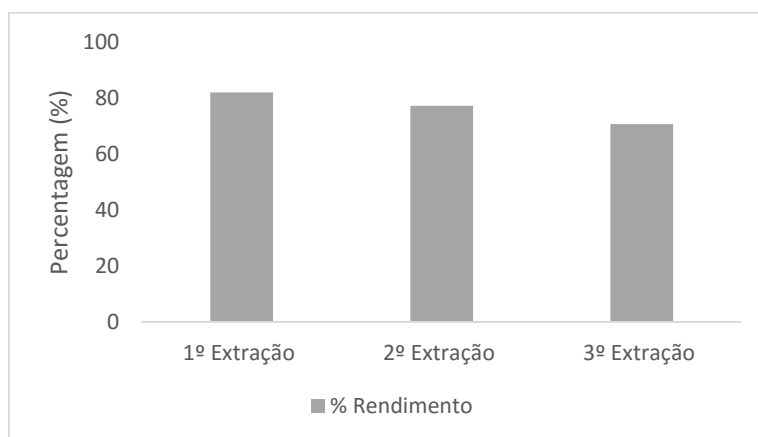
De facto, as sucessivas extrações parecem funcionar como um incremento no rendimento dos compostos. Estes serviram para provar, uma vez mais, que o processo de extração não poderá ser feito numa única etapa. O processo de extração só ficará completo recorrendo a múltiplas extrações. Porém, múltiplas etapas de extração exigem a utilização de grandes quantidades de solventes, durante muito mais tempo e a elevadas temperaturas, o que poderá conduzir à termodegradação dos compostos de interesse.

### 3.3 Extratos Encapsulados por Atomização com Maltodextrina

Para a caracterização do material encapsulado recorreu-se a métodos físico-químicos como: rendimento, teores em humidade, atividade da água, cor, conteúdo em compostos fenólicos totais, conteúdo em flavonóides e atividade antioxidante.

#### 3.3.1 Rendimento

Após o processo de secagem por atomização obteve-se valores de rendimento de 82%; 77,3% e 70,7% para os extratos da primeira, segunda e terceira extrações, respetivamente (Figura 3.8).



**Figura 3.8:** Rendimento da secagem por *spray dryer*.

Esta experiência teve como finalidade principal determinar o rendimento do processo de secagem por atomização. Procedeu-se ao encapsulamento dos extratos da primeira, segunda e terceira extrações. O rendimento foi calculado, através da razão da massa em pó obtida no processo de secagem e a quantidade de sólidos presentes em cada amostra. As percentagens de perda variaram ligeiramente entre as extrações, porém, não foram relevantes para esta experiência. Este facto poderá ter ocorrido por questões de viabilidade técnica do equipamento, ou mesmo, durante a recuperação do material encapsulado.

### 3.3.2 Teor de Humidade

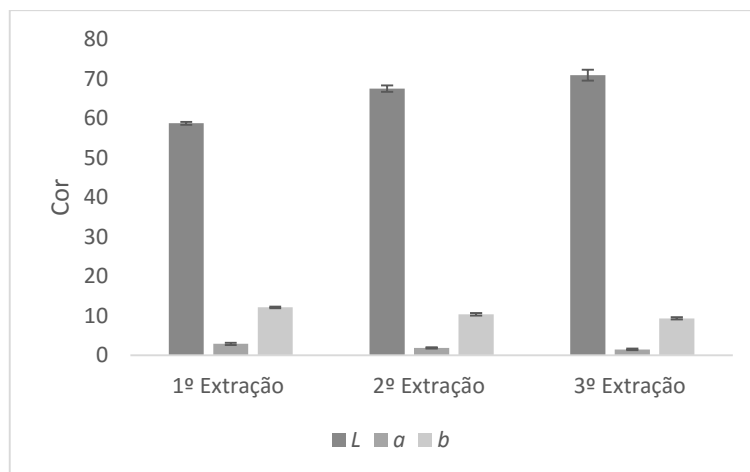
A percentagem de humidade para as três extrações, foi de 4%, 4,3% e 4,1% para os extratos da primeira, segunda e terceira extrações, respetivamente. Estes valores estão dentro dos valores recomendados. O teor de humidade de um produto seco pode ser considerado como um indicador de qualidade do pó e do processo de secagem. Valores abaixo de 7% indicam uma boa qualidade do pó (Zhang *et al.*, 2010).

### 3.3.3 Atividade da Água ( $a_w$ )

Após a secagem dos extratos no *spray dryer*, obteve-se valores de  $a_w$  de 0,202; 0,257 e 0,188 para os extratos da primeira, segunda e terceira extrações, respetivamente. Estes valores são considerados baixos e estão dentro dos limites necessários para conservar um alimento seco (em pó). Nesta gama de valores não há dissolução dos componentes do alimento pela água, o que reduz a velocidade das reações.

### 3.3.4 Avaliação da Cor

Os resultados da avaliação da cor estão representados na figura 3.9. O parâmetro  $L$  apresentou valores distintos de luminosidade, já que a concentração dos extratos era diferente. Em relação aos valores de  $b$ , estes são positivos em todas as extrações, correspondendo à cor amarela. Quanto aos valores de  $a$ , também foram positivos em todas as extrações, correspondendo à cor vermelha.



**Figura 3.9:** Parâmetro  $L$ ,  $a$  e  $b$  da cor dos encapsulados.

Obteve-se valores de luminosidade de  $58,8 \pm 0,3$ ;  $67,6 \pm 0,8$  e  $71 \pm 1,4$  para os extratos da primeira, segunda e terceira extrações, respetivamente. Os extratos encapsulados foram adquirindo valores superiores de luminosidade à medida que se ia avançando nas extrações, ou seja, quanto maior for a concentração dos extratos, mais escuros serão as amostras e menor é o valor de luminosidade. O objetivo das sucessivas extrações foi retirar o máximo de compostos bioativos possível e, à medida que os compostos foram diminuindo com as sucessivas extrações, a luminosidade também aumentou. Como já era de esperar, a concentração da primeira extração foi muito superior às concentrações da segunda e terceira extrações. Este facto é comprovado pelo parâmetro da luminosidade.

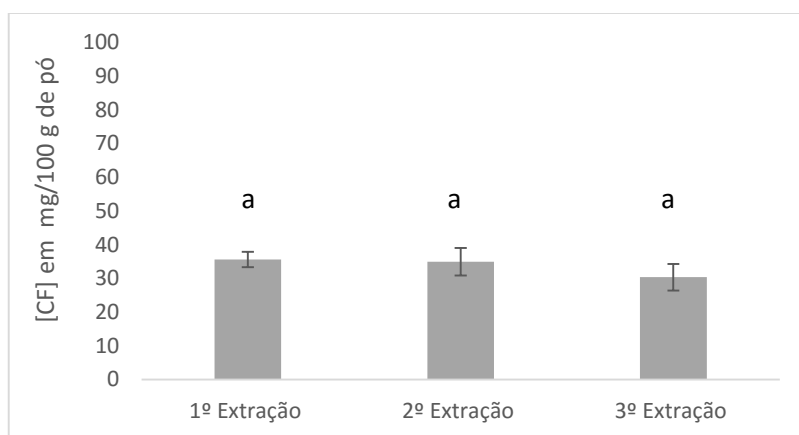
Relativamente ao parâmetro  $a$ , os resultados apresentaram um comportamento contrário ao parâmetro luminosidade. Assim sendo, obteve-se valores de  $a$  de  $2,9 \pm 0,3$ ;  $1,9 \pm 0,1$  e  $1,5 \pm 0,2$  para os extratos da primeira, segunda e terceira extrações, respetivamente. Os valores diminuíram à medida que se avançou nas extrações. Seguindo a mesma lógica da luminosidade, à medida que a concentração dos extratos diminuiu, a tonalidade vermelha também diminuiu, o que prova mais uma vez que as sucessivas extrações serviram para extrair ainda mais compostos.

Considerando a coordenada  $b$ , que indica a cor amarela (valores positivos) e azul (valores negativos), os resultados indicaram uma cor amarela para o material encapsulado. Foram obtidos valores de  $b$  de  $12,2 \pm 0,2$ ;  $10,4 \pm 0,4$  e  $9,4 \pm 0,3$  para os extratos da primeira, segunda e terceira extrações, respetivamente. Este parâmetro

também não apresentou um comportamento diferente em relação aos outros parâmetros. A primeira extração apresentou um valor superior aos valores da segunda e terceira extrações, como seria de esperar, já que a primeira extração continha maiores quantidades de compostos, o que levou ao escurecimento da solução. A segunda e a terceira extrações apresentaram valores inferiores, o que comprovou mais uma vez, a teoria das extrações sucessivas.

### 3.3.5 Conteúdo em Compostos Fenólicos Totais

A figura 3.10 apresenta os resultados obtidos após o encapsulamento dos extratos (primeira, segunda e terceira extrações) com maltodextrina relativamente ao conteúdo em compostos fenólicos totais.



**Figura 3.10:** Conteúdo em compostos fenólicos totais dos encapsulados das diferentes extrações. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre extrações ( $P < 0,05$ ).

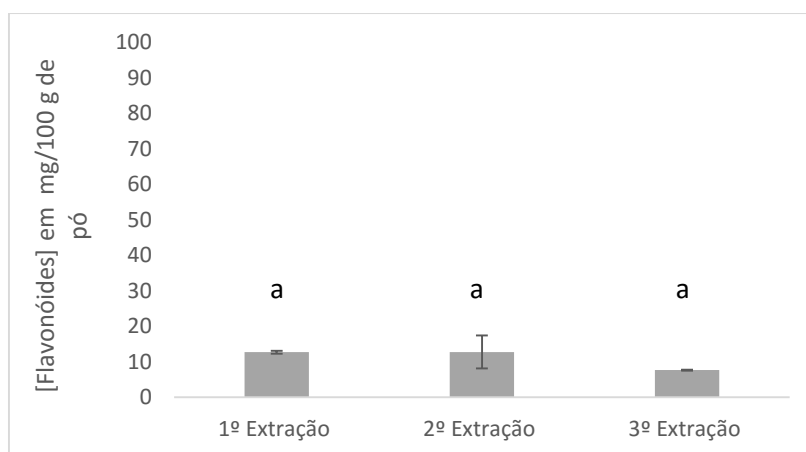
Foram obtidos valores em compostos fenólicos de  $35,6 \pm 2,3$ ;  $34,9 \pm 4,1$  e  $30,3 \pm 3,9$  mg/100 g da amostra para a primeira, segunda e terceira extrações, respetivamente. À medida que se avançou no número de extrações, a concentração dos extratos também foi diminuindo. Porém, esta situação não se verificou nos extratos encapsulados, uma vez que não houve diferenças significativas ( $P > 0,05$ ; anexo 3) nas concentrações do material encapsulado.

Duarte (2011), também obteve valores semelhantes durante a extração e encapsulamento de compostos bioativos presente no bagaço de azeitona. O autor obteve valores em compostos fenólicos compreendidos entre 40 a 60 mg EAG/100 g de

partícula para extratos obtidos pela extração supercrítica e encapsulados a diferentes temperaturas (120, 155 e 190 °C). Ainda na mesma experiência, mas utilizando o n-hexano como solvente extrator, o mesmo autor obteve valores compreendidos entre 20 a 40 mg EAG/100 g de partícula.

### 3.3.6 Conteúdo em Flavonóides

O conteúdo em flavonóides (Figura 3.11) também foi determinado nos encapsulados das 3 extrações e não se verificaram diferenças significativas entre as diferentes amostras ( $P > 0,05$ ; anexo 3).

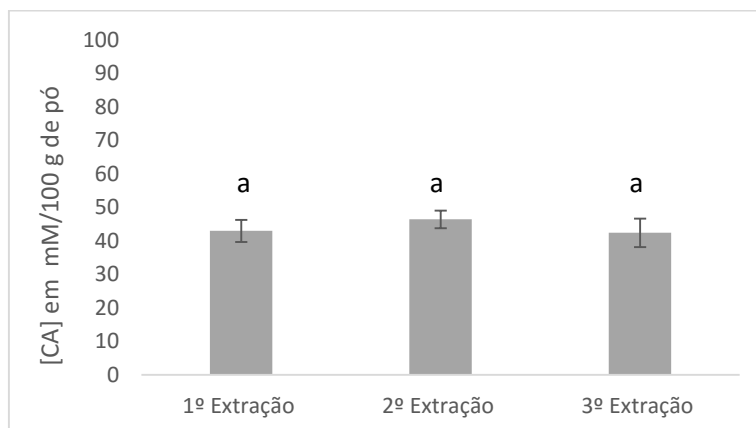


**Figura 3.11:** Conteúdo em flavonóides dos encapsulados das diferentes extrações. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre extrações ( $P < 0,05$ ).

Foram obtidos valores em flavonóides de  $12,7 \pm 0,4$ ;  $12,8 \pm 4,6$  e  $7,7 \pm 0,1$  mg/100 g da amostra para a primeira, segunda e terceira extrações, respectivamente. Este parâmetro embora esteja em menores quantidades, comparativamente com os compostos fenólicos, veio confirmar o comportamento dos mesmos durante o processo de secagem por atomização. Não houve diferenças significativas, em nenhuma das amostras, porém, o comportamento foi idêntico ao dos compostos fenólicos totais.

