

**MESTRADO EM CONTROLO DE QUALIDADE**

**AZEITES DOP: AVALIAÇÃO DOS CAROTENÓIDES  
MAIORITÁRIOS ( $\beta$ -CAROTENO E LUTEÍNA)**

**Lúcia Maria Jerónimo Maia**  
**2006**

---

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre,  
apresentada à Faculdade de Farmácia  
da Universidade do Porto

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 06/03/2007
Reg. 4798
Cota

FFM  
KAI  
4798

---

Trabalho realizado no Serviço de Bromatologia da FFUP sob orientação  
das Professoras Doutoradas Beatriz Oliveira e Susana Casal Vicente.

---

“Uma gloriosa árvore floresce na nossa terra diária: nossa doce, prateada ama de leite, a oliveira. Nascida sozinha e imortal, sem temer inimigos, a sua força eterna desafia velhacos, jovens e idosos, pois Zeus e Atena a protegem com olhos insones”.

Sófocles, Édipo

---

## AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento do trabalho experimental decorreu no laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, com a colaboração de diversas pessoas que conheci e com as quais convivi ao longo tempo. Contudo, não posso deixar de mencionar algumas, mostrando a minha profunda gratidão, uma vez que sem elas a concretização deste projecto não teria sido possível.

Agradeço:

- À Prof. Beatriz Oliveira, responsável do Serviço de Bromatologia e minha orientadora, que sempre me apoiou, encorajou a nível académico e pessoal, bem como disponibilizou todas as condições necessárias à realização do meu trabalho.
- À Prof. Susana Casal, também minha orientadora, pela sua paciência, dedicação, empenho e encorajamento, auxiliando-me na resolução dos diversos problemas que sucederam.
- A toda a equipa do Serviço de Bromatologia e também alguns alunos com quem convivi especialmente a Ana Filipa Gomes e a Sara Cunha.
- Ao Prof. Rui Alves, docente do Instituto Politécnico de Viana, pelo importante auxílio no tratamento estatístico dos dados.
- Às minhas colegas da Unidade de Farmácia do Ambulatório do Hospital de São João, Ana Luísa Pereira e Liseta Barros, que sempre me apoiaram e encorajaram.
- Aos meus pais e irmão pela paciência, compreensão, apoio e encorajamento constante que demonstraram ao longo deste tempo.

---

## RESUMO

A dieta Mediterrânica é um padrão alimentar que inclui um estilo de vida e uma cultura típicos, sendo descrito como promotor de saúde e qualidade de vida. O azeite é um dos mais importantes componentes desta dieta, sendo apreciado, num número cada vez maior de países, pelas suas características organolépticas bem como pelas suas propriedades biológicas e preventivas/terapêuticas. O azeite virgem inclui na sua composição compostos com actividade antioxidante, nomeadamente tocoferóis, fenóis e carotenóides. Aos carotenóides é ainda atribuída uma actividade pró-vitamina A, melhoria da funcionalidade de diversos órgãos e do sistema imunitário, bem como prevenção de determinadas patologias (cardiovasculares e cancro).

Os objectivos do presente trabalho consistiram no desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica que permitisse determinar os carotenóides maioritários do azeite, a luteína e o  $\beta$ -caroteno; quantificação dos seus teores em amostras de azeite virgem DOP portuguesas e estrangeiras, no sentido de se tentar estabelecer uma relação entre a origem geográfica e os teores detectados.

Os compostos foram separados por extracção líquido-líquido sendo o  $\beta$ -caroteno quantificado por UV/VIS a 454 nm, por correlação com um padrão externo, e a luteína separada e quantificada por HPLC de fase reversa/detector de díodos, com um padrão interno adequado. O método demonstrou ser reprodutível, preciso e aplicável à quantificação dos dois compostos numa ampla gama de concentrações.

Foram analisados 38 azeites virgem extra DOP, sendo 25 portugueses, 6 espanhóis e 7 italianos. Os teores médios variaram entre 1 e 6 mg/kg para a luteína e 1 e 8 mg/kg para o  $\beta$ -caroteno. Verificaram-se diferenças entre os azeites dos três países em estudo, com os azeites espanhóis a apresentarem valores de  $\beta$ -caroteno inferiores aos restantes, e os azeites italianos com menor teor de luteína. Estas diferenças justificam-se com a origem geográfica, as condições ambientais e a topologia do solo.

---

## ABSTRACT

The mediterranean diet is a food pattern that includes a lifestyle and typical culture, being recognized as contributing to health promotion and life quality. Olive oil is one of the most important components of this diet, being appreciated, in an increasing number of countries, for its organoleptic characteristics, as well as biological and preventive/therapeutical properties. Virgin olive oil contains several compounds with antioxidant activity, namely tocopherols, phenols and carotenoids. A pro-vitamin A activity is also attributed to the carotenoids, together with a increasing functionality of several organs and immune system, as well as prevention of some pathologies (cardiovascular diseases and cancer).

The objectives of this work were to develop and validate an analytical methodology for the quantification of the two main olive oil carotenoids – lutein and  $\beta$ -carotene – and to quantify their amounts in PDO virgin olive oils, aiming to find a correlation with their geographical origins.

The compounds were separated by liquid-liquid extraction.  $\beta$ -carotene was quantified by UV/Vis at 454 nm, by the external standard method, and lutein separated by reversed-phase HPLC/diode-array detection, and quantified at 450 nm, with a suitable internal standard. The method proved to be reproducible, precise, and applicable to the quantification of both compounds in an extent concentration range.

A total of 38 PDO olive oils were analysed, 25 from Portugal, 6 from Spain and 7 from Italy. The mean values ranged from 1 to 6 mg/kg for lutein and from 1 to 8 mg/kg for  $\beta$ -carotene. Significant differences were observed between the three countries, with the Spanish samples presenting the lower  $\beta$ -carotene amounts and the Italian samples the lower lutein amounts. These differences might be justified by their geographical origin together with the environmental conditions and soil topology.

---

## **PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES RELACIONADAS COM O TEMA DESTA DISSERTAÇÃO**

Seminário: “ Importância dos carotenóides na saúde e qualidade de vida”, 27 de Abril de 2005, Faculdade de Farmácia do Porto

### Comunicações:

“Validation of analytical methodology for carotenoid evaluation in olive oil”

Lúcia Maia, Susana Casal, Beatriz Oliveira

4º Encontro do REQUIMTE, Fátima a 31 de Março e 1 de Abril de 2006 (Poster)

“Validação de uma metodologia analítica para quantificação de carotenóides em azeite”

Lúcia Maia, Susana Casal, Beatriz Oliveira, 1º Encontro Nacional de Bromatologia, Hidrologia e Toxicologia, Sesimbra, 2 e 3 de Junho de 2006 (Poster)

“Beta-caroteno e luteína em azeites DOP”

Lúcia Maia, Susana Casal, Beatriz Oliveira, 8º Encontro da Química dos Alimentos, Beja, 4 a 7 de Março de 2007 (Poster).

### Artigos científicos:

“Validation of analytical methodology for carotenoid evaluation in olive oil”, em preparação.

“Quantification of Lutein and  $\beta$ -carotene in Portuguese DOP olive oil”, em preparação.

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac. – Ácido

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

BHT – butil-hidroxitolueno

CE – Comunidade Europeia

CV – coeficiente de variação

DMF - *n,n* –dimetilformamida

DOP - Denominação de Origem Protegida

EUA - Estados Unidos da América

HDL – High Density Lipoprotein (Lipoproteínas de Elevada Densidade)

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IMC – Índice de massa corporal

LDL – Low Density Lipoprotein (Lipoproteínas de Baixa Densidade)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PSA – Prostate-specific antigen (Antigénio específico da próstata)

rpm – rotações por minuto

SFE – Supercritic Fluid Extraction (Extracção com Fluido Supercrítico)

SPE – Solid Phase Extraction (Extracção em Fase Sólida)

TLC – Thin Layer Chromatography (Cromatografia em Camada Fina)

UV/Vis – Ultra-violeta / visível

VLDL – Very Low Density Lipoprotein (Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade)

---

# ÍNDICE

## PREAMBULO

AGRADECIMENTOS .....	IV
RESUMO .....	V
ABSTRACT .....	VI
PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES .....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	VIII
ÍNDICES .....	IX
<b>PARTE TEÓRICA.....</b>	<b>1</b>
<b>1 O AZEITE E A DIETA MEDITERRÂNICA .....</b>	<b>2</b>
1.1 Dieta Mediterrânica .....	2
1.2 Azeite .....	3
1.2.1 Obtenção .....	5
1.2.2 Refinação .....	7
1.2.3 Classificação .....	7
1.2.4 Composição.....	9
1.2.5 Propriedades terapêuticas.....	10
<b>2 CAROTENÓIDES .....</b>	<b>12</b>
2.1 Efeitos benéficos na saúde .....	16
2.1.1 Optimização do funcionamento de órgãos e sistema .....	16
2.1.2 Prevenção de doenças crónicas .....	20
2.2 Propriedades físico-químicas .....	26
2.3 Análise química dos carotenóides.....	27
2.3.1 Amostragem e preparação da amostra .....	28
2.3.2 Extração.....	28
2.3.3 Eliminação da matéria gorda .....	29
2.3.4 Lavagem.....	30
2.3.5 Separação cromatográfica e detecção .....	30
2.3.6 Identificação e quantificação .....	34
2.3.7 Problemas na análise de carotenóides em alimentos .....	36
2.4 Carotenóides nos azeites .....	37
2.4.1 Metodologias analíticas .....	38
2.4.2 Teores de $\beta$ -caroteno e luteína .....	39
<b>3 OBJECTIVOS.....</b>	<b>42</b>
<b>PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>43</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
4.1 Amostragem.....	44
4.2 Reagentes .....	48
4.3 Padrões.....	48
4.4 Equipamento .....	49
4.5 Protocolo Analítico .....	50
4.5.1 Extração.....	50

---

4.5.2 Separação cromatográfica .....	53
4.5.3 Identificação.....	53
4.5.4 Quantificação .....	53
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
5.1 Desenvolvimento do método .....	55
5.1.1 Optimização das condições de extracção e separação cromatográfica .....	55
5.1.2 Identificação dos carotenóides presentes nas amostras .....	60
5.2 Validação .....	71
5.2.1 Linearidade .....	71
5.2.2 Limites de detecção e quantificação .....	73
5.2.3 Precisão .....	74
5.2.4 Exactidão .....	75
5.3 Quantificação .....	75
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>91</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>92</b>

---

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – Tipos de azeite de acordo com o Decreto-Lei nº 16 / 2004 de 14 Janeiro ...	8
TABELA 2 – Estudos que demonstram a relação entre os carotenóides e o risco relativo de doenças cardiovasculares .....	21
TABELA 3 – Estudos epidemiológicos sobre a relação entre os carotenóides e o risco de cancro.....	23
TABELA 4 – Estudos clínicos sobre a relação entre os carotenóides e o risco de cancro	24
TABELA 5 – Metodologias adoptadas na determinação de carotenóides no azeite .....	41
TABELA 6 – AZEITES DOP – Portugueses .....	45
TABELA 7 – AZEITES DOP – Espanhóis .....	46
TABELA 8 – AZEITES DOP – Italianos.....	47
TABELA 9 – Comparação dos métodos de extracção.....	56
TABELA 10 – Determinação do volume de <i>n</i> -hexano que garante a ausência de $\beta$ -caroteno.....	57
TABELA 11 – Utilização do $\beta$ -apo-8'-carotenal como padrão interno.....	58
TABELA 12 – Degradação de carotenóides (luteína) em relação ao tipo de injeção .....	59
TABELA 13 – Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) .....	74
TABELA 14 – Teores médios de luteína e $\beta$ -caroteno nos azeites DOP portugueses avaliados .....	76
TABELA 15 – Teores médios de luteína e $\beta$ -caroteno nos azeites DOP espanhóis avaliados .....	77
TABELA 16 – Teores médios de luteína e $\beta$ -caroteno nos azeites DOP italianos avaliados .....	77
TABELA 17 – Análise da variância dos teores de luteína por país.....	79
TABELA 18 – Diferenças detectadas pelo teste de <i>t</i> Student nos teores de luteína dos azeites DOP dos países analisados.....	80
TABELA 19 – Análise da variância dos teores de $\beta$ -caroteno por país.....	82
TABELA 20 – Diferenças detectadas pelo teste de <i>t</i> Student nos teores de $\beta$ -caroteno dos azeites DOP dos países analisados.....	83
TABELA 21 – Teores médios de luteína e $\beta$ -caroteno dos azeites de regiões.....	88
TABELA 22 – Teste <i>t</i> Student aplicado às diferentes regiões DOP portuguesas.....	89