### 3.3.7 Capacidade Antioxidante

Na figura que se segue (Figura 3.12) estão representadas os valores da capacidade antioxidante dos extratos encapsulados com maltodextrina e quantificadas pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).



**Figura 3.12:** Capacidade antioxidante dos encapsulados das diferentes extrações. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre extrações ( $P < 0,05$ ).

Os extratos provenientes da primeira, segunda e terceira extrações apresentaram uma capacidade antioxidante, de  $42,9 \pm 3,3$ ;  $46,4 \pm 2,6$  e  $42,4 \pm 4,2$  mM/100 g de pó respectivamente. Seguindo a lógica dos outros parâmetros, este também não teve comportamento diferente. Através dos resultados obtidos, foi possível verificar a não existência de diferenças significativas ( $P > 0,05$ ; anexo 3) entre as extrações. Este parâmetro serviu para provar que foi possível realizar múltiplas extrações, e que em todas elas, foi possível extrair compostos de especial interesse e com capacidades antioxidantes. As sucessivas extrações podem funcionar como um incremento no rendimento das experiências enquanto o encapsulamento surge como medida de proteção desses mesmos compostos.

### 3.4 Aplicação do Bagaço de Azeitona Extratado

A título de comparação, preparou-se duas receitas de pães (figura 3.13), uma das receitas foi efetuada de forma tradicional e sem adição do bagaço de azeitona e uma outra, em que se substituiu parte da farinha de trigo pela farinha do bagaço de azeitona (4,8%).



**Figura 3.13:** Etapas da produção dos pães.

Para a classificação e caracterização dos pães, recorreu-se a métodos físico-químicos como: cor, teor de humidade, atividade da água, análise do perfil de textura e o conteúdo em compostos fenólicos totais.

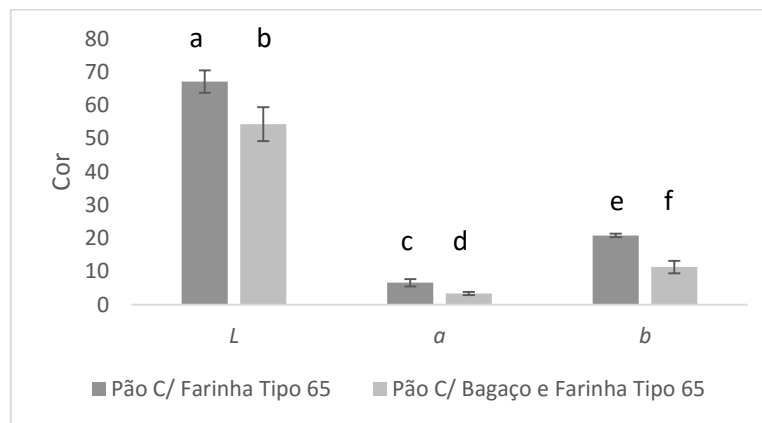
#### 3.4.1 Avaliação da Cor

A cor foi determinada na superfície (crosta) e no interior (miolo) dos pães, conforme se pode visualizar na figura seguinte (Figura 3.14).



**Figura 3.14:** Representação dos pães cozidos e corte transversal.

Os resultados da avaliação da cor estão representados graficamente nas figuras que se seguem.



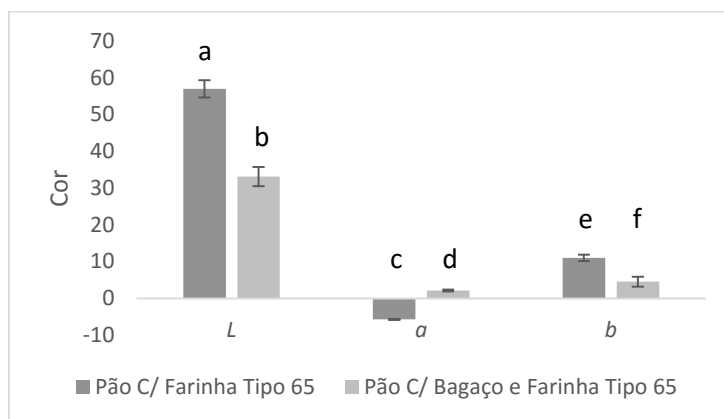
**Figura 3.15:** Parâmetro *L*, *a* e *b* da cor na superfície dos pães. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os pães ( $P < 0,05$ ).

Os pães da receita original (sem adição do bagaço de azeitona) e os pães da receita mista (com adição do bagaço de azeitona) apresentaram valores de luminosidade de  $67,1 \pm 3,4$  e  $54,3 \pm 5,1$  respetivamente. Através da figura 3.15, foi possível verificar que a luminosidade diminuiu com a introdução do bagaço de azeitona na receita. O parâmetro luminosidade apresentou diferenças significativas ( $P < 0,05$ ; anexo 4) tanto nos pães da receita original como nos pães da receita mista. Este facto é explicado pela elevada quantidade de pigmentos que são provenientes do material vegetal. Estes pigmentos conferiram uma tonalidade mais escura às amostras com o bagaço de azeitona.

Relativamente ao parâmetro *a*, os resultados também diminuiram com a introdução do bagaço de azeitona nas amostras, existindo diferenças significativas ( $P < 0,05$ ; anexo 4)

nas duas fórmulas. Foram obtidos valores de  $a$  de  $6,6 \pm 1,1$  e  $3,4 \pm 0,5$  para os pães da receita original (sem adição do bagaço de azeitona) e os pães da receita mista (com adição do bagaço de azeitona), respectivamente (corresponde a uma cor vermelha). Considerando ainda o parâmetro  $b$ , os resultados, indicaram uma cor amarela e diferenças significativas ( $P < 0,05$ ; anexo 4) para ambos os casos. Os valores de  $b$  foram  $20,8 \pm 0,6$  e  $11,3 \pm 1,9$  para os pães da receita original (sem adição do bagaço de azeitona) e os pães da receita mista (com adição do bagaço de azeitona), respectivamente. A receita original apresentou valores superiores aos valores da receita mista, como já era de esperar, já que a receita mista continha maiores quantidades de pigmentos, contribuindo para o escurecimento dos pães.

Relativamente ao interior dos pães (miolo), os resultados indicaram a existência de diferenças significativas ( $P < 0,05$ ; anexo 4) em todos os parâmetros analisados ( $L$ ,  $a$  e  $b$ ). O parâmetro  $L$  (luminosidade) apresentou o mesmo comportamento que a superfície dos pães (crosta) (Figura 3.16).



**Figura 3.16:** Parâmetro  $L$ ,  $a$  e  $b$  da cor do interior dos pães. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os pães ( $P < 0,05$ ).

Foram obtidos valores de luminosidade entre  $56,9 \pm 2,3$  e  $33,1 \pm 2,6$  para os pães da receita original (sem adição do bagaço de azeitona) e os pães da receita mista (com adição do bagaço de azeitona) respectivamente. Contudo, foram obtidos valores de luminosidade menores quando comparados com a luminosidade da crosta. A luminosidade também diminuiu no interior dos pães produzidos com a adição do bagaço de azeitona quando comparada com o tipo de receita.

Em relação aos valores da coordenada  $a$  foram obtidos valores de  $-5,7 \pm 0,2$  e  $2,2 \pm 0,2$  para os pães da receita original e os pães da receita mista, respetivamente. Os valores da coordenada  $a$ , são positivos na receita mista (com adição do bagaço de azeitona), correspondendo à cor vermelha e negativos na receita original (sem adição do bagaço de azeitona) correspondendo à cor verde.

Relativamente ao parâmetro  $b$ , obtiveram-se valores de  $10,9 \pm 0,9$  para os pães da receita original e  $4,6 \pm 1,4$  para os pães da receita mista. Os resultados do parâmetro  $b$ , no interior dos pães indicaram a cor amarela para ambos os casos. Foram obtidos valores inferiores no interior dos pães quando comparados com a superfície dos mesmos.

### **3.4.2 Teor de Humidade**

A percentagem de humidade obtida foi de  $20,9 \pm 0,4$  para os pães da receita original e  $21,6 \pm 0,7$  para os pães da receita mista. Estes valores estão dentro dos limites estabelecidos por lei. O teor máximo de humidade admitida para o pão de trigo fabricado com farinha de trigo dos tipos 55 e 65 e cujas massas nominais são inferiores a 250 g é de 30% (Portaria n.º 425/98 de 25 de Julho).

### **3.4.3 Atividade da Água**

Foram obtidos valores de  $a_w$  de  $0,873 \pm 0,01$  para os pães da receita original e  $0,900 \pm 0,006$  para os pães da receita mista. Estes valores são considerados altos, o que leva, ao aumento da probabilidade de contaminação por microrganismos.

### **3.4.4 Análise do Perfil de Textura**

Os valores referentes à textura dos pães (deformação, dureza, gomosidade, adesividade, coesividade, elasticidade, mastigabilidade e percentagem de deformação) encontram-se representados na tabela 3.2.

**Tabela 3.2:** Análise do perfil de textura dos pães.

Parâmetros	Pão - Farinha tipo 65	Pão - Farinha tipo 65 e Farinha de BA
Dureza (g)	1529,2 ± 208,6 (a)	1551,7 ± 124,2 (a)
Gomosidade (g)	772 ± 80,6 (b)	604,9 ± 60,2 (b)
Adesividade (g.s)	-4,2 ± 0,3 (c)	-6,3 ± 0,1 (c)
% Deformação	64,2 ± 4,8 (d)	65,8 ± 4,1 (d)
Coesividade (-)	0,5 ± 0,1 (e)	0,4 ± 0,0 (e)
Mastigabilidade (g.mm)	6637,3 ± 802,5 (f)	4169,3 ± 1084,9 (g)
Elasticidade (mm)	8,6 ± 0,4 (h)	6,8 ± 1,1 (h)
Deformação (mm)	11 ± 0,01 (i)	11 ± 0,01 (i)

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os parâmetros e entre colunas (P<0,05).

Analisando os dados estatisticamente, os resultados indicaram a não existência de diferenças significativas (P>0,05; anexo 5) em nenhum dos parâmetros analisados (deformação, dureza, gomosidade, adesividade, coesividade e percentagem de deformação), com exceção do parâmetro mastigabilidade (P<0,05; anexo 5) que obteve valores à volta de 6637,3 ± 802,5 g.mm para os pães da receita original e 4169,3 ± 1084,9 g.mm para os pães da receita mista. Este parâmetro corresponde ao trabalho necessário para mastigar uma amostra sólida até um estado de equilíbrio da deglutição (elasticidade x gomosidade) (Martinez *et al.*, 2004). A farinha do bagaço de azeitona poderá ter favorecido os valores inferiores do parâmetro da mastigabilidade dos pães contribuindo assim para uma maior facilidade na mastigabilidade.

Relativamente à dureza, ou a força máxima necessária para comprimir as amostras, verificou-se que a carga máxima aplicada não variou significativamente entre as amostras, tendo obtido valores de 1529,2 ± 208,6 g para as amostras dos pães da receita original e 1551,7 ± 124,2 g para os pães da receita mista.

Relativamente à adesividade, obteve-se -4,2 ± 0,3 g.s para as amostras dos pães da receita original e -6,3 ± 0,1 g para os pães da receita mista.

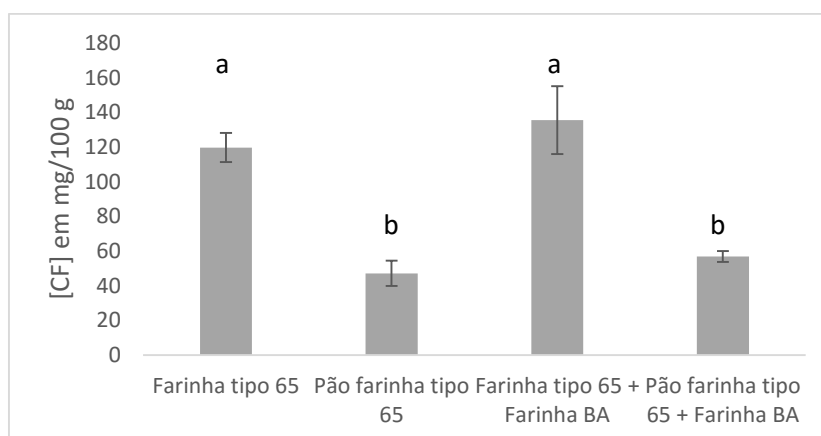
Para a coesividade ou a razão entre a energia necessária para a segunda compressão e a energia necessária para a primeira compressão (Martinez *et al.*, 2004), obteve-se 0,5 ± 0,1 g para os pães da receita original e 0,4 ± 0,03 g para os pães da receita mista.

Relativamente ao parâmetro gomosidade, que representa a força máxima necessária para desintegrar uma amostra semi-sólida a um estado de equilíbrio da deglutição (dureza x coesividade), (Martinez *et al.*, 2004), obteve-se  $772,0 \pm 80,6$  g para os pães da receita original e  $604,9 \pm 60,2$  g para os pães da receita mista.

A percentagem de deformação também não teve comportamento diferente. Obteve-se uma percentagem de  $64,2 \pm 4,8$  para as amostras dos pães da receita original e  $65,8 \pm 4,1$  para os pães da receita mista. O parâmetro deformação apresentou os mesmos resultados para as ambas as receitas, tendo obtido  $11 \pm 0,01$  mm.

### 3.4.5 Conteúdo em Compostos Fenólicos Totais

Para a determinação do conteúdo em compostos fenólicos totais, optou-se por analisar as amostras antes e depois da produção dos pães. Portanto, analisou-se as amostras da farinha de trigo tipo 65 e amostras da farinha de trigo tipo 65 com adição da farinha do bagaço de azeitona. Após a preparação e cozedura dos pães, determinou-se também o conteúdo em compostos fenólicos totais nas amostras do pão confeccionado com farinha de trigo tipo 65 e no pão confeccionado com farinha de trigo tipo 65 com adição da farinha do bagaço de azeitona. Os resultados obtidos para cada caso, estão representados na figura que se segue (Figura 3.17).



**Figura 3.17:** Conteúdo em compostos fenólicos totais dos pães. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os pães ( $P < 0,05$ ).

Analisando o gráfico da figura 3.17, foram obtidos valores em compostos fenólicos de  $119,8 \pm 8,5$  mg/100 g nas amostras da farinha de trigo tipo 65 e  $47,1 \pm 7,3$  mg/100 g nas

amostras do pão confeccionado com a mesma farinha. Obteve-se ainda  $135,6 \pm 19,5$  mg/100 g nas amostras da farinha de trigo tipo 65 com adição da farinha do bagaço de azeitona e  $56,9 \pm 3,2$  mg/100 g nas amostras do pão confeccionado com a mesma farinha.

O conteúdo em compostos fenólicos totais diminuiu após a confeção dos pães. Este facto é explicado pela elevada exposição dos pães à temperatura de cozedura ( $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), o que levou a degradação dos compostos fenólicos. O calor e o tempo de cozedura provaram ser um dos obstáculos na transferência dos compostos bioativos para os pães. Adicionou-se à farinha de trigo tipo 65 uma pequena percentagem (4,8%) da farinha do bagaço de azeitona, e este também não contribuiu muito em termos de compostos fenólicos. Os resultados não apresentaram diferenças significativas em nenhuma das experiências ( $P > 0,05$ ; anexo 6). Esta percentagem foi selecionada através da resposta de provadores a uma análise sensorial feita de forma informal. As respostas acabaram por ditar o uso de uma pequena percentagem da farinha do bagaço de azeitona. Os pontos positivos da adição da farinha do bagaço de azeitona ao pão será a cor e possivelmente o conteúdo em fibras. Segundo Albuquerque *et al.*, (2004), o bagaço de azeitona, contém cerca 63% de fibras. A cor por ter sido um parâmetro notório em todas as amostras e com uma forte presença. As fibras poderão contribuir positivamente para a formulação dos pães, caso estejam presentes. Segundo Mello (2009), as fibras não são digeridas e nem absorvidas pelo organismo, o seu consumo ajuda a controlar os níveis de açúcar no sangue ao regular os níveis de insulina, ajuda a reduzir os níveis de colesterol no sangue e também o risco de alguns tipos de cancro. As fibras melhoram a função intestinal e evitam muitos fatores de risco cardiovascular.

#### **4. Considerações Finais**

A aplicação dos micro-ondas resultou numa extração mais eficiente na extração de compostos bioativos comparativamente com os ultrassons. O melhor resultado da experiência centrou-se na extração assistida pelo micro-ondas, quando este foi aplicado durante 30 segundos e na ausência de combinações. Foram obtidos valores de  $990,5 \pm 217,8$  mg EAG/100 g de bagaço seco.

Foi possível realizar múltiplas extrações e de todas elas extrair compostos importantes e com capacidades antioxidantes. Provou-se que é possível encapsular os compostos bioativos com maltodextrina e obter bons rendimentos. As sucessivas extrações podem funcionar como um incremento no rendimento das experiências, e o encapsulamento surge como uma medida de proteção dos compostos extraídos.

Depois da extração do azeite e dos compostos bioativos, será possível ainda reaproveitar a farinha do bagaço de azeitona para fins alimentares, (produtos de panificação) e com possíveis benefícios para a saúde. O bagaço ao ser utilizado na formulação de um novo produto, poderá passar a ser uma fonte de compostos de considerável valor, como é o caso das fibras.

Além da possibilidade de utilizar este resíduo como matéria-prima, e de ser obtido a baixo custo e em grande quantidade, outro fator que justifica o seu aproveitamento será a redução do impacto ambiental, causado pela sua deposição no ambiente.

A valorização de subprodutos é uma questão de grande relevo no cenário atual, devido à combinação da legislação ambiental cada vez mais exigente, com a escassez de recursos naturais importantes. Este cenário aparece cada vez mais, como sendo um grande problema a resolver, e na indústria oleica não será uma exceção.

Este trabalho contribuirá para a criação de novos caminhos não só na indústria alimentar, como de outras indústrias, como por exemplo a indústria farmacêutica e cosmética.

## **5. Perspetivas de Trabalho Futuro**

Para complementar os estudos realizados, dando continuidade ao processo de valorização dos resíduos e subprodutos da extração do azeite, seria importante estudar em maior profundidade os seguintes aspetos:

- Testar a aplicação dos compostos encapsulados em diferentes produtos alimentares com vista a melhorar a qualidade dos mesmos.
- Determinar a composição nutricional do bagaço de azeitona, para perceber quais os benefícios e as suas aplicabilidades.
- Fazer a caracterização nutricional e a análise sensorial dos produtos produzidos a partir da farinha do bagaço de azeitona.
- Testar a utilização do bagaço de azeitona de outras variedades e provenientes de outros sistemas de extração do azeite para obtenção dos compostos bioativos.

## 6. Referências Bibliográficas

- Ahmad-Qasem M., Cánovas J., Barrajón-Catalán E., Micol V., Cárcel A.J. & García-Pérez J.V. (2013). Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 120 – 129.
- Alarcão, A. (1995). A oliveira - Classificação e descrição botânica – *Vida Rural*, 1605: 28 – 31.
- Albuquerque, J; Gonzalvés, J; García, D; Cegarra, J. (2004). “Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction”. *Bioresource Technology*, 91:195 – 200.
- Aliakbarian, B., Paini, M., Casazza, A. A., Perego, P. (2015). Effect of encapsulating agent on physical-chemical characteristics of olive pomace polyphenols-rich extracts, *Chemical Engineering Transactions*, 43, 97-102 DOI: 10.3303/CET1543017.
- Alúdt, M. H., (2010) Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake. *Food Chemistry*, London, v. 123, n. 1, p. 117-122.
- Alupului, A., Călinescu, I., & Lavric, V. (2012). Microwave Extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, 74(2), 129 –142.
- Ângelo, P. M., e Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 66 (1), 1 – 9.
- Apintanapong, M. & Noomhorm, A. (2003). The use of spray-drying to microencapsulate 2-acetyl-1-pyrroline, a major flavour component of aromatic rice. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 95 – 102.
- Artajo, L. S., Romero, M. P., Suárez, M., Motilva, M. J. (2007). Partition of phenolic compounds during the virgin olive oil industrial extraction process. *European Food Research and Technology*. 225:617- 625.
- Assunção, L. C., Ferreira, C. D., da Conceição, E. J. L., Nunes, I. L. (2014). Estudo prospectivo sobre encapsulamento de compostos bioativos. *Revista Geintec*, 4 (2237-0722), 1382 – 1391.
- Augustin, M.A., Hemar, Y. (2009). Nano and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38, 902 – 912.
- Azeredo, H.M.C. (2005). Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimentos e nutrição Araraquara*: 89 - 97.
- Barreiros, A. L. B. S., David, J. M. e David, J. P. (2006). Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 29: 113 - 123.
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M. P. e Piatti, E. (2007). Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. *Food Chemistry*. 104: 1635 - 1640.
- Brazel, C. S. (1999). Microencapsulation: offering solutions for the food industry. *Cereal Foods World*, 44, 6, 388 – 393 pp.

- Carratù, B., & Sanzini, E. (2005). Biologically-active phytochemicals in vegetable food. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 41(1), 7 – 16.
- Castro, M. D. L., Capote, F. P. (2007). Analytical applications of ultrasound. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, v. 26, 413.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., (2002). Estimation of total flavonid contente in própolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food Drug Analysis* 10, 178 - 182.
- Clark, J.P. (2002). Food encapsulation: capturing one substance by another. *Food Technology*, 56 (11): 63 - 65.
- Concelho Oleico Internacional - COI. (2014). Séries estatísticas de azeite e azeitona de mesa. Disponível em <http://www.internationaloliveoil.org/news/index>. Consultado em 23/08/2015.
- Costa A., (2004). "Desenvolvimento de métodos de extração por micro-ondas para pesticidas em solos", Estágio-PRODEP, Instituto Superior de Engenharia do Porto.
- Costa, B., J. Gouveia, L. Dionísio, N. Carrolo e S. Oliveira, (2002). Código de Boas Práticas para o Processamento Tecnológico dos Azeites Virgens. Casa do Azeite, Lisboa.
- da Silva, D. M. (2001). Física (12º ano), Lisboa Editora, (2ª edição). Acedido em setembro de 2015: [www.eletromagnetiza-se.pt](http://www.eletromagnetiza-se.pt).
- de Leonardis, A., Aretini, A., Alfano, G., Macciola, V., Ranalli, G. (2008). Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europaea L.*) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *European Food research and Technology*. 226:653 - 659.
- Despacho conjunto n.º 626/2000 (II SÉRIE), de 6 de Junho referente aos procedimentos de licenciamento das operações de rega de solos agrícolas com águas residuais, nomeadamente, águas russas dos lagares de azeite, bem como os seus condicionalismos.
- Di Khanh, N. (2015). Advances in the extraction of anthocyanin from vegetables 2 . *Methods for Extraction of Anthocyanins from Vegetables*, 3, 126 – 134.
- Duarte, C. L., Esteves, M.P., Carvalheiro, F., Vicente, P. e Gírio, Francisco. (2007) Os subprodutos agroindustriais de natureza lenhocelulósica: caracterização da situação portuguesa. In: *Revista de Engenharia Química*. 5:56 - 62.
- Duarte, C. S. C. (2011). Extração e Encapsulamento de Compostos Bioativos do Bagaço de Azeitona. *Disertação Para Obtenção Do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar*, Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa.
- Duarte, José C., Pires, Susana O., Paixão, Susana M., and Sàágua, M. Céu. (2011). New Approaches To Olive Mill Wastes Bioremediation, *Nova Science Publishers*, 1 – 12.
- Dueñas, M., González-Manzano, S., González-Paramás, A., Santos-Buelga, C. (2010). Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 443 – 449.
- El-Abbassi A., Fadel, E., El-Bouzidi, L., Lahrouni, M., Nauman, K. (2015). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial uses. *Analytical and Processing Techniques*, 41, 129 – 146.

- Fang, Z., Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 510 - 523.
- Ferraz, M. M. P. F. (2012). Contribuição para o estudo do tratamento de efluentes de lagares de azeite. Dissertação de Mestrado em Engenharia do Ambiente - Perfil de Engenharia Sanitária. FCT-UNL.
- Ferreira, Sónia., Fernandes, Pedro., Cardoso, Susana M. Cardoso, Wessel, D. F. (2015). *Boletim de Biotecnologia, Série 2. N(1645 - 5878)*.
- Fiorentino, A., Gentili, A., Isidori, M., Lavorgna, M., Parrella, A., and Temussi, F., (2004). Olive Oil Mill Wastewater Treatment Using A Chemical And Biological Approach, *J. Agric. Food Chem.* 51: 5151.
- Freitas, M. (2007). “Avaliação do potencial energético dos resíduos sólidos dos lagares do Alentejo”. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Galanakis, C. M. (2011). Olive fruit dietary fiber: components, recovery and applications. *Trends in Food Science e Technology*, 22, 175 - 184.
- Ganhão, R. (2003). Remoção de Impurezas de Óleo Bagaço de Azeitona. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Garcia, A. et al. (2008). Debittering of olives by polyphenol oxidatio. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v. 56, n. 24, p. 11862 - 11867.
- Guinda, A., (2006). Use of solid residue from the olive industry. *Grasas y Aceites*, 57, 107 – 115.
- Halliwell, B. (2001). Free radicals and other reactive species in disease. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group.
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants – quo vadis?. *Trends in Pharmacological Sciences*. 32: 125 - 130.
- Igor, K. (2004). “Waste Treatment.” *Technology Dessimination Centres*.
- Instituto Adolfo Lutz (2008). Método físico – químicos para análise de alimentos. IV Edição, 1ª Edição Digital, São Paulo, pp. 104 - 105. Acedido em 20 de Agosto de 2015, em [http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial\\_2008.pdf](http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf).
- Instituto Nacional de Estatística – INE, (2014). Edição 2015. ISSN 0079-4139.
- Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H. P. e Vivanco, J. M. (2002). Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 5878 - 5883.
- Kaliora, A. C., Dedoussis, G. V. (2007). Natural antioxidant compounds in risk factors for CVD. *Pharmacological Research*, 56, 99 - 109.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A. & Roberts, T. H. (2013). “Techniques for analysis of plant phenolic compounds”, *Molecules*, 18, 2328 – 2375.