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Possíveis transformações dos carotenóides.....	13
<b>FIGURA 2</b> – Estrutura química de alguns carotenóides.....	14
<b>FIGURA 3</b> – Origem geográfica das amostras espanholas.....	46
<b>FIGURA 4</b> – Origem geográfica das amostras italianas.....	47
<b>FIGURA 5</b> – Protocolo analítico .....	52
<b>FIGURA 6</b> – Cromatogramas de amostras dos diferentes países a 450 nm.....	60
<b>FIGURA 7</b> – Estrutura espectral.....	61
<b>FIGURA 8</b> – Cromatograma de um extracto de alface a diferentes comprimentos de onda .....	62
<b>FIGURA 9</b> – Espectro de absorção do $\beta$ -caroteno.....	63
<b>FIGURA 10</b> – Espectros de absorção da violaxantina.....	64
<b>FIGURA 11</b> – Espectros de absorção da luteína.....	65
<b>FIGURA 12</b> – Estrutura química do $\beta$ -apo-8'-carotenal .....	66
<b>FIGURA 13</b> – Espectro de absorção do padrão $\beta$ -apo-8'-carotenal.....	66
<b>FIGURA 14</b> – Reacção de feofitinação .....	68
<b>FIGURA 15</b> – Espectros de absorção da clorofila <i>b</i> .....	69
<b>FIGURA 16</b> – Espectro de absorção da clorofila <i>a</i> no extracto de alface .....	69
<b>FIGURA 17</b> – Espectros de absorção da feofitina <i>b</i> no azeite.....	70
<b>FIGURA 18</b> – Espectros de absorção da feofitina <i>a</i> .....	71
<b>FIGURA 19</b> – Linearidade do $\beta$ -caroteno na gama de concentrações testadas.....	72
<b>FIGURA 20</b> – Linearidade da luteína no método analítico.. ..	73
<b>FIGURA 21</b> – Diagramas de caixa e bigode construídos a partir dos teores de luteína... ..	80
<b>FIGURA 22</b> – Diagramas de caixa e bigode construídos a partir dos teores de $\beta$ -caroteno .....	83
<b>FIGURA 23</b> – Gráfico do plano das variáveis canónicas 1 vs 2, mostrando a posição dos azeites analisados em relação a esse plano e também a localização aproximada da luteína e do $\beta$ -caroteno no mesmo plano .....	85
<b>FIGURA 24</b> – Correlação entre os teores de luteína e $\beta$ -caroteno para todas as amostras em análise.....	86
<b>FIGURA 25</b> – Correlação entre os teores de luteína e $\beta$ -caroteno nas amostras de Portugal, Itália e Espanha .....	87

---

# **PARTE TEÓRICA**

# 1 O AZEITE E A DIETA MEDITERRÂNICA

## 1.1 Dieta Mediterrânica

Os alimentos representam, de certa forma, a ligação mais primitiva entre a natureza e a cultura, fazendo parte da raiz que liga um povo, uma comunidade ou grupo à sua terra, à sua alma e à sua história. Pelo referido, a alimentação é mais do que a fonte de nutrientes, com valor nutricional, que o organismo obtém e assimila, para o desenvolvimento das suas funções vitais, nomeadamente crescimento e reprodução.

As sociedades industrializadas actuais praticam padrões alimentares inadequados, que contemplam uma ingestão excessiva de gorduras, principalmente de gorduras saturadas e isómeros *trans* de ácidos gordos, e uma ingestão deficitária de hidratos de carbono complexos, fibras, vitaminas e proteínas vegetais. A este tipo alimentação têm sido associadas diversas patologias, caso das doenças cardiovasculares, cancro, obesidade, osteoporose e anemias (Kushi *et al.*, 1995).

É fundamental alterar esta situação e reconduzir as sociedades a uma dieta moderada e equilibrada, em que os nutrientes menos desejáveis estejam em quantidades reduzidas e os nutrientes com efeitos benéficos na saúde (fibras, hidratos de carbono, ácidos gordos monoinsaturados, vitaminas, minerais e outros compostos minoritários) estejam em quantidades elevadas como ocorre na dieta Mediterrânica original (Gussow, 1995; Willet *et al.*, 1995).

O conceito de dieta Mediterrânica teve origem no “Seven Countries Study” (Kromhout *et al.*, 1989; Keys, 1995; Nestle, 1995) iniciado por Ancel Keys nos anos 50. O estudo correlacionou as dietas e os índices de mortalidade numa população de 12.700 homens, divididos em 11 coortes, e que habitavam em 7 países diferentes: EUA, Finlândia, Japão, Itália, Grécia, Jugoslávia e Países Baixos.

A equipa de investigadores verificou que a esperança de vida dos indivíduos da região mediterrânica era superior, em relação à da restante população, e que o risco de incidência de doenças cardiovasculares e de outras doenças crónicas era o mais baixo. Tudo parecia indicar que o estado de saúde observado na população mediterrânica não estaria relacionado com o tipo de cuidados médicos prestados uma vez que, naquela época, eram bastante limitados (Nestle, 1995; Trichopoulou *et al.*, 2000). Excluídos

outros factores, a população referida possuía padrões alimentares característicos que poderiam contribuir para o seu estado de saúde e que tinham sido associados, por diversos estudos realizados a nível mundial, com a redução do risco de doenças crónicas e uma longa esperança de vida.

A dieta Mediterrânica caracteriza-se tradicionalmente pela abundância de frutos e vegetais (fornecem fibras, sais minerais, vitaminas, carotenóides e compostos fenólicos), cereais e grãos (ricos em hidratos de carbono complexos - milho, massa, cuscus, arroz), leguminosas (fonte de fibras, antioxidantes e fitoestrogénios) e pelo consumo moderado de peixe, carne, vinho e produtos lácteos (ricos em proteínas e aminoácidos essenciais caso do leite, queijo e iogurte). O azeite é a sua principal fonte de gordura. Este é considerado uma gordura saudável devido à sua riqueza em ácidos gordos monoinsaturados (Willet *et al.*, 1995; Lastra *et al.*, 2001, Wahrburg *et al.*, 2002).

O teor em gordura da dieta mediterrânica é de 25 a 35 % das calorias ingeridas, podendo em alguns casos ser superior, dependendo da quantidade ingerida por cada indivíduo. No entanto, trata-se de uma dieta pobre em gorduras saturadas e ácidos gordos *trans* contrariamente à dieta típica americana ou mesmo à do Norte da Europa (Willet *et al.*, 1995; Lastra *et al.*, 2001).

Não existe, no entanto uma dieta Mediterrânica típica, pois a região mediterrânica é constituída por 16 países onde estão incluídos Portugal, Espanha, França, Itália e Grécia. Há então que considerar diferentes factores como a cultura, a religião, a etnia, a economia e o tipo de agricultura responsáveis pelas variações que a dieta Mediterrânica apresenta.

## 1.2 Azeite

A palavra azeite provém do vocábulo árabe “Az-zait” que significa sumo de azeitona, fruto da oliveira (*Olea europaea*). Esta pertence à família botânica *Oleaceae*, que inclui espécies distribuídas por regiões tropicais e temperadas. As plantas desta família são maioritariamente árvores, podendo ocorrer também na forma de trepadeiras. Esta família apresenta mais de 20 géneros onde está incluído o género *Olea*, que engloba 35 espécies. Na espécie *Olea europaea* incluem-se todas as variedades cultivadas e selvagens. Esta espécie é a única que produz frutos comestíveis (Capelo, 2001; Medeiros, 2001).

A oliveira é uma árvore de folha perene, porte médio e crescimento lento. Os frutos surgem, em condições favoráveis, a partir do quinto ano de idade. Caracteriza-se pela sua longevidade e resistência, embora necessite de temperaturas baixas, luminosidade intensa e de um solo de boa qualidade para se desenvolver.

Está presente no território português desde há vários milhões de anos, sendo a sua utilização milenar, cercada de diversas lendas, desconhecendo-se com exactidão a sua origem. Segundo a mitologia grega, dois deuses – Palas Atena e Poseidon – disputavam o controlo de Atenas. Para solucionar o conflito, o Tribunal dos deuses decidiu que o controlo seria entregue a quem criasse a obra mais fantástica. Poseidon pegou no seu tridente e transformou-o num magnífico cavalo (Pégaso). Por sua vez, a deusa Palas Atena (deusa da sabedoria) ofereceu uma oliveira capaz de produzir óleo para iluminar a noite, suavizar a dor dos feridos e capaz de ser alimento precioso, rico em sabor e energia. Tal acto levou a que o tribunal decidisse em seu favor, tornando Palas Atena protectora da cidade e a oliveira um símbolo de paz, prosperidade e da própria cidade de Atenas. Segundo os hebreus, a oliveira nasceu no monte Tabor, no vale do Hebron. Os fenícios, sírios e arménios foram os primeiros povos a consumir o azeite, cabendo aos gregos e romanos a disseminação para a Europa e Ocidente, permanecendo por séculos restrito aos povos mediterrânicos. No século XVI, os espanhóis introduziram o azeite no Peru, Chile e México e no século XVIII nos EUA. A sua importância, ao longo dos tempos, resultou das múltiplas utilizações que lhe foram dadas na alimentação, medicina, higiene e beleza (Garcia *et al.*, 2005).

A qualidade do azeite é determinada pela região, clima, técnica de cultivo (irrigação, drenagem, tratamentos fitossanitários entre outros), método de colheita e transporte, cultivar, estado de maturação das azeitonas, estado sanitário dos frutos, processo de extracção, modo de conservação e idade do azeite (Giovacchino *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2005).

O método de obtenção do azeite envolve uma série de etapas que vão desde a apanha das azeitonas até ao seu armazenamento, passando por uma série de processos que asseguram a sua qualidade e que são abordados a seguir (Giovacchino *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2005).

### **1.2.1 Obtenção**

A oliveira floresce na primavera e o fruto começa a formar-se e a amadurecer, passando da cor verde a negro, desde o Verão até ao final do Outono ou princípio de Inverno, altura em que tem lugar a apanha.

A apanha da azeitona pode realizar-se à mão, recorrendo a varas (bate-se a árvore com varas largas e flexíveis para que as azeitonas caiam sobre os panais) e, mais modernamente, utilizando meios mecânicos de vibração da árvore.

#### **Transporte da azeitona até ao lagar**

As azeitonas colhidas são transportadas para o lagar onde são processadas. As azeitonas apanhadas do solo não devem ser transportadas juntamente com as que são colhidas da árvore. O transporte deve ser feito em caixas rígidas, abertas, de modo a que não ocorram fermentações indesejáveis.

Idealmente, as azeitonas devem ser processadas num período de 24 horas após a sua colheita, no sentido de se obter um azeite de qualidade.

#### **Operações preliminares**

Ao entrar no lagar as azeitonas devem ser classificadas em função da variedade, proveniência (solo ou árvore), e se se encontram sãs ou atacadas por agentes patogénicos, como a mosca da azeitona.

Em cada grupo, as azeitonas são ventiladas de maneira a que as correntes de ar separem as folhas que as acompanham e são lavadas com água corrente.

#### **Moenda da azeitona limpa e preparação da pasta**

A moenda consiste na trituração da azeitona (sem retirar previamente os caroços) até formar uma pasta. Antigamente eram utilizados moinhos de pedra (mós ou galgas). Actualmente recorre-se a moinhos de martelo metálicos.

De seguida a pasta é batida e aquecida ligeiramente numa termobatedeira de maneira a aumentar o rendimento da extracção, facilitando a separação do azeite.

### **Extracção (Separação da fase sólida das fases líquidas)**

Quando a massa está convenientemente batida e aquecida, procede-se à extracção propriamente dita, ou seja, à separação da fase sólida (o bagaço) das fases líquidas (o azeite e a água de vegetação).

Este processo pode ser realizado por diversos tipos de sistemas:

- sistema de pressão clássico – corresponde ao processo dos lagares artesanais. A pasta moída era colocada entre os capachos e submetida a pressão para separar as fases líquidas sendo estas separadas posteriormente por centrifugação.
- sistema por centrifugação (contínuo) – pode ser de três fases ou de duas fases. No sistema de três fases, a pasta de azeitonas é diluída (1 litro de água por cada quilo de pasta). De seguida, a pasta passa para uma centrífuga horizontal, na qual a parte sólida é separada do mosto oleoso. O mosto vai para uma centrífuga vertical que separa o azeite da água de vegetação.

No sistema de 2 fases, o processo é praticamente igual ao anterior, sem adição de água. Em ambos os casos este sistema apresenta diversas vantagens: elevada capacidade de produção, redução do tempo de armazenamento das azeitonas, evitando fermentações e melhorando a qualidade do azeite extraído; redução da perda dos antioxidantes e do impacto ambiental.

### **Armazenamento**

O azeite é armazenado em adegas ou armazéns até à sua comercialização. O espaço ideal deve ter paredes e tectos que o protejam das temperaturas elevadas e que não deixem passar odores estranhos. A temperatura ideal de armazenamento situa-se entre os 15 e os 18°C, o que permite uma correcta maturação sem favorecer a sua oxidação.

Deverá existir pouca luminosidade. O material dos recipientes de armazenamento deve ser inerte (aço inoxidável, fibra de vidro, poliéster, etc.).

### **1.2.2 Refinação**

Os azeites virgens podem apresentar defeitos, nomeadamente excesso de acidez, cor ou odor estranhos. Estes podem ser devido a diferentes factores tais como condições climatéricas adversas, colheitas tardias, tipo de solo, longos períodos de espera para processamento ou falhas no processo produtivo. Estes defeitos tornam os azeites impróprios para consumo. Os azeites nesta situação são designados “azeite lampante” e são posteriormente submetidos a refinação.

A refinação consiste em três fases, visando cada uma eliminar um determinado defeito:

- neutralização - reduz a acidez do azeite, recorrendo a soluções alcalinas ou à destilação selectiva com solvente adequado.
- branqueamento - retira parte da cor tornando o azeite num líquido semitransparente; são utilizados adsorventes inertes ou processos membranares.
- desodorização – retira o odor indesejado do azeite lampante com a passagem de vapor de água em ambiente rarefeito.

De seguida, o azeite refinado é misturado, em proporção variável, com azeites virgens originando produtos adequados ao consumo, de acordo com a legislação nacional - Decreto-Lei nº 16/2004 de 14 Janeiro - a qual, não permite a venda de azeite refinado estreme.

### **1.2.3 Classificação**

Os azeites, consoante as características (pontuação organoléptica e acidez livre) e a utilização podem ser classificados em diversos tipos, conforme indicado na Tabela 1.

**TABELA 1** – Tipos de azeite de acordo com o Decreto-Lei nº 16 / 2004 de 14 Janeiro

<b>Tipo de Azeite</b>	<b>Pontuação organoléptica</b>	<b>Acidez Livre (% de Ac. Oleico)</b>	<b>Utilização</b>
Azeite Virgem Extra	$\geq 6,5$	$\leq 1$	Venda directa ao consumidor
Azeite Virgem	$\geq 5,5$	$\leq 2$	Venda directa ao consumidor
Azeite Corrente (virgem)	$\geq 3,5$	$\leq 3,3$	Para lotear com o Azeite refinado
Azeite Lampante (virgem)	$< 3,5$	$> 3,3$	Indústria de refinação, saboaria, farmácia, cosmética
Azeite Refinado	--	$\leq 0,3$	Para lotear com o Azeite virgem
Azeite	--	$\leq 1,5$	Mistura de Azeite Virgem e Azeite Refinado.

Entre os azeites que se encontram disponíveis no mercado podem ainda encontrar-se os azeites com Denominação de Origem Protegida (DOP), os azeites de agricultura biológica, azeites de quinta e os azeites elementares ou monovarietais.

Os azeites DOP têm origem numa área geográfica delimitada, com solos e clima característicos e são exclusivamente elaborados com azeitonas de certas variedades de oliveira. Estes factores, aliados ao saber fazer tradicional da região, que se coaduna no modo de condução das árvores, apanha da azeitona e extracção do azeite, conferem-lhes tipicidade e características qualitativas que os permitem distinguir dos demais. Portugal possui, actualmente, cinco Denominações de Origem Protegida para azeites: azeites de Trás-os-Montes, Beira Interior (Beira Alta e Beira Baixa), Ribatejo, Norte Alentejano e Moura (Regulamento CE nº 1107/96, 12 de Junho de 1996).

Os azeites de agricultura biológica são provenientes de olivais conduzidos de acordo com o modo de produção biológico, tal como previsto pela Regulamentação Europeia (Regulamento CE nº 329/2004, 24 de Junho 2004). Este modo de produção obriga a diversos condicionalismos importantes, designadamente à manutenção do fundo de fertilização dos solos, à utilização de rotações adequadas e ao respeito por normas fitossanitárias e de fertilização muito estreitas, sendo praticamente interdita a utilização de produtos químicos de síntese.

Os azeites de quinta correspondem a azeites em que todas as operações desde o cultivo da oliveira até ao embalamento são efectuadas na área da exploração da quinta. Aguardam publicação de legislação regulamentar.

Os azeites elementares ou monovarietais são obtidos de uma só variedade de azeitona.

#### 1.2.4 Composição

O azeite virgem é o sumo da azeitona, extraído por processos mecânicos e físicos, que conserva o sabor, o aroma, as vitaminas, os antioxidantes e todas as propriedades daquele fruto, sendo a única gordura vegetal que pode ser consumida sem processamento, além da extracção.

Quimicamente o azeite é constituído por diversos compostos que se dividem em duas fracções: saponificável e insaponificável. A fracção saponificável representa 98,5-99,5% da percentagem total do azeite, enquanto a insaponificável representa 0,5-1,5% da restante. A fracção saponificável é constituída essencialmente por ácidos gordos na forma de triacilgliceróis.

Os triacilgliceróis são os principais componentes do azeite. O seu ácido gordo maioritário é o ácido oleico (O) (55-83%). Contém ainda ácido palmítico (P), esteárico (S), linoleico (L) e linolénico (Ln), bem como outros em quantidades vestigiais. Os terores de ácidos gordos saturados e polinsaturados são da ordem dos 6 e 15%, respectivamente, maioritariamente em configuração *cis*. Os triacilgliceróis mais abundantes são: OOO, POO, LOO, SOO, POL, o que está em conformidade com a sua riqueza em ácido oleico (Cunha *et al.*, 2005; 2006). A determinação do seu perfil é importante na detecção de adulterações.

A fracção insaponificável é bastante complexa sendo constituída por diversos tipos de compostos: hidrocarbonetos, álcoois alifáticos, ceras, compostos voláteis, clorofilas, esteróis e antioxidantes (compostos fenólicos, tocoferóis e carotenóides) (Lastra *et al.*, 2001; Belitz *et al.*, 2004).

Os esteróis são componentes essenciais da membrana celular e no azeite representam 20% da fracção insaponificável. O principal esterol é o  $\beta$ -sitosterol (90-95% do total dos esteróis), constituindo o campesterol e o estigmasterol cerca de 3% e 1% respectivamente (Belitz *et al.*, 2004).

Os compostos fenólicos estão presentes na polpa da azeitona e são maioritariamente hidrossolúveis. No entanto, o azeite contém ainda alguma quantidade destes compostos, o que permite aumentar a sua estabilidade oxidativa e melhorar o “flavor”, além de exibir actividade antioxidante. O processo de refinação também contribui para a redução dos teores de compostos fenólicos no azeite. Os fenóis podem dividir-se em compostos simples (hidroxitirosol, tirosol e os ácidos gálico, *p*-cumárico, cafeico e vanílico) e complexos (secoiridóides como a oleuropeína e o ligstrósido, os lignanos e os flavonóides como a luteolina e a apigenina) (Lastra *et al.*, 2001).

Os tocoferóis exibem acção antioxidante, contribuindo para a estabilidade do azeite e preservando a sua qualidade. O teor total nos azeites ronda os 200 mg/kg, constituindo o  $\alpha$ -tocoferol mais de 90 % do total de tocoferóis. São ainda detectados o  $\beta$  e  $\gamma$ -tocoferóis, mas em quantidades muito reduzidas. Os tocoferóis são parcialmente destruídos durante o processo de refinação, armazenamento e pela acção da luz (Lastra *et al.*, 2001; Belitz *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2004).

Os carotenóides, em conjunto com as clorofilas, são os principais pigmentos presentes no azeite. Contribuem não só para a sua coloração, mas também para a sua actividade antioxidante. Estes compostos encontram-se divididos em dois grupos: carotenos e xantofilas. No azeite, o  $\beta$ -caroteno e a luteína são os carotenóides predominantes, embora também se possa encontrar neoxantina e violaxantina em quantidades mais reduzidas (Lastra *et al.*, 2001; Harwood *et al.*, 2002). Mais à frente irá ser realizada uma abordagem mais pormenorizada sobre as acções, propriedades e métodos utilizados na análise dos carotenóides.

### 1.2.5 Propriedades terapêuticas

O azeite é um dos principais responsáveis pelo facto da dieta Mediterrânica contribuir para a diminuição de incidência de doenças cardiovasculares e de outras doenças crónicas (Wahrburg *et al.*, 2002).

O azeite é constituído maioritariamente por ácidos gordos monoinsaturados. Vários estudos revelam que a ingestão elevada destes ácidos diminui os teores de colesterol, sobretudo o LDL e de triglicéridos e previne o risco de doenças cardiovasculares. A presença de ácidos gordos monoinsaturados reduz ainda os níveis plasmáticos de glucose

e de insulina, nos indivíduos diabéticos do tipo 2, quando comparado com o efeito produzido por gorduras saturadas (López-Miranda *et al.*, 2006). Estes estudos sugerem também que as partículas de LDL ricas em ácido oleico são mais resistentes a modificações oxidativas, uma vez que este ácido gordo monoinsaturado influencia a vasodilatação do endotélio e reduz a capacidade da partícula de LDL em promover a adesão e quimiotaxia dos monócitos. Por outro lado, os ácidos gordos monoinsaturados diminuem o ambiente protrombótico, pois modificam os fenómenos de adesão plaquetária, coagulação e fibrinólise (López-Miranda *et al.*, 2006).

O azeite é rico em tocoferóis, compostos fenólicos (como o hidroxitirosol e a oleuropeína) e esqualeno, que lhe conferem um grande poder antioxidante, capaz de proteger as camadas mais profundas da pele contra a oxidação, neutralizando os radicais livres, razão pela qual pode ser utilizado como cosmético (Medeiros, 2001).

O azeite contribui ainda para o bom funcionamento do estômago, do pâncreas, do sistema hepato-biliar e dos intestinos, uma vez que estimula a produção de suco hepático, ajuda no esvaziamento gástrico e facilita a absorção intestinal de vitaminas lipossolúveis e alguns minerais (Medeiros, 2001).

Diversos estudos epidemiológicos revelam que o azeite reduz a incidência de cancro, nomeadamente cancro colorectal e da mama (Medeiros, 2001).

## 2 CAROTENÓIDES

Os carotenóides são, sem dúvida, o grupo de pigmentos naturais que, devido à sua vasta distribuição, diversidade estrutural e numerosas funções, apresenta maior importância nos seres vivos.

O termo carotenóides deriva de caroteno, o pigmento cor de laranja, que Wackenroder isolou, em 1831, da raiz da cenoura, *Daucus carota*. Seis anos mais tarde Berzelius designou por xantofilas os pigmentos amarelos que obteve das folhas amarelas do Outono (Minguez-Mosquera *et al.*, 2002a).

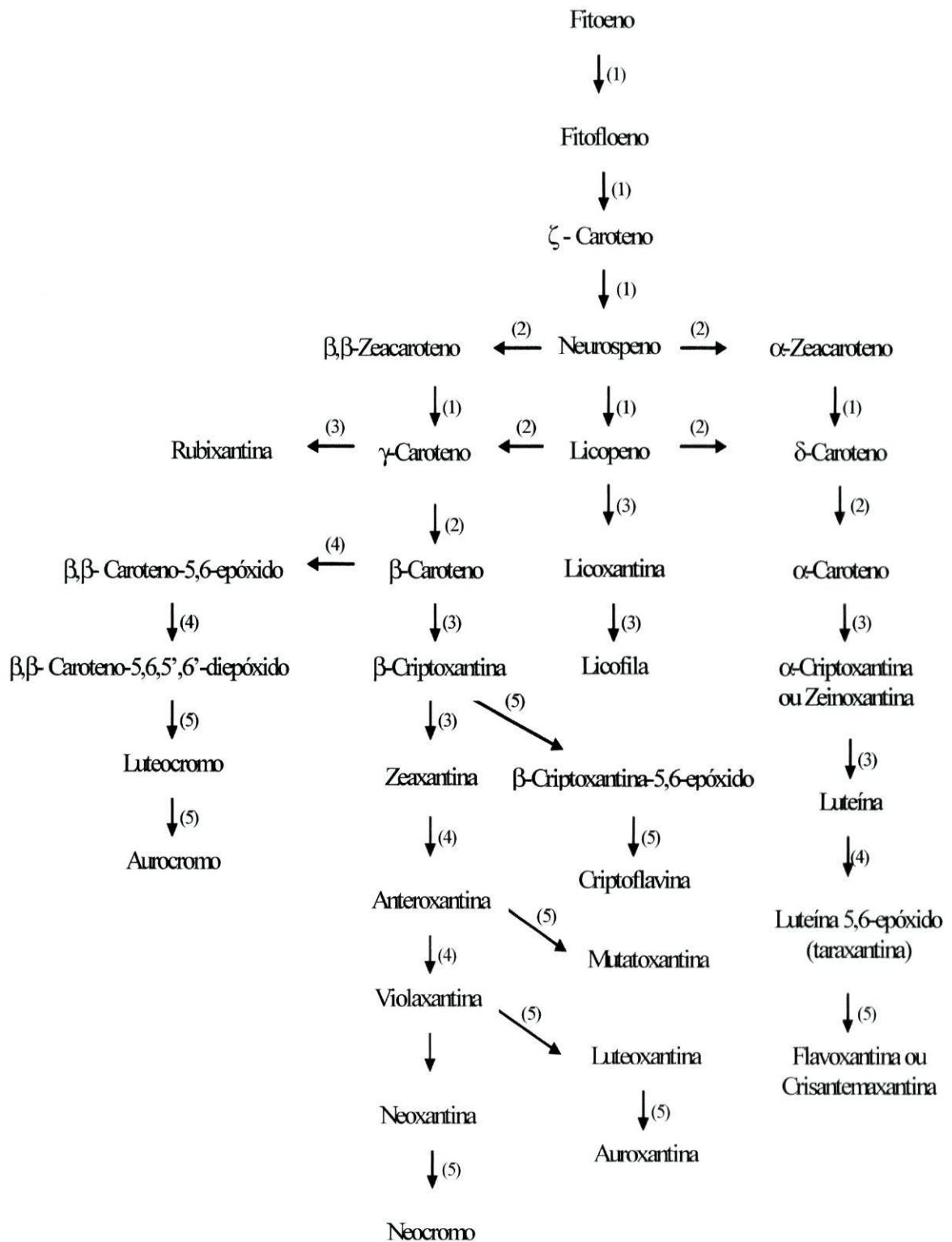
Os carotenóides são compostos tetraterpenóides  $C_{40}$ , constituídos por 8 unidades de isopreno  $C_5$ , ligadas de forma a que a sequência seja reversa ao centro. O esqueleto simétrico linear pode sofrer diversas modificações (Figuras 1 e 2):

1. desaturação – exemplo: fitofloeno e  $\zeta$ -caroteno
2. ciclização numa ou em ambas as extremidades da molécula originando anéis cíclicos como os anéis  $\beta$ -ionona – exemplo:  $\alpha$ ,  $\beta$ -caroteno
3. hidroxilações – exemplo: zeaxantina e luteína
4. epoxidações - exemplo: neoxantina, violaxantina
5. rearranjos epóxido-furanóide – exemplo: capsantina e capsorubina

Estão descritos na natureza mais de 600 carotenóides, predominantemente na configuração *trans* (mais estável que a *cis*) que se classificam em:

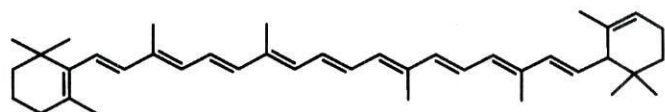
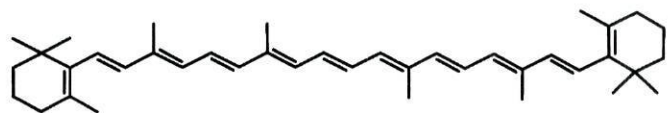
- Carotenos, quando constituídos apenas por carbono e hidrogénio (hidrocarbonetos);
- Xantofilas, quando apresentam oxigénio na sua estrutura, além de carbono e hidrogénio.