- Kobek, Igor, (2004). Waste Treatment. Technology Dissemination Centres (TDC-Olive). Bremerhaven, Germany.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal Nutrition*. 134: 3479S-3485S.
- Luque-García, J. L., Castro, M. D. L. (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22 (1), p. 41 - 7.
- Machado, C. A., e Carvalho, L. S. S. (2015). Maltodextrina na alimentação animal - Aplicação da Maltodextrina na Nutrição. *Revista Portuguesa de Ciências Viterenárias*, 110, 14 – 16.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – A review. *International Journal of Food Science and Technology*. 41, 1 - 21.
- Mailer, R.J., Conlan, D. and Ayton, J. (2006). Olive Harvest: Harvest timing for optimal olive oil quality. RIRDC publication no. 05/013. A report prepared for the Rural Industries Research and Development Corporation, Canberra.
- Martinez, O., Salmerón, J., Guillén, M.D. e Casas, C. (2004). Texture profile analysis of meat products treated with commercial liquid smoke flavourings. *Food Control*. 15: 457 - 461.
- Mello, V. D. d., & Laaksonen, D. E. (2009). Fibras na dieta: tendências atuais e benefícios à saúde na síndrome metabólica e no diabetes melito tipo 2. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 53 (5), 509 – 518.
- Malik, N. S. a, & Bradford, J. M. (2006). Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in “Arbequina” olives. *Scientia Horticulturae*, 110(3), 274 – 278.
- Monteiro, A. M. (1999). A oliveira. *Série Património Natural Transmontano*. João Azevedo, Editor. Mirandela.
- Morais, A. R. C. (2012). "Otimização de meios de cultura para a produção de xilitol com base em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de azeitona extratado". *Disertação Para Obtenção Do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar*, Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa.
- Munin, A., Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a Review. *Pharmaceutics*, 3, 793 - 829.
- Nacz, M. & Shahidi, F. (2004). “Extraction and analysis of phenolics in food”, *J. Chromatogr. A*, 1054, 95 – 111.
- Nacz, M., Amorowicz, R., Zadernowki, R., Shahidi, F. (2005). Antioxidant Capacity of Phenolics from Canola Hulls as Affected by Different Solvents. In *Phenolic Compounds in Foods and Natural Health Products*; Shahidi, F., Ho, C. T., Eds; Oxford University Press: Ney York, NY, USA, pp. 57 - 66.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806 - 1815.

- Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K., Stockmann, R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:823 - 837.
- Oreopoulou, V; Russ, W. (2007). "Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry". Kristberg Kristbergsson - University of Iceland.
- Pagnanelli, F., Mainelli, S., Vegliò, F., & Toro, L. (2003). Heavy metal removal by olive pomace: Biosorbent characterisation and equilibrium modelling. *Chemical Engineering Science*, 58(20), 4709 – 4717.
- Portaria n.º 425/98 de 25 de Julho, Fixa as características a que devem obedecer os diferentes tipos de pão e de produtos afins do pão e regula alguns aspetos da sua comercialização.
- Proctor, A., Clark, P.K. (1993). Effects on lutein adsorption of adding polar solvents to silic acid or to soy oil/hexane miscells. *JAOCS*. 70:1003 - 1007.
- Pu, J., Bankston, J.D. e Sathivel, S. (2011). Developing microencapsulated flaxseed oil containing shrimp (*Litopenaeus setiferus*) astaxanthin using a pilot scale spray dryer. *Biosystems Engineering*, 108 (2): 121 - 132.
- Rasteiro, E. M. N. (2012). "Avaliação das propriedades antioxidantes e antimutagénicas de diferentes cultivares de *Vaccinium* spp, do grupo Southern Highbush, produzidas em Portugal", Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar, Faculdade de Ciência e Tecnologias - Universidade Nova de Lisboa.
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K. e Kumar, M. N. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*. 113: 189 - 207.
- Regulamento (CEE) n.º 1234/07 da Conselho de 22 de Outubro de 2007, que estabelece uma organização comum dos mercados agrícolas e disposições específicas para certos produtos agrícolas (Regulamento «OCM única») *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L299, 16 de Novembro de 2007.
- Regulamento (CEE) n.º 2568/91 da Comissão de 11 de Julho de 1991, relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L248, 5 de Setembro de 1991.
- Regulamento (UE) n.º 61/2011 da Comissão de 24 de Janeiro de 2011, que altera o Regulamento (CEE) n.º 2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados.
- Ribeiro, C. M. M. (2007). Encapsulamento de aromas alimentares. Estudo da eficiência de diferentes matrizes e tecnologias de encapsulamento. Tese de Doutoramento em Engenharia Agroindustrial. Instituto Superior de agronomia. Lisboa. 9,58,75pp.
- Rockenbach, II., Rodrigues, E., Cataneo, C., Gonzaga L. V., Lima, A., Mancini-Filho J., Fett, R. (2008) Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis Peruviana* L. *Alimentação e Nutrição*, Araraquara, 19, 3, 271 - 276.
- Rodrigues S., Pinto G. & Fernandes A. (2008). Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 95–100.

- Sanguansri, P., & Augustin, M. A. (2010). New technologies for functional food manufacture. *Functional Food Product Development*.
- Sanseverino A. M., (2002). “Micro-ondas em síntese orgânica”, *Química Nova*, 25, 660-667.
- Sempiterno, C., Fernandes, R (2014). Utilização de subprodutos da indústria de extração de azeite como matéria fertilizante. Instituto Nacional de investigação agrária e veterinária.
- Sevim D. & Tuncay, O. (2013). Effect of Olive Leaves Addition before Extraction of Turkish Olive Cultivars on Olive Oil Minor Components and Antioxidant Activity. *Oriental Journal of Chemistry*, 29(1), 121 – 122.
- Silva M. L. C., Costa, R. S., Santana, A. S., Koblitz, M. G.B. (2010) Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Revista Ciências Agrárias*, 3, 669 - 682.
- Silva, C., Ribeiro, A., Ferreira, D. e Veiga, F. (2003). Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39 (1), pp. 1 - 9.
- Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, a. V., & Boas, L. V. (2006). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves. *Food Science and Technology International*, 12(5), 385 – 395.
- Silva, Sandra R. B. (2012). Módulo 2 - Processamento de frutas e hortaliças por secagem – desidratação e liofilização, *Processamento de Alimentos de Origem Vegetal*.
- Soares, Sérgio Eduardo (2002) Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15, (1), 71 - 81.
- Soria, A.C., Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of foof: a review. *Trends in Food Scienc & Technology*, v. 21, p. 323 - 33.
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3268 – 3295.
- Suslick, K.S., Didenko Y., Fang M.M., Hyeon, T., Kolbeck, K.J., McNamara III, W.B., Mdleleni, M.M., Wong, M. (1999). Acoustic cavitation and its chemical consequences. *Royal Society*, 357, 1751, 335.
- Tsukui, A., & Rezende, C. M. (2014). Microwave Assisted Extraction and Green Chemistry. *Revista Virtual de Química*, 6 (6), 1713 – 1725.
- Value (2012). Guia para a Seleção das Melhores Técnicas Disponíveis de Valorização na Região do SUDOE. Intercâmbio e Transferência Tecnológica sobre a Valorização de Resíduos da Indústria de Transformados Vegetais do SUDOE.
- Venkatesan, P., Muralidharan, C., Manavalan, R. e Valliappan, K. (2009). Selection of better method for the preparation of microspheres by applying analytic hierarchy process. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1 (3), pp. 64 - 78. a).
- Vitagliano Massimo. (2013). Development of a new process to treat the solid and liquid by-products of olive oil industry to recovery biophenols and to reduce the

environmental charge of the wastes. Ph.D. Dissertation. Department of Agriculture Section of Food Science and Technology - University of Naples Federico II.

Vyas, S. P. e Khar, R. K. (2006). Targeted and controlled drug delivery. Delhi, CBS Publishers & Distributors.

Yoshii, H., Soottitantawat, A., Liu, X.D. et al. (2001). Flavor release from spray-dried maltodextrin/gum arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2, 55 – 61.

Zhang, C. H., Huang, L. X., Wang, C. P., Mujumdar, A. S. (2010). Experimental and Numerical Investigation of Spray-Drying Parameters on the Dried Powder Properties of Ginkgo biloba Seeds. *Drying Technology*, v. 28, n. 3, p. 380-388.

# **Anexos**

## Anexo 1: Tratamentos aplicados na extração dos Compostos Bioativos

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Compostos fenólicos

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1268703,217 <sup>a</sup>	15	84580,214	9,477	,000
Intercept	14810629,925	1	14810629,925	1659,493	,000
Tratamentos	1268703,217	15	84580,214	9,477	,000
Error	285593,314	32	8924,791		
Total	16364926,457	48			
Corrected Total	1554296,532	47			

a. R Squared = ,816 (Adjusted R Squared = ,730)

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Compostos fenólicos

LSD

(I) tratamentos	(J) tratamentos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
10 min US	10s MW	-39,1967	77,13534	,615	-196,3162	117,9229
	10s MW + 10 min US	43,5100	77,13534	,577	-113,6095	200,6295
	10s MW + 15 min US	1,3700	77,13534	,986	-155,7495	158,4895
	10s MW + 5 min US	-82,4900	77,13534	,293	-239,6095	74,6295
	15 min US	-121,4367	77,13534	,125	-278,5562	35,6829
	20s MW	-56,1833	77,13534	,472	-213,3029	100,9362
	20s MW + 10 min US	10,0533	77,13534	,897	-147,0662	167,1729
	20s MW + 15 min US	5,6200	77,13534	,942	-151,4995	162,7395
	20s MW + 5 min US	-44,9767	77,13534	,564	-202,0962	112,1429
	30s MW	-543,3300 <sup>*</sup>	77,13534	,000	-700,4495	-386,2105
	30s MW + 10 min US	-367,7367 <sup>*</sup>	77,13534	,000	-524,8562	-210,6171
	30s MW + 15 min US	-215,2900 <sup>*</sup>	77,13534	,009	-372,4095	-58,1705
	30s MW + 5 min US	-321,0067 <sup>*</sup>	77,13534	,000	-478,1262	-163,8871
	5 min US	13,9000	77,13534	,858	-143,2195	171,0195
	S/ Tratamento	-15,6133	77,13534	,841	-172,7329	141,5062

10s MW	10 min US	39,1967	77,13534	,615	-117,9229	196,3162
	10s MW + 10 min US	82,7067	77,13534	,292	-74,4129	239,8262
	10s MW + 15 min US	40,5667	77,13534	,603	-116,5529	197,6862
	10s MW + 5 min US	-43,2933	77,13534	,579	-200,4129	113,8262
	15 min US	-82,2400	77,13534	,294	-239,3595	74,8795
	20s MW	-16,9867	77,13534	,827	-174,1062	140,1329
	20s MW + 10 min US	49,2500	77,13534	,528	-107,8695	206,3695
	20s MW + 15 min US	44,8167	77,13534	,565	-112,3029	201,9362
	20s MW + 5 min US	-5,7800	77,13534	,941	-162,8995	151,3395
	30s MW	-504,1333*	77,13534	,000	-661,2529	-347,0138
	30s MW + 10 min US	-328,5400*	77,13534	,000	-485,6595	-171,4205
	30s MW + 15 min US	-176,0933*	77,13534	,029	-333,2129	-18,9738
	30s MW + 5 min US	-281,8100*	77,13534	,001	-438,9295	-124,6905
	5 min US	53,0967	77,13534	,496	-104,0229	210,2162
	S/ Tratamento	23,5833	77,13534	,762	-133,5362	180,7029
10s MW + 10 min US		-43,5100	77,13534	,577	-200,6295	113,6095
10 min US	10s MW	-82,7067	77,13534	,292	-239,8262	74,4129
	10s MW + 15 min US	-42,1400	77,13534	,589	-199,2595	114,9795
	10s MW + 5 min US	-126,0000	77,13534	,112	-283,1195	31,1195
	15 min US	-164,9467*	77,13534	,040	-322,0662	-7,8271
	20s MW	-99,6933	77,13534	,205	-256,8129	57,4262
	20s MW + 10 min US	-33,4567	77,13534	,667	-190,5762	123,6629
	20s MW + 15 min US	-37,8900	77,13534	,627	-195,0095	119,2295
	20s MW + 5 min US	-88,4867	77,13534	,260	-245,6062	68,6329
	30s MW	-586,8400*	77,13534	,000	-743,9595	-429,7205
	30s MW + 10 min US	-411,2467*	77,13534	,000	-568,3662	-254,1271
	30s MW + 15 min US	-258,8000*	77,13534	,002	-415,9195	-101,6805
	30s MW + 5 min US	-364,5167*	77,13534	,000	-521,6362	-207,3971
	5 min US	-29,6100	77,13534	,704	-186,7295	127,5095
	S/ Tratamento	-59,1233	77,13534	,449	-216,2429	97,9962
10s MW + 10 min US		-1,3700	77,13534	,986	-158,4895	155,7495
15 min US	10s MW	-40,5667	77,13534	,603	-197,6862	116,5529
	10s MW + 10 min US	42,1400	77,13534	,589	-114,9795	199,2595
	10s MW + 5 min US	-83,8600	77,13534	,285	-240,9795	73,2595
	15 min US	-122,8067	77,13534	,121	-279,9262	34,3129
	20s MW	-57,5533	77,13534	,461	-214,6729	99,5662
	20s MW + 10 min US	8,6833	77,13534	,911	-148,4362	165,8029
	20s MW + 15 min US	4,2500	77,13534	,956	-152,8695	161,3695
	20s MW + 5 min US	-46,3467	77,13534	,552	-203,4662	110,7729
	30s MW	-544,7000*	77,13534	,000	-701,8195	-387,5805
	30s MW + 10 min US	-369,1067*	77,13534	,000	-526,2262	-211,9871