Os carotenóides são responsáveis pelas cores exibidas pelos frutos, raízes, legumes, flores, plantas, algas, bactérias, fungos, leveduras e alguns animais. Mas somente os organismos fotossintéticos são capazes de os sintetizar, tendo os animais de os obter através da dieta (Britton *et al.*, 1995a; Minguez-Mosquera *et al.*, 2002a; Belitz *et al.*, 2004).

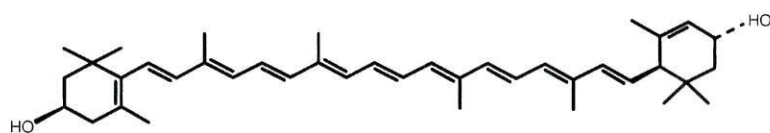


**FIGURA 1** – Possíveis transformações dos carotenóides. (1). Desaturação; (2). Ciclização; (3). Hidroxilação; (4). Epoxidação; (5). Rearranjo epóxido-furanóide (Rodríguez-Amaya, 1999)

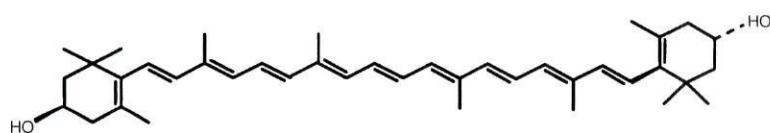
## Carotenóides cíclicos

 $\alpha$ -caroteno $\beta$ -caroteno

## Hidroxicarotenóides

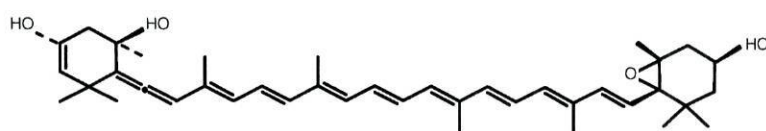


Luteína

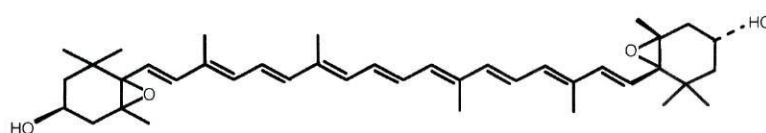


Zeaxantina

## Epoxycarotenóides



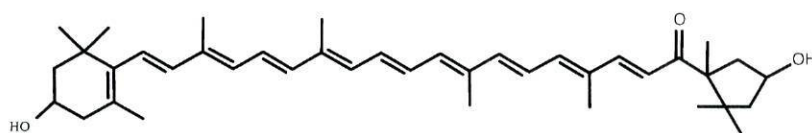
Neoxantina



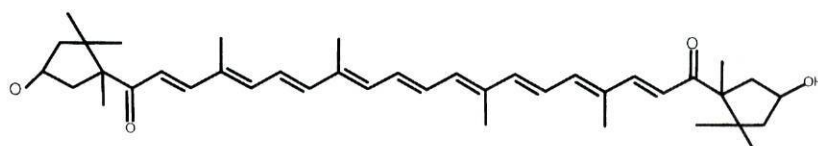
Violaxantina

## Carotenóides típicos de determinadas espécies

(epóxidos com grupos furanos)



Capsantina



Capsorubina

**FIGURA 2** – Estrutura química de alguns carotenóides (adaptado de Belitz *et al.*, 2004)

Encontram-se nos cloroplastos e cromoplastos, e tal como as clorofilas, intervêm no processo da fotossíntese, nomeadamente em funções de fotoprotecção (carotenos) e captação de energia (xantofilas) (Britton *et al.*, 1995b; Minguez-Mosquera *et al.*, 2002a).

Estima-se que a Natureza produza aproximadamente 100 milhões de toneladas de carotenóides por ano (Minguez-Mosquera *et al.*, 2002a). Tal facto é aproveitado pela indústria alimentar que, com o intuito de captar a atenção dos consumidores, tem vindo a utilizar estes compostos como aditivos alimentares (exemplo: E160d = licopeno; E161b = luteína) obedecendo à legislação em vigor – Decreto-lei nº193/2000 de 18 de Agosto.

O papel desempenhado pelos carotenóides como precursores da vitamina A é conhecido há bastante tempo. No entanto, somente 50 das mais de 600 estruturas conhecidas de carotenóides na Natureza exibem actividade pró-vitamina A. Esta actividade é importante, na medida em que estes compostos constituem uma reserva desta vitamina no organismo, podendo ser utilizada sempre que necessário, evitando-se a potencial toxicidade associada à presença de doses elevadas (Britton *et al.*, 1995b).

Um carotenóide possui actividade pró-vitamina A quando apresenta na sua estrutura pelo menos um anel  $\beta$ -ionona que não esteja substituído e uma cadeia poliénica com 11 átomos de carbono. O  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno,  $\alpha$ -criptoxantina e  $\beta$ -criptoxantina são compostos que possuem pelo menos um dos anéis  $\beta$ -ionona não substituídos, sendo o  $\beta$ -caroteno o que apresenta maior actividade pró-vitáminica (100%) (Rodríguez-Amaya, 1997; Minguez-Mosquera *et al.*, 2002a).

Os carotenóides são também antioxidantes eficazes, pois removem espécies reactivas que oxidam componentes celulares do organismo, caso dos ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas e ácidos gordos insaturados, através de um mecanismo físico ou químico (Martin *et al.*, 1999).

O mecanismo físico consiste na captura do singuleto de oxigénio com dissipação de energia sob a forma de calor, sem alteração da estrutura do carotenóide. A capacidade de captura depende do sistema de ligações duplas conjugadas, da presença de grupos funcionais e ainda de diferentes condições experimentais como a temperatura, intensidade da luz, concentração de carotenóide e de solvente. O licopeno demonstrou ser o mais eficaz.

Os carotenóides podem reagir também com radicais livres. A reacção química entre as espécies radicalares e os carotenóides originam diversos produtos, de acordo com o tipo de processo envolvido. Estes consistem em:

- 1) transferência de electrões - os carotenóides reagem com os radicais, removendo-lhes o electrão desemparelhado que exibem, ou associando-se a eles na tentativa de emparelhar o referido electrão, dando origem a um aducto;
- 2) reacção de adição - a adição de um electrão à molécula de carotenóide origina um aducto de carotenóide com um electrão desemparelhado deslocalizado, que reage para estabilizar a molécula, originando um produto não radicalar estável;
- 3) subtracção do hidrogénio - a perda de um hidrogénio origina um radical carotenóide neutro (Martin *et al.*, 1999).

## **2.1 Efeitos benéficos na saúde**

Os carotenóides ingeridos na dieta acumulam-se em diversos órgãos como a pele, mama, próstata, cólon e pulmão. A sua acumulação, de acordo com inúmeros estudos, apresenta efeitos benéficos para a saúde, contribuindo para a optimização do funcionamento de determinados órgãos e sistema são de citar a sua importância na pele, olho, pulmão e sistema imunitário, além da prevenção do risco de doenças crónicas como as doenças cardiovasculares e o cancro.

### **2.1.1 Optimização do funcionamento de órgãos e sistema**

#### **2.1.1.1 Pele**

A pele é o órgão que assegura as reacções entre o meio interior e o exterior. Ao ser exposta à radiação UV pode sofrer dano fotoxidativo devido à formação de espécies reactivas de oxigénio (singuleto do oxigénio, anião superóxido e radicais peróxilo).

Os carotenóides tal como a melanina, contribuem para a cor da pele, encontrando-se em níveis elevados nas costas, palmas das mãos e testa (0,22-0,49 nmol/g) e em níveis reduzidos nas outras regiões corporais (0,01-0,10 nmol/g). A sua distribuição não homogénea parece estar relacionada com as diferenças na vascularização da pele em diversas regiões, assim como na exposição à radiação UV a longo prazo (Stahl *et al.*, 2000).

Estudos realizados por Stahl *et al.* (1998), Lee *et al.* (2000) e Heinrich *et al.* (2003) em indivíduos com uma dieta suplementada em carotenóides, revelaram um aumento significativo de carotenóides no soro e na pele, nomeadamente de  $\beta$ -caroteno; verificaram ainda a redução de eritema, comparativamente aos registados no período que antecedeu a suplementação. Tal facto parece estar relacionado com reduções significativas da quantidade de lípidos peroxidados no soro, sugerindo que os carotenóides impedem a formação de espécies reactivas de oxigénio responsáveis pelo aparecimento de eritema.

O grau de protecção conferido, nomeadamente pelo  $\beta$ -caroteno, é pequeno quando comparado com o dos protectores solares convencionais. Contudo, quando ingerido, o  $\beta$ -caroteno confere uma protecção adicional, que parece ser devida a alterações ligeiras na pigmentação da pele e ao aumento da actividade antioxidante (Stahl *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000; Heinrich *et al.*, 2003).

### 2.1.1.2 Olhos e Visão

A luz que chega aos olhos sofre refacção ao passar num sistema de lentes convergentes que formam uma imagem, a retina. Esta é composta por células fotossensíveis, neurónios especializados, e na parte posterior apresenta uma pequena depressão, próxima ao nervo óptico denominada *mácula lútea*. Trata-se de uma região da retina altamente especializada para a visão de alta resolução, uma vez que é responsável pelo detalhe pormenorizado no centro do campo visual.

Os investigadores designaram-na *mácula lútea* ou "ponto amarelo" devido à presença de elevadas concentrações de pigmentos de cor amarela, os di-hidroxicarotenóides – luteína e zeaxantina. A concentração destes carotenóides na mácula é cinco vezes superior à encontrada na retina periférica, sendo a sua constituição

mantida à custa dos nutrientes da dieta. A luteína e a zeaxantina, uma vez absorvidas e metabolizadas, acumulam-se na mácula. A zeaxantina acumula-se na região central, enquanto que a luteína se distribui ao longo de toda a retina.

O pigmento macular apresenta capacidade antioxidante, pois é capaz de capturar o singuleto de oxigénio, o estado tripleto das moléculas fotossensibilizadas e reagir com os radicais livres, de modo a retardar a peroxidação dos fosfolípidos da membrana. Funciona também como um filtro óptico, uma vez que reduz a aberração cromática provocada pela radiação azul, cujo comprimento de onda está próximo do UV, protegendo a retina dos danos nocivos (Snodderly, 1995; Sommerburg *et al.*, 1998; Beatty *et al.*, 1999).

A redução do risco de determinadas patologias oculares como a degeneração macular relacionada com a idade (principal causa de cegueira irreversível em indivíduos com idade superior a 65 anos) e cataratas (patologia prevalente em indivíduos fumadores e expostos aos raios UV) tem sido associada com a ingestão de alimentos ricos em luteína e zeaxantina (Jacques *et al.*, 1991; Beatty *et al.*, 1999; Omedilla *et al.*, 2003).

### 2.1.1.3 Função pulmonar

O pulmão é um órgão muito susceptível ao stresse oxidativo, devido ao grande volume de oxigénio que o atravessa e à presença de outros agentes oxidantes, como o ozono (agente apto a reagir e a modificar as estruturas dos componentes celulares).

A relação entre os antioxidantes provenientes da dieta, em particular os carotenóides, e as disfunções pulmonares, caso da asma, bronquite, enfisema e doença pulmonar crónica específica e não específica, tem sido alvo de estudo. Grievink *et al.* (2000) e Schünemann *et al.* (2001) realizaram estudos para avaliar a possível relação entre os níveis séricos de carotenóides ( $\beta$ -criptoxantina, luteína, zeaxantina,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e licopeno) e os indicadores da função pulmonar: volume expirado forçado (VEF) e capacidade vital forçada (CVF). Os resultados demonstraram relações positivas significativas para o  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina, sendo este último, o carotenóide que apresentou a correlação mais elevada.

Estes compostos acumulam-se nos fluidos, no epitélio pulmonar e nas células pulmonares, nomeadamente no interior de macrófagos, demonstrando potencial para proteger a integridade e a função pulmonar, uma vez que as suas concentrações

fornece um nível de protecção adicional contra o dano oxidativo (Grievink *et al.*, 2000; Schünemann *et al.*, 2001; Arab *et al.*, 2002).

#### 2.1.1.4 Sistema Imunológico

O sistema imunológico apresenta como principal função a defesa do organismo, identificando, memorizando, atacando e destruindo agentes invasores (vírus, bactérias, fungos, parasitas) que estão na origem de diversas patologias. Porém, a sua acção encontra-se condicionada por determinados factores (a radiação UV, o tabaco e o envelhecimento) que provocam um aumento de radicais livres e consequentemente uma diminuição da resposta imunológica, essencialmente a mediada por células B e T.