	30s MW + 15 min US	-216,6600*	77,13534	,008	-373,7795	-59,5405
	30s MW + 5 min US	-322,3767*	77,13534	,000	-479,4962	-165,2571
	5 min US	12,5300	77,13534	,872	-144,5895	169,6495
	S/ Tratamento	-16,9833	77,13534	,827	-174,1029	140,1362
10s MW + 5 min US	10 min US	82,4900	77,13534	,293	-74,6295	239,6095
	10s MW	43,2933	77,13534	,579	-113,8262	200,4129
	10s MW + 10 min US	126,0000	77,13534	,112	-31,1195	283,1195
	10s MW + 15 min US	83,8600	77,13534	,285	-73,2595	240,9795
	15 min US	-38,9467	77,13534	,617	-196,0662	118,1729
	20s MW	26,3067	77,13534	,735	-130,8129	183,4262
	20s MW + 10 min US	92,5433	77,13534	,239	-64,5762	249,6629
	20s MW + 15 min US	88,1100	77,13534	,262	-69,0095	245,2295
	20s MW + 5 min US	37,5133	77,13534	,630	-119,6062	194,6329
	30s MW	-460,8400*	77,13534	,000	-617,9595	-303,7205
	30s MW + 10 min US	-285,2467*	77,13534	,001	-442,3662	-128,1271
	30s MW + 15 min US	-132,8000	77,13534	,095	-289,9195	24,3195
	30s MW + 5 min US	-238,5167*	77,13534	,004	-395,6362	-81,3971
	5 min US	96,3900	77,13534	,221	-60,7295	253,5095
	S/ Tratamento	66,8767	77,13534	,392	-90,2429	223,9962
15 min US	10 min US	121,4367	77,13534	,125	-35,6829	278,5562
	10s MW	82,2400	77,13534	,294	-74,8795	239,3595
	10s MW + 10 min US	164,9467*	77,13534	,040	7,8271	322,0662
	10s MW + 15 min US	122,8067	77,13534	,121	-34,3129	279,9262
	10s MW + 5 min US	38,9467	77,13534	,617	-118,1729	196,0662
	20s MW	65,2533	77,13534	,404	-91,8662	222,3729
	20s MW + 10 min US	131,4900	77,13534	,098	-25,6295	288,6095
	20s MW + 15 min US	127,0567	77,13534	,109	-30,0629	284,1762
	20s MW + 5 min US	76,4600	77,13534	,329	-80,6595	233,5795
	30s MW	-421,8933*	77,13534	,000	-579,0129	-264,7738
	30s MW + 10 min US	-246,3000*	77,13534	,003	-403,4195	-89,1805
	30s MW + 15 min US	-93,8533	77,13534	,233	-250,9729	63,2662
	30s MW + 5 min US	-199,5700*	77,13534	,014	-356,6895	-42,4505
	5 min US	135,3367	77,13534	,089	-21,7829	292,4562
	S/ Tratamento	105,8233	77,13534	,180	-51,2962	262,9429
20s MW	10 min US	56,1833	77,13534	,472	-100,9362	213,3029
	10s MW	16,9867	77,13534	,827	-140,1329	174,1062
	10s MW + 10 min US	99,6933	77,13534	,205	-57,4262	256,8129
	10s MW + 15 min US	57,5533	77,13534	,461	-99,5662	214,6729
	10s MW + 5 min US	-26,3067	77,13534	,735	-183,4262	130,8129
	15 min US	-65,2533	77,13534	,404	-222,3729	91,8662
	20s MW + 10 min US	66,2367	77,13534	,397	-90,8829	223,3562

20s MW + 15 min US	61,8033	77,13534	,429	-95,3162	218,9229
20s MW + 5 min US	11,2067	77,13534	,885	-145,9129	168,3262
30s MW	-487,1467*	77,13534	,000	-644,2662	-330,0271
30s MW + 10 min US	-311,5533*	77,13534	,000	-468,6729	-154,4338
30s MW + 15 min US	-159,1067*	77,13534	,047	-316,2262	-1,9871
30s MW + 5 min US	-264,8233*	77,13534	,002	-421,9429	-107,7038
5 min US	70,0833	77,13534	,370	-87,0362	227,2029
S/ Tratamento	40,5700	77,13534	,603	-116,5495	197,6895
20s MW + 10 min US	-10,0533	77,13534	,897	-167,1729	147,0662
10 min US 10s MW	-49,2500	77,13534	,528	-206,3695	107,8695
10s MW + 10 min US	33,4567	77,13534	,667	-123,6629	190,5762
10s MW + 15 min US	-8,6833	77,13534	,911	-165,8029	148,4362
10s MW + 5 min US	-92,5433	77,13534	,239	-249,6629	64,5762
15 min US	-131,4900	77,13534	,098	-288,6095	25,6295
20s MW	-66,2367	77,13534	,397	-223,3562	90,8829
20s MW + 15 min US	-4,4333	77,13534	,955	-161,5529	152,6862
20s MW + 5 min US	-55,0300	77,13534	,481	-212,1495	102,0895
30s MW	-553,3833*	77,13534	,000	-710,5029	-396,2638
30s MW + 10 min US	-377,7900*	77,13534	,000	-534,9095	-220,6705
30s MW + 15 min US	-225,3433*	77,13534	,006	-382,4629	-68,2238
30s MW + 5 min US	-331,0600*	77,13534	,000	-488,1795	-173,9405
5 min US	3,8467	77,13534	,961	-153,2729	160,9662
S/ Tratamento	-25,6667	77,13534	,741	-182,7862	131,4529
20s MW + 10 min US	-5,6200	77,13534	,942	-162,7395	151,4995
15 min US 10s MW	-44,8167	77,13534	,565	-201,9362	112,3029
10s MW + 10 min US	37,8900	77,13534	,627	-119,2295	195,0095
10s MW + 15 min US	-4,2500	77,13534	,956	-161,3695	152,8695
10s MW + 5 min US	-88,1100	77,13534	,262	-245,2295	69,0095
15 min US	-127,0567	77,13534	,109	-284,1762	30,0629
20s MW	-61,8033	77,13534	,429	-218,9229	95,3162
20s MW + 10 min US	4,4333	77,13534	,955	-152,6862	161,5529
20s MW + 5 min US	-50,5967	77,13534	,517	-207,7162	106,5229
30s MW	-548,9500*	77,13534	,000	-706,0695	-391,8305
30s MW + 10 min US	-373,3567*	77,13534	,000	-530,4762	-216,2371
30s MW + 15 min US	-220,9100*	77,13534	,007	-378,0295	-63,7905
30s MW + 5 min US	-326,6267*	77,13534	,000	-483,7462	-169,5071
5 min US	8,2800	77,13534	,915	-148,8395	165,3995
S/ Tratamento	-21,2333	77,13534	,785	-178,3529	135,8862
20s MW + 5 min US	44,9767	77,13534	,564	-112,1429	202,0962
10 min US 10s MW	5,7800	77,13534	,941	-151,3395	162,8995
10s MW + 10 min US	88,4867	77,13534	,260	-68,6329	245,6062

	10s MW + 15 min US	46,3467	77,13534	,552	-110,7729	203,4662
	10s MW + 5 min US	-37,5133	77,13534	,630	-194,6329	119,6062
	15 min US	-76,4600	77,13534	,329	-233,5795	80,6595
	20s MW	-11,2067	77,13534	,885	-168,3262	145,9129
	20s MW + 10 min US	55,0300	77,13534	,481	-102,0895	212,1495
	20s MW + 15 min US	50,5967	77,13534	,517	-106,5229	207,7162
	30s MW	-498,3533*	77,13534	,000	-655,4729	-341,2338
	30s MW + 10 min US	-322,7600*	77,13534	,000	-479,8795	-165,6405
	30s MW + 15 min US	-170,3133*	77,13534	,035	-327,4329	-13,1938
	30s MW + 5 min US	-276,0300*	77,13534	,001	-433,1495	-118,9105
	5 min US	58,8767	77,13534	,451	-98,2429	215,9962
	S/ Tratamento	29,3633	77,13534	,706	-127,7562	186,4829
30s MW	10 min US	543,3300*	77,13534	,000	386,2105	700,4495
	10s MW	504,1333*	77,13534	,000	347,0138	661,2529
	10s MW + 10 min US	586,8400*	77,13534	,000	429,7205	743,9595
	10s MW + 15 min US	544,7000*	77,13534	,000	387,5805	701,8195
	10s MW + 5 min US	460,8400*	77,13534	,000	303,7205	617,9595
	15 min US	421,8933*	77,13534	,000	264,7738	579,0129
	20s MW	487,1467*	77,13534	,000	330,0271	644,2662
	20s MW + 10 min US	553,3833*	77,13534	,000	396,2638	710,5029
	20s MW + 15 min US	548,9500*	77,13534	,000	391,8305	706,0695
	20s MW + 5 min US	498,3533*	77,13534	,000	341,2338	655,4729
	30s MW + 10 min US	175,5933*	77,13534	,030	18,4738	332,7129
	30s MW + 15 min US	328,0400*	77,13534	,000	170,9205	485,1595
	30s MW + 5 min US	222,3233*	77,13534	,007	65,2038	379,4429
	5 min US	557,2300*	77,13534	,000	400,1105	714,3495
	S/ Tratamento	527,7167*	77,13534	,000	370,5971	684,8362
30s MW + 10 min US		367,7367*	77,13534	,000	210,6171	524,8562
10 min US	10s MW	328,5400*	77,13534	,000	171,4205	485,6595
	10s MW + 10 min US	411,2467*	77,13534	,000	254,1271	568,3662
	10s MW + 15 min US	369,1067*	77,13534	,000	211,9871	526,2262
	10s MW + 5 min US	285,2467*	77,13534	,001	128,1271	442,3662
	15 min US	246,3000*	77,13534	,003	89,1805	403,4195
	20s MW	311,5533*	77,13534	,000	154,4338	468,6729
	20s MW + 10 min US	377,7900*	77,13534	,000	220,6705	534,9095
	20s MW + 15 min US	373,3567*	77,13534	,000	216,2371	530,4762
	20s MW + 5 min US	322,7600*	77,13534	,000	165,6405	479,8795
	30s MW	-175,5933*	77,13534	,030	-332,7129	-18,4738
	30s MW + 15 min US	152,4467	77,13534	,057	-4,6729	309,5662
	30s MW + 5 min US	46,7300	77,13534	,549	-110,3895	203,8495
	5 min US	381,6367*	77,13534	,000	224,5171	538,7562