Os carotenóides têm capacidade para minimizar os efeitos que cada factor exerce sobre o sistema imunológico. O  $\beta$ -caroteno e outros carotenóides presentes na dieta, como a cantaxantina, podem bloquear a formação do singuleto de oxigénio (composto imunossupressor induzido pela radiação UV) e impedir a formação de micronúcleos nos linfócitos (resultantes da incidência de raios X), reduzindo desta forma os efeitos imunossupressores (Bendich, 1993; Umegaki *et al.*, 1994; Meydani *et al.*, 1995).

A suplementação da dieta de indivíduos idosos com carotenóides é importante para reforçar o equilíbrio oxidante-antioxidante e consequentemente garantir um bom funcionamento do sistema imunológico.

A suplementação com  $\beta$ -caroteno revelou um aumento significativo do número de células T “helper” (células T que accionam o alarme de emergência e ajudam as outras células T citotóxicas) e das células “natural killers” (primeira linha de defesa do organismo contra os agentes invasores, que actuam por conta própria). A influência sobre a actividade “natural killer” pode ser directa, uma vez que induz um aumento das concentrações plasmáticas do factor necrosante tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), aumento esse que estimula a activação das células “natural killer”, contribuindo para o aumento da actividade das mesmas; ou indirecta, pois ao promover a produção da interleucina 1 (IL-1), esta estimula a produção de outra interleucina, a IL-2, que exhibe um efeito indutor na proliferação das células “natural killer” (Meydani *et al.*, 1995).

A suplementação, ao que tudo indica, é mais eficaz na promoção da imunidade natural (envolve as células “natural killers”) do que na imunidade mediada pelas células B. Porém, esta eficácia está condicionada pela presença de diversos factores como a dose exacta de  $\beta$ -caroteno administrada, a idade e o estado de saúde do indivíduo.

A astaxantina é um carotenóide que também exerce efeitos sobre o sistema imunitário, por aumentar significativamente a produção das imunoglobulinas IgM e IgG (Meydani *et al.*, 1995).

## **2.1.2 Prevenção de Doenças Crónicas**

### **2.1.2.1 Doenças cardiovasculares**

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte nos EUA e a terceira a nível global. A OMS estima que, em 2010, as doenças cardiovasculares se tornem na principal causa de morte nos países desenvolvidos (Wilcox, 2003).

A dieta desempenha um papel importante na redução do risco de doenças cardiovasculares, pois a ingestão de determinados nutrientes, nomeadamente os antioxidantes, reduzem os factores de risco (hipertensão, aumento de peso, quantidade de lípidos plasmáticos e lipoproteínas) associados a esta patologia.

Os antioxidantes, em particular os carotenóides, contribuem para a defesa do organismo, conforme referido, uma vez que inibem a formação de agentes oxidantes e interceptam acções prejudiciais causadas pelos agentes oxidantes formados (Rao, 2002). Acredita-se que os carotenóides serão capazes de prevenir a formação de hidroxiperóxidos lípidicos ao inibirem a propagação de radicais livres, durante a oxidação lípidica (Falks *et al.*, 2001).

Vários estudos epidemiológicos e clínicos visaram estabelecer o tipo de relação entre os carotenóides e o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, conforme se pode constatar na Tabela 2. Os estudos epidemiológicos evidenciam uma correlação negativa entre a ingestão de carotenóides e as doenças cardiovasculares. Significa que os carotenóides são compostos capazes de inibir o dano oxidativo provocado nos lípidos, proteínas e ADN, retardando a progressão da doença. Contudo, o

ensaio clínico revela que a suplementação com  $\beta$ -caroteno não exerce um efeito benéfico na prevenção das patologias cardiovasculares.

Esta controvérsia nos resultados evidencia necessidade de mais estudos nesta área.

**TABELA 2** – Estudos que demonstram a relação entre os carotenóides e o risco relativo de doenças cardiovasculares

<b>Autores</b>	<b>Localização</b>	<b>Tipo de estudo</b>	<b>Casos</b>	<b>Carotenóides</b>	<b>Risco relativo ajustado</b>
Riemersma <i>et al.</i> , 1991*	Reino Unido	epidemiológico	110	caroteno	↓
Kaardinaal <i>et al.</i> , 1993*	10 países europeus <sup>†</sup>	epidemiológico Euramic	683	$\beta$ -caroteno	↓
Street <i>et al.</i> , 1994	EUA	epidemiológico	123	$\beta$ -caroteno licopeno luteína zeaxantina	↓ ↓ ↓ ↓
Kolmeirer <i>et al.</i> , 1997	10 países europeus <sup>†</sup>	epidemiológico	662	$\alpha$ -caroteno $\beta$ -caroteno	↓ ↓ ↓
Klipstein-Grobusch <i>et al.</i> , 1999	Roterdão, Holanda	epidemiológico	124	$\beta$ -caroteno	↓
Osganian <i>et al.</i> , 2003	11 Estados dos EUA	epidemiológico	998	$\beta$ -caroteno $\alpha$ -caroteno	↓ ↓
Hennekens <i>et al.</i> , 1996	EUA	clínico duplamente cego controlado com placebo	468 <sup>a</sup> /489 <sup>b</sup>	$\beta$ -caroteno	-

a – n° casos do grupo do  $\beta$ -caroteno; b – n° casos do grupo placebo; – não se verificou qualquer relação;

<sup>†</sup> Portugal não se encontra incluído; \*Retirado do Kritchevsky (1999).

### 2.1.2.2 Cancro

O cancro é a segunda causa de morte nos EUA. A principal causa para o desenvolvimento de cancro parece ser o dano provocado no ADN e noutros componentes celulares pelas espécies reactivas de oxigénio. Estas podem induzir mutações, oxidar lípidos e proteínas e alterar sinais de transdução, favorecendo o desenvolvimento da carcinogénese.

A dieta, apesar de ser também um factor de risco para a incidência de cancro, desempenha também um papel importante na terapêutica desta patologia. Os compostos antioxidantes presentes na dieta são adjuvantes na terapêutica do cancro, contribuindo, de acordo com vários estudos, para a diminuição da mesma (Borek, 2004).

As Tabelas 3 e 4 apresentam alguns estudos epidemiológicos e clínicos realizados visando estabelecer uma relação entre a ingestão de carotenóides e a incidência de cancros com maior prevalência na população: cólon, mama, próstata e pulmão.

Os resultados dos estudos epidemiológicos evidenciam um efeito protector por parte dos carotenóides em relação ao risco de cancro. Contudo, em alguns casos, os factores adjacentes (como o tabaco) podem influenciar a acção de determinado carotenóide, como é o caso do  $\beta$ -caroteno. Este, em vez de contribuir para a redução do risco de cancro favorece, pelo contrário, o desenvolvimento do processo de carcinogénese em fumadores.

Os resultados dos ensaios clínicos, por sua vez, revelam que os carotenóides, em particular o  $\beta$ -caroteno, exercem um efeito nocivo. Algumas explicações, relativamente ao efeito carcinogénico exibido pelo  $\beta$ -caroteno no que toca ao pulmão, foram sugeridas por estudos realizados em animais, mais propriamente, no furão – animal em que o metabolismo dos carotenóides é semelhante ao Homem (Russel, 2002). Os resultados desses estudos revelaram que a presença do fumo do tabaco no pulmão criava condições extremamente oxidativas, propícias ao desenvolvimento de reacções de oxidação do  $\beta$ -caroteno. Os metabolitos resultantes dessas reacções (8',10',12' e 14'-carotenal) promoviam a destruição massiva do ácido retinóico presente no pulmão, por indução das enzimas do citocromo P450. Esta indução enzimática parece provocar a bioactivação directa da carcinogénese ou a destruição do ácido retinóico, com a bioactivação do processo de carcinogénese no pulmão (Russel, 2002).

A dose de  $\beta$ -caroteno pode ser a chave para explicar os efeitos carcinogénicos evidenciados por este composto. Tudo indica que o processo de carcinogénese está favorecido quando se utilizam doses e/ou concentrações de  $\beta$ -caroteno elevadas (pró-oxidante), não se verificando o mesmo quando se utilizam doses e/ou concentrações mais reduzidas de  $\beta$ -caroteno.

A discrepância entre os resultados epidemiológicos e clínicos pode ser consequência da localização dos tumores e da utilização de diferentes populações com estilos de vida diferentes.

TABELA 3 – Estudos epidemiológicos sobre a relação entre os carotenóides e o risco de cancro

<b>Autores</b>	<b>População</b>	<b>Carotenóide</b>	<b>Local</b>	<b>NºCasos/Controlo</b>	<b>Risco</b>	<b>Factores de risco</b>
Slattery <i>et al.</i> , 2000	91, 3% brancos, 4,2% negros, 4,4% hispânicos membros do Kaiser Permanent Medical Care Program of Northern California - EUA	$\alpha$ , $\beta$ -caroteno, luteína, licopeno, zeaxantina, $\beta$ -criptoxantina	Cólon	1993/2410	↓ luteína	Idade, tabaco, sexo, actividade física, histórico familiar, calorias ingeridas, local exacto no cólon
Cohen <i>et al.</i> , 2000	Homens brancos e negros Seattle, EUA	Licopeno	Próstata	628/602	↓ licopeno	Idade, raça, historial familiar de cancro da próstata, habilitações literárias, valor de PSA dos 5 anos anteriores, IMC
Lu <i>et al.</i> , 2001	Doentes do Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, EUA	$\alpha$ , $\beta$ -caroteno, luteína, licopeno, zeaxantina, $\beta$ -criptoxantina	Próstata	65/132	↓ luteína, zeaxantina, $\beta$ -criptoxantina	Idade, raça, tabaco, álcool, historial familiar de cancro da próstata, habilitações literárias, calorias ingeridas
Zhang <i>et al.</i> , 1999	Enfermeiras que vivem em 11 estados dos EUA participaram no "Nurses Health Study" - ("follow up" até 1994)	$\alpha$ , $\beta$ -caroteno, luteína, licopeno, zeaxantina, $\beta$ -criptoxantina	Mama	2697 Casos (713 pré-menopausa, 1913 na pós-menopausa)*	↓ $\alpha$ e $\beta$ -caroteno, luteína, zeaxantina (pré- e pós-menopausa)	Álcool, historial familiar, pré-menopausa, pós-menopausa, terapêutica hormonal de substituição
Toniolo <i>et al.</i> , 2001	New York Women's Health Study, EUA	$\alpha$ , $\beta$ -caroteno, luteína, licopeno, zeaxantina, $\beta$ -criptoxantina	mama	270/270	↓ luteína, $\beta$ -criptoxantina, $\alpha$ e $\beta$ -caroteno	Historial familiar, idade da 1ª gravidez, menstuação e menarca
Tamimi <i>et al.</i> , 2005	A mesma população utilizada por Zang <i>et al.</i> , 1999, mas com "follow up" até 1998	$\alpha$ , $\beta$ -caroteno, luteína, licopeno, zeaxantina, $\beta$ -criptoxantina	Mama	960/960	↓ $\alpha$ -caroteno	IMC, peso, historial familiar, álcool
Michaud <i>et al.</i> , 2000	Mulheres (Nurses Health Study) e homens (Health Professionals Follow-Up Study), EUA	$\alpha$ , $\beta$ -caroteno, luteína, licopeno, $\beta$ -criptoxantina	Pulmão	274 Casos – mulheres* 519 Casos – homens*	↓ $\alpha$ -caroteno e licopeno (não fumadores)	Idade, estado civil, historial médico, peso, tabaco, medicamentos, actividade física

\* - Não existiram controlos

TABELA 4 – Estudos clínicos sobre a relação entre os carotenóides e o risco de cancro

Autores	População	Carotenóide	Local	NºCasos	Risco	Factores de risco
Baron <i>et al.</i> , 2003	6 Centros clínicos nos EUA: Dartmouth-Hitchcock Medical Center; Cleveland Clinic; University of Califórnia; University of Iowa School of Medicine; University of Minnesota School of Public Health (duplamente cego e controlado por placebo)	$\beta$ -caroteno	Cólon	707 (554 homens e 153 mulheres)	↓ não fumadores e não álcool ↑ nos fumadores e nos que ingerem álcool	Álcool e tabaco
Beta Carotene Cancer Prevention Study Group The Alpha Tocopherol, 1994	Homens fumadores (duplamente cego e controlado por placebo)	$\beta$ -caroteno	Pulmão	876	↑ do risco de cancro e da mortalidade	Hábitos alimentares, tabaco, historial médico, informação sobre outros factores de risco de cancro
Omenn <i>et al.</i> , 1996	Homens e mulheres ex e actuais fumadores; trabalhadores expostos a asbestos	$\beta$ -caroteno	Pulmão	388	↑ do risco de cancro e da mortalidade nos fumadores e trabalhadores expostos a asbestos	Idade, sexo, grupo étnico, tabaco e nº de cigarros

## 2.2 Propriedades físico-químicas

Os carotenóides exibem propriedades químicas e físicas muito particulares, devido essencialmente ao peculiar sistema de ligações duplas conjugadas, localizado na parte central das moléculas. Este sistema é o responsável, por exemplo, pela coloração atractiva exibida pelos carotenóides. O grupo cromóforo permite a obtenção de um espectro de absorção na região do UV/Vis característico dos carotenóides, sendo muito útil no processo de identificação e quantificação dos referidos compostos (Rodríguez-Amaya, 1999; Minguez-Mosquera *et al.*, 2002a).

Os espectros dos carotenóides caracterizam-se pela posição relativa dos máximos de absorvência,  $\lambda$  máx, geralmente três, e pela estrutura espectral definida como a razão percentual da altura dos picos (%III/II), sendo: III – altura do pico correspondente à banda de absorção do comprimento de onda superior; II – altura do pico correspondente à banda de absorção do comprimento de onda médio. Estes dois parâmetros fornecem informação acerca do grupo crómoforo da molécula.

A isomerização geométrica é uma propriedade característica dos carotenóides devido ao elevado número de ligações duplas. Quanto mais insaturado, maior é a sua predisposição para a ocorrência de isomerização e oxidação. O calor, a radiação e os ácidos promovem a isomerização dos carotenóides *trans* (forma predominante na natureza) para a configuração *cis*. A presença de uma ligação dupla *cis* cria um maior impedimento estérico na proximidade dos átomos de hidrogénio e/ou dos grupos metilo, o que faz com que os isómeros *cis* sejam termodinamicamente menos estáveis que os *trans*. A isomerização para a configuração *cis* pode originar perda de coloração, bem como de actividade pró-vitamina A (Rodríguez-Amaya, 1999; Minguez-Mosquera *et al.*, 2002a).

Os carotenóides são geralmente moléculas lipofílicas, excepto quando exibem na sua estrutura grupos polares. Os carotenos são solúveis em solventes não polares, como *n*-hexano, éter petróleo e tolueno, enquanto que as xantofilas são solúveis em solventes mais polares, caso do etanol e metanol.

Os isómeros *cis* são, normalmente, mais polares que os isómeros *trans* correspondentes e menos susceptíveis à cristalização, devido às suas formas enroladas. A degradação oxidativa é induzida por acção da luz, de metais e de oxigénio, constituindo uma das principais causas de perda de carotenóides. Contudo, apresentam diferentes susceptibilidades à oxidação: o  $\xi$ -caroteno, a luteína e a violaxantina estão descritos

como os mais facilmente oxidáveis. A formação de epóxidos e apocarotenóides (carotenóides com cadeia carbonada curta) consiste no primeiro passo da oxidação (Rodríguez-Amaya, 1999; Minguez-Mosquera *et al.*, 2002a).

### 2.3 Análise química dos carotenóides

A diversidade estrutural dos carotenóides (mais de 600 compostos identificados na natureza) e o facto de se encontrarem em diferentes formas isoméricas (*cis* e *trans*) condiciona a bioquímica destes compostos. Simultaneamente, a composição das diversas matrizes é influenciada por toda essa diversidade estrutural sendo da maior importância o seu conhecimento. Podem conter carotenóides polares e apolares, daí que seja fundamental utilizar a metodologia analítica mais adequada à determinação e quantificação dos referidos compostos.

A análise dos carotenóides de frutos é mais complexa do que em plantas verdes, pois o número de compostos presente é superior e não existe uma composição típica. Durante o amadurecimento do fruto ocorrem 3 processos: desaparecimento de clorofilas, biossíntese massiva de carotenóides e esterificação de xantofilas com ácidos gordos (Rodríguez-Amaya, 1999; Feltl *et al.*, 2005).

As etapas envolvidas na análise de carotenóides são usualmente as seguintes:

- ✓ Amostragem e preparação da amostra
- ✓ Extração
- ✓ Eliminação da matéria gorda
- ✓ Lavagem
- ✓ Separação cromatográfica e detecção
- ✓ Identificação e quantificação dos carotenóides

### 2.3.1 Amostragem e preparação da amostra

A amostra deve ser obtida a partir de alimentos frescos e não deteriorados, uma vez que podem ocorrer reacções não desejadas catalisadas por enzimas. A amostra deverá ser representativa do lote do produto a que se refere.

A escolha do método de homogeneização depende do tipo, da forma, do tamanho e da estabilidade da amostra.

A homogeneização do tecido deve ser efectuada de preferência no período que antecede a análise, pois durante a preparação pode ocorrer introdução de ar e destruição das paredes celulares. A desintegração mecânica liberta enzimas (lipoxigenase) e ácidos, que degradam os carotenóides.

A composição em carotenóides nos alimentos está condicionada pela presença de diversos factores: variedades ou cultivares, parte da planta analisada, estado de maturação, localização geográfica ou climática da produção, colheita e manuseamento do alimento. Todos estes factores dificultam a obtenção de uma amostragem representativa e a preparação da amostra (Rodriguez-Amaya, 1999; Minguez-Mosquera *et al.*, 2002a).

### 2.3.2 Extracção

A extracção tem como objectivo a libertação de todos os carotenóides presentes na matriz alimentar, sem lhes provocar alterações.

A escolha do solvente adequado à extracção depende da amostra, do seu pré-tratamento, da sua composição em carotenóides e se o objectivo é a extracção parcial ou total. Os solventes miscíveis com água, como a acetona, são normalmente utilizados nos alimentos frescos. Os carotenóides presentes em alimentos secos e liofilizados são extraídos com solventes imiscíveis em água, como o acetonitrilo ou os alimentos são rehidratados previamente, tornando a extracção mais eficiente. Em qualquer dos casos os solventes devem possuir baixos pontos de ebulição, uma vez que terão que ser eliminados após o processo de extracção.

Para prevenir perdas de carotenóides durante o processo é necessário adicionar antioxidantes (pirogalhol, palmitato de ascorbilo ou butil-hidroxi-tolueno (BHT)), bem como um agente neutralizante (carbonato de magnésio, carbonato de cálcio) para eliminar

os vestígios de ácidos orgânicos que poderão existir em algumas amostras (Rodríguez-Amaya, 1999; Mínguez-Mosquera *et al.*, 2002a).

Existem vários métodos de extracção que podem ser utilizados na análise dos carotenóides: extracção em fase líquida, em fase sólida (SPE) ou em fluido supercrítico (SFE).

A extracção em fase líquida proporciona uma boa recuperação dos carotenóides em diversas amostras, contudo a utilização de grandes quantidade de solventes orgânicos constitui um potencial risco para a saúde e para o ambiente, estando cada vez mais em desuso.

A extracção em fase sólida (SPE) é um método que utiliza absorventes sólidos para extrair os carotenóides a partir de matrizes líquidas. É rápido e simples comparativamente com a extracção em fase líquida, podendo em alguns casos ser até mais económico. No entanto, devido à falta de selectividade e à facilidade de saturação, este método só deverá ser utilizado para a purificação ou pré-concentração da amostra.

Por sua vez, a extracção com fluido supercrítico (SFE) utiliza o dióxido de carbono para extrair os compostos. É um método rápido e simples, facilmente automatizado, que não requer evaporação. A principal vantagem da SFE é a possibilidade de obter os carotenóides a partir de materiais naturais, na ausência de solventes orgânicos, e com o mínimo de alterações provocadas pela oxidação térmica. Contudo existe um certo risco de perda de carotenóides devido ao oxigénio que o dióxido de carbono contém (Su *et al.*, 2002; Tsao *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005).

### 2.3.3 Eliminação da matéria gorda

Os carotenóides presentes nos vegetais e frutos encontram-se predominantemente esterificados com ácidos gordos. O grau de esterificação pode diferir em função do número de grupos hidroxilo presentes nas xantofilas. Os carotenóides mono-hidroxilados, como a  $\beta$ -criptoxantina, podem estar no estado livre ou esterificados com um ácido gordo; os di-hidroxicarotenóides como a luteína e a zeaxantina, podem apresentar-se no estado livre ou esterificados com dois ácidos gordos (Rodríguez-Amaya, 1999; Oliver *et al.*, 2000).

A matéria gorda que persiste, após o processo de extracção deve ser removida. Existem disponíveis duas técnicas: distribuição por fases e saponificação.

A distribuição por fases é útil quando se analisam clorofilas e carotenóides sensíveis a agentes alcalinizantes (luteína, violaxantina e outros di-hidroxi, tri-hidroxi e epoxicarotenóides). Os solventes utilizados na extracção e distribuição são o *n*-hexano e a *n,n*-dimetilformamida (DMF). A fase do *n*-hexano retém os carotenos e a gordura, enquanto que a DMF retém as xantofilas e as clorofilas.

A saponificação é utilizada para a remoção de lípidos e clorofilas que podem interferir na separação cromatográfica, sendo ainda importante na purificação do extracto. Este procedimento consiste na adição de um agente alcalino ao extracto que contém os carotenóides, usualmente o hidróxido de potássio a 10%, numa atmosfera de azoto ou árgon, durante a noite à temperatura ambiente.

Os carotenóides com actividade pró-vitamina A ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina) resistem à saponificação. Por sua vez, quando os apocarotenóides estão presentes na amostra, todos os vestígios de acetona devem ser eliminados antes da saponificação, de modo a evitar a condensação aldólica entre os apocarotenóides e aquele solvente orgânico (Rodriguez-Amaya, 1999; Minguez-Mosquera *et al.*, 2002).

#### 2.3.4 Lavagem

Esta etapa elimina o agente alcalino utilizado na saponificação, realizando-se diversas extracções com éter etílico, *n*-hexano ou mistura dos dois solventes (Rodriguez-Amaya, 1999).

#### 2.3.5 Separação cromatográfica e detecção

Conforme referido, os carotenóides encontram-se na natureza principalmente na forma *trans* (forma mais estável), embora alguns possam existir na forma *cis*. Dado que os isómeros *cis* e *trans* apresentam potencialidades biológicas diferentes, há necessidade de se proceder à separação e quantificação destes dois tipos de isómeros.

Os métodos cromatográficos são eficazes para separar e purificar os carotenóides, embora a cromatografia gasosa seja inapropriada devido à labilidade térmica e baixa volatilidade dos referidos compostos.

A cromatografia em camada fina (TLC) e a cromatografia em coluna foram e continuam a ser utilizadas como métodos de separação de carotenóides, devido ao baixo custo, e à separação e detecção simultânea de várias amostras. No caso da TLC, a utilização de múltiplas fases móveis é útil para a uma boa separação dos carotenóides, a partir de extractos complexos.

A TLC embora seja eficiente na monitorização da progressão dos testes químicos de identificação, não é adequada para a análise quantitativa devido ao perigo de degradação e isomerização dos carotenóides. Já a cromatografia em coluna é o método cromatográfico clássico de separação de carotenóides em análise quantitativa. A principal vantagem da cromatografia em coluna consiste na utilização de uma coluna simples e não dispendiosa. Contudo, a reprodutibilidade e a eficiência de separação de carotenóides depende da capacidade, paciência e experiência do analista, particularmente no que respeita ao empacotamento da coluna e ajustamento do seu volume, e proporções dos solventes que irão ser eluídos, bem como da acuidade do analista para detectar a separação (Oliver *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2002; Quirós *et al.*, 2006).

A possibilidade de degradação dos carotenóides varia com as diferentes fases estacionárias e aumenta com o prolongamento do processo cromatográfico, por exemplo se for necessária nova separação cromatográfica de fracções impuras.

O método de HPLC tem sido utilizado na separação de carotenóides desde o seu aparecimento na década de 70. Desde então têm ocorrido avanços tanto na própria técnica como no desenvolvimento de métodos cromatográficos para a separação e detecção de carotenóides.

Este processo apresenta melhor reprodutibilidade na separação, comparativamente aos anteriores, uma vez que a coluna é reutilizável sob condições controladas, sem expôr a amostra ao ar e à luz.

Em HPLC de fase normal recorre-se a colunas de gel de sílica e óxido de alumínio que separam os carotenóides de acordo com a sua polaridade; os compostos com substituintes mais polares são adsorvidos fortemente. Por isso, o  $\beta$ -caroteno é o primeiro a ser eluído, seguido dos mono, di e poli-hidroxicarotenóides. Contudo, apresenta determinadas desvantagens, nomeadamente uma reduzida estabilidade na coluna, uma

reprodutibilidade deficiente no que se refere ao tempo de retenção e necessidade de um período de tempo maior para a estabilização da coluna no caso de se utilizar gradiente.

O sistema em fase reversa com colunas do tipo C18 é o método de separação cromatográfica preferido no que concerne aos carotenóides, uma vez que estas colunas possuem fracas interações hidrofóbicas com os analitos, sendo compatíveis com a maioria dos solventes e com a polaridade dos carotenóides (Oliver *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2002; Quirós *et al.*, 2006).

No que respeita à fase móvel, a escolha baseia-se nas seguintes propriedades: polaridade, viscosidade, volatilidade, toxicidade e inércia, em relação aos carotenóides. A utilização de HPLC de fase reversa não aquosa, para a separação de misturas complexas de carotenóides, minimiza o risco de precipitação da amostra na coluna, aumenta a solubilidade da amostra e o prolongamento do tempo de vida da coluna, além de apresentar uma excelente eficácia cromatográfica. Têm sido sugeridos diversos sistemas de solventes, mas o principal é constituído por acetonitrilo e metanol, sendo os restantes sistemas constituídos por pequenas modificações. A utilização de acetonitrilo baseia-se na sua reduzida viscosidade e melhor selectividade para as xantofilas quando se recorre a uma coluna C18. No entanto, são adicionadas pequenas porções de outros solventes como o clorofórmio e diclorometano (compostos que obedecem às propriedades mencionadas anteriormente, mas que podem conter vestígios de ácido clorídrico), com o intuito de melhorar os tempos de retenção e aumentar a solubilidade e a resolução, e de acetato de amónio para aumentar a recuperação de carotenóides da coluna.