	S/ Tratamento	352,1233*	77,13534	,000	195,0038	509,2429
30s MW +	10 min US	215,2900*	77,13534	,009	58,1705	372,4095
15 min US	10s MW	176,0933*	77,13534	,029	18,9738	333,2129
	10s MW + 10 min US	258,8000*	77,13534	,002	101,6805	415,9195
	10s MW + 15 min US	216,6600*	77,13534	,008	59,5405	373,7795
	10s MW + 5 min US	132,8000	77,13534	,095	-24,3195	289,9195
	15 min US	93,8533	77,13534	,233	-63,2662	250,9729
	20s MW	159,1067*	77,13534	,047	1,9871	316,2262
	20s MW + 10 min US	225,3433*	77,13534	,006	68,2238	382,4629
	20s MW + 15 min US	220,9100*	77,13534	,007	63,7905	378,0295
	20s MW + 5 min US	170,3133*	77,13534	,035	13,1938	327,4329
	30s MW	-328,0400*	77,13534	,000	-485,1595	-170,9205
	30s MW + 10 min US	-152,4467	77,13534	,057	-309,5662	4,6729
	30s MW + 5 min US	-105,7167	77,13534	,180	-262,8362	51,4029
	5 min US	229,1900*	77,13534	,006	72,0705	386,3095
	S/ Tratamento	199,6767*	77,13534	,014	42,5571	356,7962
30s MW + 5	10 min US	321,0067*	77,13534	,000	163,8871	478,1262
min US	10s MW	281,8100*	77,13534	,001	124,6905	438,9295
	10s MW + 10 min US	364,5167*	77,13534	,000	207,3971	521,6362
	10s MW + 15 min US	322,3767*	77,13534	,000	165,2571	479,4962
	10s MW + 5 min US	238,5167*	77,13534	,004	81,3971	395,6362
	15 min US	199,5700*	77,13534	,014	42,4505	356,6895
	20s MW	264,8233*	77,13534	,002	107,7038	421,9429
	20s MW + 10 min US	331,0600*	77,13534	,000	173,9405	488,1795
	20s MW + 15 min US	326,6267*	77,13534	,000	169,5071	483,7462
	20s MW + 5 min US	276,0300*	77,13534	,001	118,9105	433,1495
	30s MW	-222,3233*	77,13534	,007	-379,4429	-65,2038
	30s MW + 10 min US	-46,7300	77,13534	,549	-203,8495	110,3895
	30s MW + 15 min US	105,7167	77,13534	,180	-51,4029	262,8362
	5 min US	334,9067*	77,13534	,000	177,7871	492,0262
	S/ Tratamento	305,3933*	77,13534	,000	148,2738	462,5129
5 min US	10 min US	-13,9000	77,13534	,858	-171,0195	143,2195
	10s MW	-53,0967	77,13534	,496	-210,2162	104,0229
	10s MW + 10 min US	29,6100	77,13534	,704	-127,5095	186,7295
	10s MW + 15 min US	-12,5300	77,13534	,872	-169,6495	144,5895
	10s MW + 5 min US	-96,3900	77,13534	,221	-253,5095	60,7295
	15 min US	-135,3367	77,13534	,089	-292,4562	21,7829
	20s MW	-70,0833	77,13534	,370	-227,2029	87,0362
	20s MW + 10 min US	-3,8467	77,13534	,961	-160,9662	153,2729
	20s MW + 15 min US	-8,2800	77,13534	,915	-165,3995	148,8395
	20s MW + 5 min US	-58,8767	77,13534	,451	-215,9962	98,2429

	30s MW	-557,2300*	77,13534	,000	-714,3495	-400,1105
	30s MW + 10 min US	-381,6367*	77,13534	,000	-538,7562	-224,5171
	30s MW + 15 min US	-229,1900*	77,13534	,006	-386,3095	-72,0705
	30s MW + 5 min US	-334,9067*	77,13534	,000	-492,0262	-177,7871
	S/ Tratamento	-29,5133	77,13534	,705	-186,6329	127,6062
S/ Tratamento	10 min US	15,6133	77,13534	,841	-141,5062	172,7329
	10s MW	-23,5833	77,13534	,762	-180,7029	133,5362
	10s MW + 10 min US	59,1233	77,13534	,449	-97,9962	216,2429
	10s MW + 15 min US	16,9833	77,13534	,827	-140,1362	174,1029
	10s MW + 5 min US	-66,8767	77,13534	,392	-223,9962	90,2429
	15 min US	-105,8233	77,13534	,180	-262,9429	51,2962
	20s MW	-40,5700	77,13534	,603	-197,6895	116,5495
	20s MW + 10 min US	25,6667	77,13534	,741	-131,4529	182,7862
	20s MW + 15 min US	21,2333	77,13534	,785	-135,8862	178,3529
	20s MW + 5 min US	-29,3633	77,13534	,706	-186,4829	127,7562
	30s MW	-527,7167*	77,13534	,000	-684,8362	-370,5971
	30s MW + 10 min US	-352,1233*	77,13534	,000	-509,2429	-195,0038
	30s MW + 15 min US	-199,6767*	77,13534	,014	-356,7962	-42,5571
	30s MW + 5 min US	-305,3933*	77,13534	,000	-462,5129	-148,2738
	5 min US	29,5133	77,13534	,705	-127,6062	186,6329

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 8924,791.

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## Anexo 2: Extração em escala piloto

**Tests of Between-Subjects Effects**

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Compostos fenólicos	3289,345 <sup>a</sup>	2	1644,672	718,753	,000
	Flavonoides	30,703 <sup>b</sup>	2	15,352	202,707	,000
	Capacidade Antioxidante	1694,395 <sup>c</sup>	2	847,197	114,011	,000
Intercept	Compostos fenólicos	17314,854	1	17314,854	7566,920	,000
	Flavonoides	663,578	1	663,578	8762,028	,000
	Capacidade Antioxidante	13661,049	1	13661,049	1838,430	,000
Tratamentos	Compostos fenólicos	3289,345	2	1644,672	718,753	,000
	Flavonoides	30,703	2	15,352	202,707	,000
	Capacidade Antioxidante	1694,395	2	847,197	114,011	,000
Error	Compostos fenólicos	13,729	6	2,288		
	Flavonoides	,454	6	,076		
	Capacidade Antioxidante	44,585	6	7,431		
Total	Compostos fenólicos	20617,929	9			
	Flavonoides	694,735	9			
	Capacidade Antioxidante	15400,029	9			
Corrected Total	Compostos fenólicos	3303,074	8			
	Flavonoides	31,158	8			
	Capacidade Antioxidante	1738,980	8			

a. R Squared = ,996 (Adjusted R Squared = ,994)

b. R Squared = ,985 (Adjusted R Squared = ,981)

c. R Squared = ,974 (Adjusted R Squared = ,966)

### Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) tratamentos	(J) tratamentos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Compostos Fenólicos	1º Extração	2º Extração	29,2077*	1,23511	,000	26,1855	32,2299
		3º Extração	46,3033*	1,23511	,000	43,2811	49,3255
	2º Extração	1º Extração	-29,2077*	1,23511	,000	-32,2299	-26,1855
		3º Extração	17,0956*	1,23511	,000	14,0734	20,1178
	3º Extração	1º Extração	-46,3033*	1,23511	,000	-49,3255	-43,2811
		2º Extração	-17,0956*	1,23511	,000	-20,1178	-14,0734
Flavonoides	1º Extração	2º Extração	3,0800*	,22470	,000	2,5302	3,6298
		3º Extração	4,4100*	,22470	,000	3,8602	4,9598
	2º Extração	1º Extração	-3,0800*	,22470	,000	-3,6298	-2,5302
		3º Extração	1,3300*	,22470	,001	,7802	1,8798
	3º Extração	1º Extração	-4,4100*	,22470	,000	-4,9598	-3,8602
		2º Extração	-1,3300*	,22470	,001	-1,8798	-,7802
Capacidade Antioxidante	1º Extração	2º Extração	22,2492*	2,22573	,000	16,8030	27,6954
		3º Extração	32,9404*	2,22573	,000	27,4942	38,3865
	2º Extração	1º Extração	-22,2492*	2,22573	,000	-27,6954	-16,8030
		3º Extração	10,6912*	2,22573	,003	5,2450	16,1373
	3º Extração	1º Extração	-32,9404*	2,22573	,000	-38,3865	-27,4942
		2º Extração	-10,6912*	2,22573	,003	-16,1373	-5,2450

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 7,431.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

### Anexo 3: Encapsulamento de Compostos Bioativos (Spray Dryer)

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Compostos fenólicos	49,092 <sup>a</sup>	2	24,546	1,965	,221
	Flavonoides	51,857 <sup>b</sup>	2	25,929	3,582	,095
	Capacidade Antioxidante	28,269 <sup>c</sup>	2	14,135	1,194	,366
Intercept	Compostos fenólicos	10157,280	1	10157,280	813,103	,000
	Flavonoides	1100,470	1	1100,470	152,019	,000
	Capacidade Antioxidante	17338,745	1	17338,745	1465,213	,000
Tratamentos	Compostos fenólicos	49,092	2	24,546	1,965	,221
	Flavonoides	51,857	2	25,929	3,582	,095
	Capacidade Antioxidante	28,269	2	14,135	1,194	,366
Error	Compostos fenólicos	74,952	6	12,492		
	Flavonoides	43,434	6	7,239		
	Capacidade Antioxidante	71,002	6	11,834		
Total	Compostos fenólicos	10281,325	9			
	Flavonoides	1195,762	9			
	Capacidade Antioxidante	17438,015	9			
Corrected Total	Compostos fenólicos	124,044	8			
	Flavonoides	95,292	8			
	Capacidade Antioxidante	99,271	8			

a. R Squared = ,396 (Adjusted R Squared = ,194)

b. R Squared = ,544 (Adjusted R Squared = ,392)

c. R Squared = ,285 (Adjusted R Squared = ,046)

### Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) tratamentos	(J) tratamentos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Compostos Fenólicos	1º Extração	2º Extração	,6567	2,88583	,828	-6,4047	7,7180
		3º Extração	5,2500	2,88583	,119	-1,8114	12,3114
	2º Extração	1º Extração	-,6567	2,88583	,828	-7,7180	6,4047
		3º Extração	4,5933	2,88583	,163	-2,4680	11,6547
	3º Extração	1º Extração	-5,2500	2,88583	,119	-12,3114	1,8114
		2º Extração	-4,5933	2,88583	,163	-11,6547	2,4680
Flavonoides	1º Extração	2º Extração	-,0700	2,19682	,976	-5,4454	5,3054
		3º Extração	5,0567	2,19682	,061	-,3188	10,4321
	2º Extração	1º Extração	,0700	2,19682	,976	-5,3054	5,4454
		3º Extração	5,1267	2,19682	,058	-,2488	10,5021
	3º Extração	1º Extração	-5,0567	2,19682	,061	-10,4321	,3188
		2º Extração	-5,1267	2,19682	,058	-10,5021	,2488
Capacidade Antioxidante	1º Extração	2º Extração	-3,4400	2,80875	,267	-10,3128	3,4328
		3º Extração	,5733	2,80875	,845	-6,2994	7,4461
	2º Extração	1º Extração	3,4400	2,80875	,267	-3,4328	10,3128
		3º Extração	4,0133	2,80875	,203	-2,8594	10,8861
	3º Extração	1º Extração	-,5733	2,80875	,845	-7,4461	6,2994
		2º Extração	-4,0133	2,80875	,203	-10,8861	2,8594

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 11,834.

## Anexo 4: Cor dos Pães

**Tests of Between-Subjects Effects**

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	L	1837,074 <sup>a</sup>	3	612,358	150,294	,000
	a	72,934 <sup>b</sup>	3	24,311	86,938	,000
	b	405,121 <sup>c</sup>	3	135,040	454,133	,000
Intercept	L	33536,499	1	33536,499	8231,044	,000
	a	106,565	1	106,565	381,076	,000
	b	1704,560	1	1704,560	5732,343	,000
Pão	L	1837,074	3	612,358	150,294	,000
	a	72,934	3	24,311	86,938	,000
	b	405,121	3	135,040	454,133	,000
Error	L	32,595	8	4,074		
	a	2,237	8	,280		
	b	2,379	8	,297		
Total	L	35406,168	12			
	a	181,736	12			
	b	2112,060	12			
Corrected Total	L	1869,669	11			
	a	75,171	11			
	b	407,500	11			

a. R Squared = ,983 (Adjusted R Squared = ,976)

b. R Squared = ,970 (Adjusted R Squared = ,959)

c. R Squared = ,994 (Adjusted R Squared = ,992)

### Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Pão	(J) Pão	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
L	Interior do pão	Interior pão pó	23,8333 <sup>*</sup>	1,64811	,000	20,0328	27,6339
		Superfície do pão Pó	2,6067	1,64811	,152	-1,1939	6,4072
		Superfície do pão	-10,1800 <sup>*</sup>	1,64811	,000	-13,9805	-6,3795
	Interior pão Pó	Interior do pão	-23,8333 <sup>*</sup>	1,64811	,000	-27,6339	-20,0328
		Superfície do pão Pó	-21,2267 <sup>*</sup>	1,64811	,000	-25,0272	-17,4261
		Superfície do pão	-34,0133 <sup>*</sup>	1,64811	,000	-37,8139	-30,2128

	Superfície do pão Pó	Interior do pão	-2,6067	1,64811	,152	-6,4072	1,1939
		Interior pão Pó	21,2267*	1,64811	,000	17,4261	25,0272
	Superfície do pão		-12,7867*	1,64811	,000	-16,5872	-8,9861
	Superfície do pão	Interior do pão	10,1800*	1,64811	,000	6,3795	13,9805
		Interior pão Pó	34,0133*	1,64811	,000	30,2128	37,8139
		Superfície do pão Pó	12,7867*	1,64811	,000	8,9861	16,5872
a	Interior do pão	Interior pão Pó	-2,3733*	,43177	,001	-3,3690	-1,3777
		Superfície do pão Pó	-3,6033*	,43177	,000	-4,5990	-2,6077
		Superfície do pão	-6,8367*	,43177	,000	-7,8323	-5,8410
	Interior pão Pó	Interior do pão	2,3733*	,43177	,001	1,3777	3,3690
		Superfície do pão Pó	-1,2300*	,43177	,022	-2,2257	-,2343
		Superfície do pão	-4,4633*	,43177	,000	-5,4590	-3,4677
	Superfície do pão Pó	Interior do pão	3,6033*	,43177	,000	2,6077	4,5990
		Interior pão Pó	1,2300*	,43177	,022	,2343	2,2257
		Superfície do pão	-3,2333*	,43177	,000	-4,2290	-2,2377
	Superfície do pão	Interior do pão	6,8367*	,43177	,000	5,8410	7,8323
		Interior pão Pó	4,4633*	,43177	,000	3,4677	5,4590
		Superfície do pão Pó	3,2333*	,43177	,000	2,2377	4,2290
b	Interior do pão	Interior pão Pó	6,4467*	,44524	,000	5,4199	7,4734
		Superfície do pão Pó	-,3200	,44524	,493	-1,3467	,7067
		Superfície do pão	-9,8400*	,44524	,000	-10,8667	-8,8133
	Interior pão Pó	Interior do pão	-6,4467*	,44524	,000	-7,4734	-5,4199
		Superfície do pão Pó	-6,7667*	,44524	,000	-7,7934	-5,7399
		Superfície do pão	-16,2867*	,44524	,000	-17,3134	-15,2599
	Superfície do pão Pó	Interior do pão	,3200	,44524	,493	-,7067	1,3467
		Interior pão Pó	6,7667*	,44524	,000	5,7399	7,7934
		Superfície do pão	-9,5200*	,44524	,000	-10,5467	-8,4933
	Superfície do pão	Interior do pão	9,8400*	,44524	,000	8,8133	10,8667
		Interior pão Pó	16,2867*	,44524	,000	15,2599	17,3134
		Superfície do pão Pó	9,5200*	,44524	,000	8,4933	10,5467