Deverão adicionar-se agentes antioxidantes como o BHT à fase móvel, no sentido de prevenir a decomposição dos carotenóides da amostra durante a análise cromatográfica e aumentar a reprodutibilidade da mesma.

A eluição pode ser isocrática ou em gradiente. A primeira é mais rápida, requer equipamentos simples (com uma bomba de pressão e solventes pré-misturados) e produz resultados reprodutíveis. É normalmente utilizada na determinação dos carotenóides com acção pró-vitamina A ou nos principais carotenóides presentes nos alimentos.

A eluição em gradiente permite obter um maior poder de resolução, aumentando a sensibilidade e a eluição de compostos fortemente retidos. É utilizada quando a análise não permite a eluição isocrática. Contudo este tipo de eluição apresenta desvantagens, uma vez que aumenta a complexidade da análise, requer equipamento dispendioso e sofisticado e estabilização da coluna entre determinações; verificam-se diferenças nas respostas do detector (por exemplo, diferentes sinais para a mesma concentração de

diferentes compostos) e uma reprodutibilidade mais baixa (Rodríguez-Amaya, 1999; Quirós *et al.*, 2006).

A temperatura é um factor importante que influencia a separação cromatográfica. Deve ser controlada para manter a reprodutibilidade ao longo do dia e no quotidiano da análise, uma vez que variações de temperatura conduzem a flutuações substanciais nos tempos de retenção. A temperatura interfere ainda com a selectividade. Por exemplo, com uma coluna C18 e a fase móvel, acetonitrilo-diclorometano-metanol (70:20:10), à temperatura de 30°C, não ocorre separação da luteína, da zeaxantina e do 9-*cis* e *trans*- $\beta$ -caroteno. Contudo utilizando a mesma coluna e fase móvel mas à temperatura de -13°C é possível obter-se a separação dos 4 compostos.

A dificuldade e necessidade de separação dos isómeros *cis* e *trans* conduziram ao desenvolvimento da coluna polimérica C30. Trata-se de uma coluna cuja retenção é muito elevada, aumentando a possibilidade de reconhecimento dos isómeros. Demonstrou uma excelente resolução em padrões de foto-isomerização da luteína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e licopeno.

Embora o HPLC seja o método preferencialmente utilizado na separação dos carotenóides, este está sujeito a diversos tipos de erros tais como: incompatibilidade do solvente injectado com a fase móvel, identificação equívoca, impureza e instabilidade dos padrões de carotenóides, quantificação de picos co-eluídos e baixa recuperação da coluna (Rodríguez-Amaya, 1999; Oliver *et al.*, 2000; Quirós *et al.*, 2006).

A electrocromatografia capilar é uma técnica de separação de fase líquida, que se baseia na electroforese capilar e HPLC, em que utiliza um campo eléctrico em vez de pressão hidráulica para que a fase móvel atravesse a fase estacionária. A fase estacionária é similar à utilizada em HPLC. Parece tratar-se de um método promissor para a separação de carotenóides (Tsao *et al.*, 2004).

Os isómeros *trans* dos carotenóides absorvem na região do visível (400 – 500 nm), enquanto que os *cis* podem exibir absorção na região próxima do visível, por volta dos 320 nm. Esta característica permite a utilização da detecção fotométrica UV/Vis na identificação e quantificação dos carotenóides, sendo este considerado o método de detecção de eleição, uma vez que os detectores são simples e económicos e esta detecção é compatível com a eluição em gradiente. A detecção por díodos oferece vantagens

adicionais ao permitir a identificação do analito, uma vez que determina o espectro do composto e fornece informações sobre a identificação e pureza do pico (Su *et al.*, 2002; Tsao *et al.*, 2004).

A electroactividade (capacidade de oxidação/redução) dos carotenóides permite também a utilização de detectores electroquímicos quando se efectua a determinação dos níveis plasmáticos dos referidos compostos.

Os carotenóides são compostos que apresentam fluorescência reduzida, como tal pode ser utilizado um detector espectrométrico com lente térmica (TLS) na sua análise. O TLS mede a absorvência indirectamente através dos efeitos da lente térmica. As maiores vantagens deste método residem na utilização de um pequeno volume de amostra e os efeitos de uma supressão de uma possível incompatibilidade entre o solvente utilizado na extracção e na fase móvel (Tsao *et al.*, 2004).

A espectrometria de massa aplica-se sobretudo quando os carotenóides se encontram em quantidades vestigiais e misturados com outros compostos interferentes. Este método permite não só a quantificação do analito como também elucida sobre a sua estrutura com base na sua massa molecular e padrão de fragmentação.

A análise por ressonância magnética nuclear revela não só a estrutura, mas também a geometria das duplas ligações. A ressonância magnética é o melhor método para a identificação de estereoisómeros desconhecidos (Rodriguez-Amaya, 1999; Mínguez-Mosquera *et al.*, 2002a).

### **2.3.6 Identificação e quantificação**

O comportamento cromatográfico e o espectro de absorção na zona UV/Vis são ferramentas importantes no processo de identificação dos carotenóides. A posição do máximo de absorção e a forma do pico reflectem a estrutura do grupo cromóforo, como já referido. A identificação não pode basear-se somente nos tempos de retenção obtidos na separação cromatográfica e nos espectros de absorção, pois carotenóides diferentes podem exibir igual tempo de retenção.

Daí que tenham sido estabelecidos critérios aos quais o processo de identificação deve obedecer:

1. o espectro de absorção da região do UV/ Vis deve ser correspondente em pelo menos dois solventes diferentes. Ambos os espectros devem indicar a presença do mesmo grupo crómoforo.
2. as propriedades cromatográficas (tempos de retenção) devem ser idênticas em dois sistemas diferentes.
3. o espectro de massa deve permitir a confirmação através da massa molecular do composto.

O sistema característico de ligações duplas conjugadas presente na molécula dos carotenóides, com electrões  $\pi$  deslocalizados ao longo da cadeia poliénica, é responsável pela forma comprimida e estreita da molécula, pela reactividade química e pela cor que exhibe, devido à capacidade de absorção da radiação no intervalo do UV e Visível. Esta característica tem sido utilizada para a quantificação por espectrofotometria de UV/Vis, dos carotenóides em solução, aplicando-se a lei de Lambert-Beer (Rodriguez-Amaya, 1999; Minguez-Mosquera *et al.*, 2002a):

$$A = \epsilon_{1cm}^{1\%} \times L \times C$$

Sendo,

A – Absorvência

$\epsilon_{1cm}^{1\%}$  – Coeficiente de absorção específico percentual num determinado solvente

L – Comprimento da célula espectrofotométrica (cm)

C – Concentração (g/100ml)

A quantificação de carotenóides, por cromatografia em coluna, é usualmente feita por medição espectrofotométrica nas várias fracções recolhidas, utilizando coeficientes de absorção tabelados.

A quantificação em HPLC utiliza métodos de calibração com padrão externo ou interno, sendo as concentrações dos padrões determinadas espectrofotometricamente, tal como na cromatografia em coluna. A detecção por detector de díodos, após separação por

HPLC, permite a aquisição dos espectros que podem ser armazenados e comparados com os padrões.

A exactidão dos resultados analíticos depende em parte das concentrações exactas das soluções padrão. Nem todos os carotenóides dispõem de padrões comercializados. Para além disso, os erros na preparação das soluções padrão e/ou na determinação das concentrações efectivas podem afectar a confiança dos resultados. A instabilidade dos padrões de carotenóides é um problema sério adicional. Os cristais de carotenóides devem ser selados em ampolas sob atmosfera de azoto ou árgon e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou preferencialmente a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Rodríguez-Amaya, 1999).

### 2.3.7 Problemas na análise de carotenóides em alimentos

A determinação individual dos carotenóides torna-se difícil devido a vários factores:

- os carotenóides presentes na natureza são mais de 600, incluindo os presentes nos fungos, algas e bactérias. Contudo, nos alimentos estão em menor número;
- a composição dos carotenóides presentes nos alimentos varia quantitativa e qualitativamente, pelo que o procedimento analítico deve ser adaptado à composição em carotenóides de cada tipo de alimento e à sua natureza;
- a concentração dos carotenóides em cada alimento varia. Normalmente apresentam 1 a 4 carotenóides em maior quantidade, que se designam de carotenóides principais e os restantes encontram-se em quantidades vestigiais;
- a elevada insaturação das moléculas de carotenóides torna-os susceptíveis a reacções de oxidação e isomerização (Rodríguez-Amaya, 1999; Minguez-Mosquera *et al.*, 2002a).

O principal problema na análise dos carotenóides reside na sua instabilidade. Como tal, devem tomar-se as medidas necessárias para minimizar a formação de artefactos e a perda de compostos. Estas medidas incluem a redução do tempo de análise, a exclusão do oxigénio, a protecção da luz, a utilização de temperaturas baixas e evitar o contacto com substâncias ácidas (Rodríguez-Amaya, 1999).

A atmosfera deve ser isenta de oxigénio, uma vez que este, em associação com a luz e o calor, é extremamente destrutivo e origina branqueamento e formação de artefactos, caso dos epoxicarotenóides e apocarotenóides. As amostras deverão ser submetidas a uma corrente de azoto ou árgon e armazenadas no escuro, a temperaturas de -20°C.

A exposição à radiação solar ou à radiação UV induz foto-isomerização *trans-cis* e fotodestruição dos carotenóides. Por tal facto, a luz do dia deve ser excluída de todos os procedimentos. Estes deverão decorrer sob luz artificial ou luz solar difusa, bem como todo o equipamento desde colunas cromatográficas, câmaras de cromatografia até ao rotavapor deverá ser envolto em folha de alumínio.

Temperaturas elevadas favorecem a ocorrência de reacções não desejáveis como a isomerização *trans/cis*, daí que os procedimentos devam decorrer a temperaturas baixas.

As extracções deverão decorrer à temperatura ambiente ou mais baixa e os solventes utilizados terão de apresentar baixos pontos de ebulição. A concentração dos carotenóides deverá efectuar-se em rotavapor com temperatura inferiores a 40°C e a pressão reduzida. Deverá ter-se em consideração que a secura conduz à degradação dos carotenóides.

Os carotenóides podem sofrer reacções de decomposição, desidratação ou isomerização na presença de ácidos, originando 5,6-epoxicarotenóides como a violaxantina e neoxantina. A maioria dos carotenóides são estáveis em ambiente alcalino, por isso, durante o processo de extracção deve proceder-se à neutralização dos ácidos presentes no alimento (Rodriguez-Amaya, 1999; Minguez-Mosquera *et al.*, 2002a).

## 2.4 Carotenóides nos azeites

A cor é o principal factor que contribui para aceitação de um produto por parte do consumidor e o azeite não é excepção. A sua cor amarelo esverdeada é devida à presença de vários pigmentos, principalmente clorofilas, feofitinas e carotenóides.

Os carotenóides, devido às suas actividades biológicas, em particular à acção antioxidante e às acções benéficas para a saúde que têm vindo a ser demonstradas em diversos estudos, tornaram-se objecto de estudo no azeite, sobretudo no azeite virgem, onde o seu teor é superior. Os carotenóides maioritários nesta matriz são o  $\beta$ -caroteno e a luteína.

### 2.4.1 Metodologias analíticas

As técnicas de extracção clássicas como a extracção líquido-líquido e a SPE, seguidas de técnicas de separação como a cromatografia em camada fina, HPLC de fase reversa, com recurso a colorímetros e detectores de díodos são as adoptadas na determinação de carotenóides no azeite.

No que respeita à técnica de extracção mais adequada existem resultados contraditórios quanto à sua eficiência. Minguez-Mosquera e seus colaboradores referem, em 1992, a SPE como uma técnica mais vantajosa e eficiente que a extracção líquido-líquido. Pelo contrário Cichelli e seus colaboradores, em 2004, revelam que no azeite a extracção por SPE é menos eficaz que a líquido-líquido, pois apresenta uma menor repetibilidade. O grupo de trabalho de Minguez-Mosquera volta a utilizar, em 2000, a extracção líquido-líquido, não tendo, no entanto, justificado a opção.

Segundo Criado e seus colaboradores, em 2007, a fase *n*-hexano que retém o  $\beta$ -caroteno e a gordura poderia ser submetida a um processo de saponificação. Esta seria efectuada com uma solução de hidróxido de potássio numa concentração de 15,6% (concentração superior à anteriormente mencionada no item eliminação da matéria gorda, 10%), no sentido de hidrolisar os lípidos e purificar o mais possível o  $\beta$ -caroteno. Deste modo, a determinação do  $\beta$ -caroteno poderia ser efectuada por HPLC de fase reversa, tal como sucede com a luteína, método mais eficiente na identificação e quantificação que a espectrofotometria por UV/Vis.

A Tabela 5 resume as metodologias referenciadas na literatura para a determinação de carotenóides no azeite.

## 2.4.2 Teores de $\beta$ -caroteno e luteína

Os teores de  $\beta$ -caroteno e luteína são variáveis de acordo com as cultivares de oliveira, regiões geográficas e países.

Em Espanha, Minguez-Mosquera *et al.* (1992) efectuaram determinações de carotenóides em azeites monovarietais pertencentes a 4 cultivares: Picual, Picudo e Pajarero, oriundas da província de Jaen, e Hojiblanca, oriunda da província de Sevilha. As duas províncias pertencem à comunidade autónoma da Andaluzia. Os azeites revelaram teores médios de  $\beta$ -caroteno de cerca de 2 mg/kg nas cultivares Picual, Picudo e Hojiblanca, enquanto que a cultivar Pajadero revelou cerca de metade destes teores. Para a luteína ocorreu uma maior dispersão de resultados, mas verificaram-se teores mais elevados nas mesmas 3 cultivares (entre 6 e 9 mg/kg), tendo a Pajadero apresentado apenas 2mg/kg.