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,297.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

## Anexo 5: Textura dos Pães

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Pão

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	156864291,819 <sup>a</sup>	15	10457619,455	88,526	,000
Intercept	44596048,019	1	44596048,019	377,513	,000
Textura	156864291,819	15	10457619,455	88,526	,000
Error	3780196,475	32	118131,140		
Total	205240536,312	48			
Corrected Total	160644488,294	47			

a. R Squared = ,976 (Adjusted R Squared = ,965)

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Pão

LSD

(I) textura	(J) textura	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
% de deformação	% Deformação Pó	-1,5800	280,63160	,996	-573,2079	570,0479
	Adesividade	68,4767	280,63160	,809	-503,1512	640,1045
	Adesividade Pó	70,5033	280,63160	,803	-501,1245	642,1312
	Mastigabilidade	-6573,0233 <sup>*</sup>	280,63160	,000	-7144,6512	-6001,3955
	Mastigabilidade Pó	-4105,0433 <sup>*</sup>	280,63160	,000	-4676,6712	-3533,4155
	Coesividade	63,7367	280,63160	,822	-507,8912	635,3645
	Coesividade Pó	63,8533	280,63160	,821	-507,7745	635,4812
	Deformação	53,2933	280,63160	,851	-518,3345	624,9212
	Deformação Pó	53,2900	280,63160	,851	-518,3379	624,9179
	Dureza	-1464,9567 <sup>*</sup>	280,63160	,000	-2036,5845	-893,3288
	Dureza Pó	-1487,4900 <sup>*</sup>	280,63160	,000	-2059,1179	-915,8621
	Gomosidade	-707,7900 <sup>*</sup>	280,63160	,017	-1279,4179	-136,1621
	Gomosidade Pó	-540,6900	280,63160	,063	-1112,3179	30,9379
	Elasticidade	55,6500	280,63160	,844	-515,9779	627,2779
Elasticidade Pó	57,4200	280,63160	,839	-514,2079	629,0479	
%	% de deformação	1,5800	280,63160	,996	-570,0479	573,2079

deformação	Adesividade	70,0567	280,63160	,804	-501,5712	641,6845	
Pó	Adesividade Pó	72,0833	280,63160	,799	-499,5445	643,7112	
	Mastigabilidade	-6571,4433 <sup>*</sup>	280,63160	,000	-7143,0712	-5999,8155	
	Mastigabilidade Pó	-4103,4633 <sup>*</sup>	280,63160	,000	-4675,0912	-3531,8355	
	Coesividade	65,3167	280,63160	,817	-506,3112	636,9445	
	Coesividade Pó	65,4333	280,63160	,817	-506,1945	637,0612	
	Deformação	54,8733	280,63160	,846	-516,7545	626,5012	
	Deformação Pó	54,8700	280,63160	,846	-516,7579	626,4979	
	Dureza	-1463,3767 <sup>*</sup>	280,63160	,000	-2035,0045	-891,7488	
	Dureza Pó	-1485,9100 <sup>*</sup>	280,63160	,000	-2057,5379	-914,2821	
	Gomosidade	-706,2100 <sup>*</sup>	280,63160	,017	-1277,8379	-134,5821	
	Gomosidade Pó	-539,1100	280,63160	,064	-1110,7379	32,5179	
	Elasticidade	57,2300	280,63160	,840	-514,3979	628,8579	
	Elasticidade Pó	59,0000	280,63160	,835	-512,6279	630,6279	
	Adesividade	% de deformação	-68,4767	280,63160	,809	-640,1045	503,1512
		% de deformação Pó	-70,0567	280,63160	,804	-641,6845	501,5712
Adesividade Pó		2,0267	280,63160	,994	-569,6012	573,6545	
Mastigabilidade		-6641,5000 <sup>*</sup>	280,63160	,000	-7213,1279	-6069,8721	
Mastigabilidade Pó		-4173,5200 <sup>*</sup>	280,63160	,000	-4745,1479	-3601,8921	
Coesividade		-4,7400	280,63160	,987	-576,3679	566,8879	
Coesividade Pó		-4,6233	280,63160	,987	-576,2512	567,0045	
Deformação		-15,1833	280,63160	,957	-586,8112	556,4445	
Deformação Pó		-15,1867	280,63160	,957	-586,8145	556,4412	
Dureza		-1533,4333 <sup>*</sup>	280,63160	,000	-2105,0612	-961,8055	
Dureza Pó		-1555,9667 <sup>*</sup>	280,63160	,000	-2127,5945	-984,3388	
Gomosidade		-776,2667 <sup>*</sup>	280,63160	,009	-1347,8945	-204,6388	
Gomosidade Pó		-609,1667 <sup>*</sup>	280,63160	,037	-1180,7945	-37,5388	
Elasticidade		-12,8267	280,63160	,964	-584,4545	558,8012	
Elasticidade Pó		-11,0567	280,63160	,969	-582,6845	560,5712	
Adesividade Pó	% de deformação	-70,5033	280,63160	,803	-642,1312	501,1245	
	% de deformação Pó	-72,0833	280,63160	,799	-643,7112	499,5445	
	Adesividade	-2,0267	280,63160	,994	-573,6545	569,6012	
	Mastigabilidade	-6643,5267 <sup>*</sup>	280,63160	,000	-7215,1545	-6071,8988	
	Mastigabilidade Pó	-4175,5467 <sup>*</sup>	280,63160	,000	-4747,1745	-3603,9188	
	Coesividade	-6,7667	280,63160	,981	-578,3945	564,8612	
	Coesividade Pó	-6,6500	280,63160	,981	-578,2779	564,9779	
	Deformação	-17,2100	280,63160	,951	-588,8379	554,4179	
	Deformação Pó	-17,2133	280,63160	,951	-588,8412	554,4145	

	Dureza	-1535,4600 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-2107,0879	-963,8321
	Dureza Pó	-1557,9933 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-2129,6212	-986,3655
	Gomosidade	-778,2933 <sup>†</sup>	280,63160	,009	-1349,9212	-206,6655
	Gomosidade Pó	-611,1933 <sup>†</sup>	280,63160	,037	-1182,8212	-39,5655
	Elasticidade	-14,8533	280,63160	,958	-586,4812	556,7745
	Elasticidade Pó	-13,0833	280,63160	,963	-584,7112	558,5445
Mastigabilidade de	% de deformação	6573,0233 <sup>†</sup>	280,63160	,000	6001,3955	7144,6512
	% de deformação Pó	6571,4433 <sup>†</sup>	280,63160	,000	5999,8155	7143,0712
	Adesividade	6641,5000 <sup>†</sup>	280,63160	,000	6069,8721	7213,1279
	Adesividade Pó	6643,5267 <sup>†</sup>	280,63160	,000	6071,8988	7215,1545
	Mastigabilidade Pó	2467,9800 <sup>†</sup>	280,63160	,000	1896,3521	3039,6079
	Coesividade	6636,7600 <sup>†</sup>	280,63160	,000	6065,1321	7208,3879
	Coesividade Pó	6636,8767 <sup>†</sup>	280,63160	,000	6065,2488	7208,5045
	Deformação	6626,3167 <sup>†</sup>	280,63160	,000	6054,6888	7197,9445
	Deformação Pó	6626,3133 <sup>†</sup>	280,63160	,000	6054,6855	7197,9412
	Dureza	5108,0667 <sup>†</sup>	280,63160	,000	4536,4388	5679,6945
	Dureza Pó	5085,5333 <sup>†</sup>	280,63160	,000	4513,9055	5657,1612
	Gomosidade	5865,2333 <sup>†</sup>	280,63160	,000	5293,6055	6436,8612
	Gomosidade Pó	6032,3333 <sup>†</sup>	280,63160	,000	5460,7055	6603,9612
	Elasticidade	6628,6733 <sup>†</sup>	280,63160	,000	6057,0455	7200,3012
	Elasticidade Pó	6630,4433 <sup>†</sup>	280,63160	,000	6058,8155	7202,0712
	Mastigabilidade de Pó	% de deformação	4105,0433 <sup>†</sup>	280,63160	,000	3533,4155
% de deformação Pó		4103,4633 <sup>†</sup>	280,63160	,000	3531,8355	4675,0912
Adesividade		4173,5200 <sup>†</sup>	280,63160	,000	3601,8921	4745,1479
Adesividade Pó		4175,5467 <sup>†</sup>	280,63160	,000	3603,9188	4747,1745
Mastigabilidade		-2467,9800 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-3039,6079	-1896,3521
Coesividade		4168,7800 <sup>†</sup>	280,63160	,000	3597,1521	4740,4079
Coesividade Pó		4168,8967 <sup>†</sup>	280,63160	,000	3597,2688	4740,5245
Deformação		4158,3367 <sup>†</sup>	280,63160	,000	3586,7088	4729,9645
Deformação Pó		4158,3333 <sup>†</sup>	280,63160	,000	3586,7055	4729,9612
Dureza		2640,0867 <sup>†</sup>	280,63160	,000	2068,4588	3211,7145
Dureza Pó		2617,5533 <sup>†</sup>	280,63160	,000	2045,9255	3189,1812
Gomosidade		3397,2533 <sup>†</sup>	280,63160	,000	2825,6255	3968,8812
Gomosidade Pó		3564,3533 <sup>†</sup>	280,63160	,000	2992,7255	4135,9812
Elasticidade		4160,6933 <sup>†</sup>	280,63160	,000	3589,0655	4732,3212
Elasticidade Pó		4162,4633 <sup>†</sup>	280,63160	,000	3590,8355	4734,0912
Coesividade		% de deformação	-63,7367	280,63160	,822	-635,3645
	% de deformação Pó	-65,3167	280,63160	,817	-636,9445	506,3112
	Adesividade	4,7400	280,63160	,987	-566,8879	576,3679
	Adesividade Pó	6,7667	280,63160	,981	-564,8612	578,3945

	Mastigabilidade	-6636,7600 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-7208,3879	-6065,1321
	Mastigabilidade Pó	-4168,7800 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-4740,4079	-3597,1521
	Coesividade Pó	,1167	280,63160	1,000	-571,5112	571,7445
	Deformação	-10,4433	280,63160	,971	-582,0712	561,1845
	Deformação Pó	-10,4467	280,63160	,971	-582,0745	561,1812
	Dureza	-1528,6933 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-2100,3212	-957,0655
	Dureza Pó	-1551,2267 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-2122,8545	-979,5988
	Gomosidade	-771,5267 <sup>†</sup>	280,63160	,010	-1343,1545	-199,8988
	Gomosidade Pó	-604,4267 <sup>†</sup>	280,63160	,039	-1176,0545	-32,7988
	Elasticidade	-8,0867	280,63160	,977	-579,7145	563,5412
	Elasticidade Pó	-6,3167	280,63160	,982	-577,9445	565,3112
Coesividade Pó	% de deformação	-63,8533	280,63160	,821	-635,4812	507,7745
	% de deformação Pó	-65,4333	280,63160	,817	-637,0612	506,1945
	Adesividade	4,6233	280,63160	,987	-567,0045	576,2512
	Adesividade Pó	6,6500	280,63160	,981	-564,9779	578,2779
	Mastigabilidade	-6636,8767 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-7208,5045	-6065,2488
	Mastigabilidade Pó	-4168,8967 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-4740,5245	-3597,2688
	Coesividade	-,1167	280,63160	1,000	-571,7445	571,5112
	Deformação	-10,5600	280,63160	,970	-582,1879	561,0679
	Deformação Pó	-10,5633	280,63160	,970	-582,1912	561,0645
	Dureza	-1528,8100 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-2100,4379	-957,1821
	Dureza Pó	-1551,3433 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-2122,9712	-979,7155
	Gomosidade	-771,6433 <sup>†</sup>	280,63160	,010	-1343,2712	-200,0155
	Gomosidade Pó	-604,5433 <sup>†</sup>	280,63160	,039	-1176,1712	-32,9155
	Elasticidade	-8,2033	280,63160	,977	-579,8312	563,4245
	Elasticidade Pó	-6,4333	280,63160	,982	-578,0612	565,1945
Deformação	% de deformação	-53,2933	280,63160	,851	-624,9212	518,3345
	% de deformação Pó	-54,8733	280,63160	,846	-626,5012	516,7545
	Adesividade	15,1833	280,63160	,957	-556,4445	586,8112
	Adesividade Pó	17,2100	280,63160	,951	-554,4179	588,8379
	Mastigabilidade	-6626,3167 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-7197,9445	-6054,6888
	Mastigabilidade Pó	-4158,3367 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-4729,9645	-3586,7088
	Coesividade	10,4433	280,63160	,971	-561,1845	582,0712
	Coesividade Pó	10,5600	280,63160	,970	-561,0679	582,1879
	Deformação Pó	-,0033	280,63160	1,000	-571,6312	571,6245
	Dureza	-1518,2500 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-2089,8779	-946,6221
	Dureza Pó	-1540,7833 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-2112,4112	-969,1555
	Gomosidade	-761,0833 <sup>†</sup>	280,63160	,011	-1332,7112	-189,4555

	Gomosidade Pó	-593,9833 <sup>†</sup>	280,63160	,042	-1165,6112	-22,3555	
	Elasticidade	2,3567	280,63160	,993	-569,2712	573,9845	
	Elasticidade Pó	4,1267	280,63160	,988	-567,5012	575,7545	
Deformação Pó	% de deformação	-53,2900	280,63160	,851	-624,9179	518,3379	
	% deformação Pó	-54,8700	280,63160	,846	-626,4979	516,7579	
	Adesividade	15,1867	280,63160	,957	-556,4412	586,8145	
	Adesividade Pó	17,2133	280,63160	,951	-554,4145	588,8412	
	Mastigabilidade	-6626,3133 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-7197,9412	-6054,6855	
	Mastigabilidade Pó	-4158,3333 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-4729,9612	-3586,7055	
	Coesividade	10,4467	280,63160	,971	-561,1812	582,0745	
	Coesividade Pó	10,5633	280,63160	,970	-561,0645	582,1912	
	Deformação	,0033	280,63160	1,000	-571,6245	571,6312	
	Dureza	-1518,2467 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-2089,8745	-946,6188	
	Dureza Pó	-1540,7800 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-2112,4079	-969,1521	
	Gomosidade	-761,0800 <sup>†</sup>	280,63160	,011	-1332,7079	-189,4521	
	Gomosidade Pó	-593,9800 <sup>†</sup>	280,63160	,042	-1165,6079	-22,3521	
	Elasticidade	2,3600	280,63160	,993	-569,2679	573,9879	
	Elasticidade Pó	4,1300	280,63160	,988	-567,4979	575,7579	
	Dureza	% de deformação	1464,9567 <sup>†</sup>	280,63160	,000	893,3288	2036,5845
		% deformação Pó	1463,3767 <sup>†</sup>	280,63160	,000	891,7488	2035,0045
Adesividade		1533,4333 <sup>†</sup>	280,63160	,000	961,8055	2105,0612	
Adesividade Pó		1535,4600 <sup>†</sup>	280,63160	,000	963,8321	2107,0879	
Mastigabilidade		-5108,0667 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-5679,6945	-4536,4388	
Mastigabilidade Pó		-2640,0867 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-3211,7145	-2068,4588	
Coesividade		1528,6933 <sup>†</sup>	280,63160	,000	957,0655	2100,3212	
Coesividade Pó		1528,8100 <sup>†</sup>	280,63160	,000	957,1821	2100,4379	
Deformação		1518,2500 <sup>†</sup>	280,63160	,000	946,6221	2089,8779	
Deformação Pó		1518,2467 <sup>†</sup>	280,63160	,000	946,6188	2089,8745	
Dureza Pó		-22,5333	280,63160	,937	-594,1612	549,0945	
Gomosidade		757,1667 <sup>†</sup>	280,63160	,011	185,5388	1328,7945	
Gomosidade Pó		924,2667 <sup>†</sup>	280,63160	,002	352,6388	1495,8945	
Elasticidade		1520,6067 <sup>†</sup>	280,63160	,000	948,9788	2092,2345	
Elasticidade Pó		1522,3767 <sup>†</sup>	280,63160	,000	950,7488	2094,0045	
Dureza Pó	% de deformação	1487,4900 <sup>†</sup>	280,63160	,000	915,8621	2059,1179	
	% deformação Pó	1485,9100 <sup>†</sup>	280,63160	,000	914,2821	2057,5379	
	Adesividade	1555,9667 <sup>†</sup>	280,63160	,000	984,3388	2127,5945	
	Adesividade Pó	1557,9933 <sup>†</sup>	280,63160	,000	986,3655	2129,6212	
	Mastigabilidade	-5085,5333 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-5657,1612	-4513,9055	

	Mastigabilidade	-2617,5533 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-3189,1812	-2045,9255
	Pó					
	Coesividade	1551,2267 <sup>†</sup>	280,63160	,000	979,5988	2122,8545
	Coesividade Pó	1551,3433 <sup>†</sup>	280,63160	,000	979,7155	2122,9712
	Deformação	1540,7833 <sup>†</sup>	280,63160	,000	969,1555	2112,4112
	Deformação Pó	1540,7800 <sup>†</sup>	280,63160	,000	969,1521	2112,4079
	Dureza	22,5333	280,63160	,937	-549,0945	594,1612
	Gomosidade	779,7000 <sup>†</sup>	280,63160	,009	208,0721	1351,3279
	Gomosidade Pó	946,8000 <sup>†</sup>	280,63160	,002	375,1721	1518,4279
	Elasticidade	1543,1400 <sup>†</sup>	280,63160	,000	971,5121	2114,7679
	Elasticidade Pó	1544,9100 <sup>†</sup>	280,63160	,000	973,2821	2116,5379
Gomosidade	% de deformação	707,7900 <sup>†</sup>	280,63160	,017	136,1621	1279,4179
	% de deformação Pó	706,2100 <sup>†</sup>	280,63160	,017	134,5821	1277,8379
	Adesividade	776,2667 <sup>†</sup>	280,63160	,009	204,6388	1347,8945
	Adesividade Pó	778,2933 <sup>†</sup>	280,63160	,009	206,6655	1349,9212
	Mastigabilidade	-5865,2333 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-6436,8612	-5293,6055
	Mastigabilidade					
	Pó	-3397,2533 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-3968,8812	-2825,6255
	Coesividade	771,5267 <sup>†</sup>	280,63160	,010	199,8988	1343,1545
	Coesividade Pó	771,6433 <sup>†</sup>	280,63160	,010	200,0155	1343,2712
	Deformação	761,0833 <sup>†</sup>	280,63160	,011	189,4555	1332,7112
	Deformação Pó	761,0800 <sup>†</sup>	280,63160	,011	189,4521	1332,7079
	Dureza	-757,1667 <sup>†</sup>	280,63160	,011	-1328,7945	-185,5388
	Dureza Pó	-779,7000 <sup>†</sup>	280,63160	,009	-1351,3279	-208,0721
	Gomosidade Pó	167,1000	280,63160	,556	-404,5279	738,7279
	Elasticidade	763,4400 <sup>†</sup>	280,63160	,010	191,8121	1335,0679
	Elasticidade Pó	765,2100 <sup>†</sup>	280,63160	,010	193,5821	1336,8379
Gomosidade	% de deformação	540,6900	280,63160	,063	-30,9379	1112,3179
Pó	% de deformação Pó	539,1100	280,63160	,064	-32,5179	1110,7379
	Adesividade	609,1667 <sup>†</sup>	280,63160	,037	37,5388	1180,7945
	Adesividade Pó	611,1933 <sup>†</sup>	280,63160	,037	39,5655	1182,8212
	Mastigabilidade	-6032,3333 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-6603,9612	-5460,7055
	Mastigabilidade					
	Pó	-3564,3533 <sup>†</sup>	280,63160	,000	-4135,9812	-2992,7255
	Coesividade	604,4267 <sup>†</sup>	280,63160	,039	32,7988	1176,0545
	Coesividade Pó	604,5433 <sup>†</sup>	280,63160	,039	32,9155	1176,1712
	Deformação	593,9833 <sup>†</sup>	280,63160	,042	22,3555	1165,6112
	Deformação Pó	593,9800 <sup>†</sup>	280,63160	,042	22,3521	1165,6079
	Dureza	-924,2667 <sup>†</sup>	280,63160	,002	-1495,8945	-352,6388
	Dureza Pó	-946,8000 <sup>†</sup>	280,63160	,002	-1518,4279	-375,1721
	Gomosidade	-167,1000	280,63160	,556	-738,7279	404,5279

	Elasticidade	596,3400*	280,63160	,041	24,7121	1167,9679
	Elasticidade Pó	598,1100*	280,63160	,041	26,4821	1169,7379
Elasticidade	% de deformação	-55,6500	280,63160	,844	-627,2779	515,9779
	% de deformação Pó	-57,2300	280,63160	,840	-628,8579	514,3979
	Adesividade	12,8267	280,63160	,964	-558,8012	584,4545
	Adesividade Pó	14,8533	280,63160	,958	-556,7745	586,4812
	Mastigabilidade	-6628,6733*	280,63160	,000	-7200,3012	-6057,0455
	Mastigabilidade Pó	-4160,6933*	280,63160	,000	-4732,3212	-3589,0655
	Coesividade	8,0867	280,63160	,977	-563,5412	579,7145
	Coesividade Pó	8,2033	280,63160	,977	-563,4245	579,8312
	Deformação	-2,3567	280,63160	,993	-573,9845	569,2712
	Deformação Pó	-2,3600	280,63160	,993	-573,9879	569,2679
	Dureza	-1520,6067*	280,63160	,000	-2092,2345	-948,9788
	Dureza Pó	-1543,1400*	280,63160	,000	-2114,7679	-971,5121
	Gomosidade	-763,4400*	280,63160	,010	-1335,0679	-191,8121
	Gomosidade Pó	-596,3400*	280,63160	,041	-1167,9679	-24,7121
	Elasticidade Pó	1,7700	280,63160	,995	-569,8579	573,3979
Elasticidade	% de deformação	-57,4200	280,63160	,839	-629,0479	514,2079
Pó	% de deformação Pó	-59,0000	280,63160	,835	-630,6279	512,6279
	Adesividade	11,0567	280,63160	,969	-560,5712	582,6845
	Adesividade Pó	13,0833	280,63160	,963	-558,5445	584,7112
	Mastigabilidade	-6630,4433*	280,63160	,000	-7202,0712	-6058,8155
	Mastigabilidade Pó	-4162,4633*	280,63160	,000	-4734,0912	-3590,8355
	Coesividade	6,3167	280,63160	,982	-565,3112	577,9445
	Coesividade Pó	6,4333	280,63160	,982	-565,1945	578,0612
	Deformação	-4,1267	280,63160	,988	-575,7545	567,5012
	Deformação Pó	-4,1300	280,63160	,988	-575,7579	567,4979
	Dureza	-1522,3767*	280,63160	,000	-2094,0045	-950,7488
	Dureza Pó	-1544,9100*	280,63160	,000	-2116,5379	-973,2821
	Gomosidade	-765,2100*	280,63160	,010	-1336,8379	-193,5821
	Gomosidade Pó	-598,1100*	280,63160	,041	-1169,7379	-26,4821
	Elasticidade	-1,7700	280,63160	,995	-573,3979	569,8579

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 118131,140.

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## Anexo 6: Conteúdo em Compostos Fenólicos nos Pães

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Compostos fenólicos

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	17727,187 <sup>a</sup>	3	5909,062	45,792	,000
Intercept	96878,067	1	96878,067	750,755	,000
Tratamentos	17727,187	3	5909,062	45,792	,000
Error	1032,327	8	129,041		
Total	115637,582	12			
Corrected Total	18759,514	11			

a. R Squared = ,945 (Adjusted R Squared = ,924)

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Compostos fenólicos

LSD

(I) tratamentos	(J) tratamentos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Farinha	Farinha e bagaço	-15,7933	9,27509	,127	-37,1817	5,5951
	Pão	72,7433*	9,27509	,000	51,3549	94,1317
	Pão de Bagaço	62,9400*	9,27509	,000	41,5516	84,3284
Farinha e bagaço	Farinha	15,7933	9,27509	,127	-5,5951	37,1817
	Pão	88,5367*	9,27509	,000	67,1483	109,9251
	Pão de Bagaço	78,7333*	9,27509	,000	57,3449	100,1217
Pão	Farinha	-72,7433*	9,27509	,000	-94,1317	-51,3549
	Farinha e bagaço	-88,5367*	9,27509	,000	-109,9251	-67,1483
	Pão de Bagaço	-9,8033	9,27509	,321	-31,1917	11,5851
Pão de Bagaço	Farinha	-62,9400*	9,27509	,000	-84,3284	-41,5516
	Farinha e bagaço	-78,7333*	9,27509	,000	-100,1217	-57,3449
	Pão	9,8033	9,27509	,321	-11,5851	31,1917

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 129,041.

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.