Gandul-Rojas *et al.* (2000) realizaram um estudo com 50 azeites virgem monovarietais obtidos de 6 cultivares (Arbequina, Blanqueta, Cornicabra, Hojiblanca, Picual e Lechin) referentes a diversas províncias de Espanha. As 9 amostras de Arbequina, as 8 de Picual e as 2 de Lechin eram provenientes de Jaen e as 11 amostras de Hojiblanca eram oriundas de Sevilha, mais uma vez províncias que pertencem à comunidade da Andaluzia. Por sua vez, as 11 amostras de Blanqueta eram provenientes de Alicante, que pertence à comunidade autónoma de Valência e as 7 amostras de Cornicabra eram oriundas de Toledo, pertencente à comunidade de Castela La Mancha. Os teores de luteína encontrados variaram entre 1mg/kg e 12 mg/kg, não sendo revelados os do  $\beta$ -caroteno.

Em Itália, Ranalli e seus colaboradores efectuaram estudos em 1992, 2001 e 2005 utilizando azeites monovarietais de 3 cultivares. Duas dessas cultivares foram utilizadas nos três estudos: Leccino (Toscana – Itália central) e Dritta (Abruzzo – Itália meridional). A terceira cultivar analisada variou consoante o ano do estudo, em 1992 foi a Caroleo e em 2001 a Cassanese, ambas pertencentes à região da Calábria, que se situa na Itália meridional. Em 2005, utilizaram a Coratina que também teve origem na Itália meridional, mas na região de Puglia. Os teores de  $\beta$ -caroteno encontrados variaram entre 0,76 e 1,00 mg/kg e os de luteína entre os 2,60 e 2,88 mg/kg.

Em 2000, Ranalli e os seus colaboradores realizaram um estudo em azeite obtido de uma nova cultivar (recentemente descoberta) que tinha sido cultivada em 3 províncias italianas diferentes: Perugia (Umbria - Itália Central), Campobasso (Molise - Itália meridional) e Lecce (Puglia - Itália meridional). Os teores de  $\beta$ -caroteno e de luteína apresentaram algumas variações: 0,80, 0,72 e 0,65 mg/kg de  $\beta$ -caroteno em Perugia, Campobasso e Lecce, respectivamente, enquanto que os de luteína foram de 3,22, 2,87 e 2,73 mg/kg nas mesmas províncias.

Cichelli *et al.* (2004) publicaram teores de luteína mais elevados que Ranalli tendo utilizado uma maior diversidade de azeites - 56 azeites monovarietais de regiões geográficas diferentes provenientes de 12 variedades: Tortiglione, Dritta e Gentile (Abruzzo - Itália meridional); Picholine, Peranzana e Coratina (Puglia - Itália Meridional); Leccino, Frantoio e Ogliarola (Toscana - Itália Central); Bianchera, Buga e Carbona (Friul Veneza Júlia - Itália Nordestina). Os teores reportados variaram de 3,96 a 14,78 mg/kg. Os teores de  $\beta$ -caroteno não foram, contudo, mencionados.

Por sua vez, Giuffrida *et al.* (2007) analisaram azeites virgens monovarietais da região da Sicília pertencentes a 3 cultivares: Cerasuolla, Nocellara e Biancolilla. Utilizaram uma maior quantidade de amostra - 25g em vez dos 15g propostos por Minguez-Mosquera *et al.* em 1992. Os teores de  $\beta$ -caroteno obtidos foram: 16,27 mg/kg - Cerasuolla; 25,04 mg/kg - Nocellara; 19,36 mg/kg - Biancolilla, enquanto os teores de luteína: 4,49 mg/kg - Cerasuolla; 3,28 mg/kg - Nocellara e 2,28 mg/kg - Biancolilla.

Na Grécia, Psomidou e sua colaboradora (2001) analisaram 52 azeites virgem monovarietais pertencentes a 8 cultivares de regiões diferentes e 25 azeites virgem-extra comercializados. As cultivares utilizadas foram: Amifissis (Magnésia - Tessália), Athinolia (Peloponeso), Chondrolia (Calcidia - Macedónia Central), Kolovi (Lesbos - Ilha do Egeu setentrional), Koroneiki (Creta e sul de Peloponeso), Lianolia (Lefkada - Ilha Jónica), Manaki (Peloponeso Central e Nordeste) e Throumbolia (Samos - Ilha do Egeu Setentrional). Os teores de  $\beta$ -caroteno encontrados nos azeites virgem monovarietais variaram entre 0,6 mg/kg e 5,1 mg/kg e os da luteína variaram entre 0,2 e 3,9 mg/kg. Por sua vez, os teores apresentados pelos azeites virgem-extra comercializados para o  $\beta$ -caroteno foram de 0,5 a 3,4 mg/kg e para a luteína de 0,5 a 1,6 mg/kg.

TABELA 5 – Metodologias adoptadas na determinação de carotenóides no azeite

<b>Autores</b>	<b>Extracção</b>	<b>Separação</b>	<b>Deteção</b>
Minguez-Mosquera <i>et al.</i> , 1990	Extracção líquido-líquido	TLC	Luz branca e UV
Minguez-Mosquera <i>et al.</i> , 1992; 2000	Extracção líquido-líquido SPE	HPLC – fase reversa	Detector de díodos (xantofilas) Espectrofotómetro UV-Vis ( $\beta$ -caroteno)
Ranalli <i>et al.</i> , 1992; 2000; 2001; 2005	Extracção líquido-líquido	TLC	Espectrofotómetro UV-Vis
Gandul-Rojas <i>et al.</i> , 2000	Extracção líquido-líquido	HPLC – fase reversa	Detector de díodos (xantofilas) Espectrofotómetro UV-Vis ( $\beta$ -caroteno)
Psomiadou <i>et al.</i> , 2001	Sem extracção	HPLC – fase normal	Detector de díodos (xantofilas) Espectrofotómetro UV-Vis ( $\beta$ -caroteno)
Cichelli <i>et al.</i> , 2004	Extracção líquido-líquido SPE	HPLC – fase reversa	Espectrofotómetro UV-Vis
Giuffrida <i>et al.</i> , 2007	Extracção líquido-líquido	HPLC – fase reversa	Detector de díodos (xantofilas) Espectrofotómetro UV-Vis ( $\beta$ -caroteno)
Criado <i>et al.</i> , 2007	Extracção líquido-líquido com saponificação da fase do <i>n</i> -hexano	HPLC – fase reversa	Detector de díodos

---

### 3 OBJECTIVOS

Portugal está englobado nos países da região mediterrânica. As drásticas mudanças nos hábitos alimentares, que se têm vindo a verificar na última década, afastam a população portuguesa cada vez mais dos saudáveis pressupostos da dieta Mediterrânica. Contudo, o azeite continua a fazer parte dos nossos hábitos alimentares, tendo em consideração a enorme variedade de oferta que o mercado apresenta, levando até a pensar no incremento do seu consumo.

Os diversos estudos reportados para análise dos teores de carotenóides maioritários no azeite são já extensos, mas nenhum engloba variedades portuguesas. Para além disso, a diversidade dos valores reportados dentro de cada país parece indicar alguma influência de factores climáticos.

Pelo largo consumo de azeite e pelo comprovado efeito benéfico da ingestão de carotenóides os objectivos deste trabalho consistiram em:

- desenvolver e validar uma metodologia analítica simples, rápida e fiável, em micro-escala, para determinar os carotenóides maioritários do azeite, a luteína e o  $\beta$ -caroteno.
- quantificar a luteína e o  $\beta$ -caroteno em amostras de azeite virgem DOP portuguesas e estrangeiras, no sentido de tentar estabelecer uma relação entre os teores detectados e a origem geográfica.

---

## **PARTE EXPERIMENTAL**

A parte experimental desta dissertação consistiu na determinação dos teores dos carotenóides maioritários presentes no azeite. De seguida irão ser descritos todos os passos para executar e atingir os objectivos propostos.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Amostragem**

Na realização deste trabalho foram analisados azeites virgem-extra comercializados em Portugal, Espanha e Itália, num total de 38 amostras. As amostras portuguesas, num total de 25, pertenciam às cinco regiões de Denominação de Origem Protegida: Beira Interior (Beira Alta e Beira Baixa), Moura, Norte Alentejano, Ribatejo e Trás-os-Montes, conforme detalhado na Tabela 6. As 6 amostras espanholas representavam 4 das 17 regiões de Denominação de Origem Protegida (Tabela 7): Baena, Sierra Mágina, Priego de Córdoba, Sierra Cazorla, todas do sul do país (Figura 3). Por sua vez as amostras italianas (n=7) pertenciam a duas regiões DOP: Chianti Clássico e Toscana (Tabela 8), das 37 existentes em Itália (Figura 4).

Todas as amostras analisadas apresentavam-se nas embalagens originais, em bom estado de conservação e dentro ou próximo do prazo de validade. Apenas o Óleo de Cazorla, de Espanha, estava embalado em lata, estando todos os outros em garrafas de vidro.

As amostras foram armazenadas em local fresco e ao abrigo da luz até ao momento da análise.

TABELA 6 – AZEITES DOP Portugueses

<b>Origem</b>	<b>Nome</b>	<b>Prazo de validade</b>
Beira Interior	Rodão	30-06-2007
	Malpica do Tejo	01-12-2007
Moura	Ficalho	01-12-2008
	Herdade do Esporão	01-10-2008
	Herdade dos Coteis	31-08-2007
	Moura	01-10-2008
	Relíquia da Vidigueira	01-05-2007
Norte Alentejano	Azeites do Norte Alentejano - Continente	30-11-2005
	Lagar do Monte	01-04-2006
Ribatejo	Quinta da Rainha	01-12-2006
	Quinta do Juncal	01-02-2008
Trás os Montes	AZCOA	04-12-2004
	Azeites de Trás-os- Montes-Continente	30-09-2007
	Carm Premium - Carm	01-06-2004
	Casa Aragão	31-05-2006
	Casa Grande	01-06-2006
	Casal da Vilarça	31-12-2004
	Castello d' Alba	01-12-2005
	Ouro do Tua	01-05-2005
	Porca de Murça	01-12-2005
	Quinta das Marvalhas	01-12-2007
	Quinta das Marvalhas – Reserva	01-06-2006
	Quinta do Bispedo	01-12-2006
	Serrata	01-07-2005
Vila Nova	28-02-2007	

TABELA 7 – AZEITES DOP Espanhóis

Comunidade	Região DOP	Nome	Prazo de validade
Andaluzia	Baena	Crismoliva	31-12-2005
	Sierra Mágina	Verde Salud	30-04-2006
	Sierra Mágina	Virgen d'Oro	31-12-2005
	Priego de Córdoba	Mueoliva	17-11-2005
	Priego de Córdoba	Capricho Andaluz	31-12-2006
	Sierra Cazorla	Óleo de Cazorla	01-02-2006



FIGURA 3 – Origem geográfica das amostras espanholas

TABELA 8 – AZEITES DOP – Italianos

Região	Região DOP	Nome	Prazo de validade
Toscana	Chianti Clássico	Ferradini	23-02-2006
	Toscana	Ardoino	24-05-2006
		Caparelli Firenze	31-12-2006
		Calia	18-11-2006
		Rocchi	31-12-2006
		Levacelle	31-05-2005
		Duca di Toscana	05-05-2006



FIGURA 4 – Origem geográfica das amostras italianas

## 4.2 Reagentes

Os reagentes utilizados na preparação das soluções padrão foram: tetrahidrofurano, 2-propanol e *n*-hexano (com grau de pureza para HPLC) fornecidos pela Merck e butil-hidroxi-tolueno (BHT) fornecido pela Sigma-Aldrich. Na extração das amostras foi ainda utilizado éter etílico (p.a., Vaz Pereira), *n*, *n*-dimetilformamida (DMF, p.a, Merck) e sulfato de sódio anidro (p.a., Merck). A água utilizada era duplamente desionizada num aparelho Seraldest LFM 20 da Seral.

Foram preparadas várias soluções para o processo de extração:

- *n*-hexano com 0,01% BHT
- DMF com 0,01 % BHT
- Éter etílico/*n*-hexano (1:1) com 0,01 % BHT
- Solução aquosa de sulfato de sódio a 2% com 0,01% BHT.

O acetonitrilo e acetato de etilo utilizados na separação cromatográfica, com um grau de pureza adequado ao HPLC, foram fornecidos pela Sigma. O eluente A era constituído por uma solução de acetonitrilo: água (9:1, v/v) com 0,01% de BHT. O eluente B era acetato de etilo. Uma vez preparados, os eluentes foram desgaseificados através de um sistema de ultra-sons e vácuo.

A solução de retoma do extracto submetido à separação cromatográfica continha acetonitrilo e acetato de etilo na proporção 1:1 e BHT numa concentração de 0,1% (concentração mais elevada deste agente para evitar oxidações entre injeções consecutivas e no decorrer da separação).

## 4.3 Padrões

A luteína (xantophyll alfalfa, com grau de pureza 90% por HPLC), o  $\beta$ -caroteno ((all-E)- $\beta$ -caroteno), 97% e o  $\beta$ -apo-8'-carotenal (padrão interno 96% UV) foram fornecidos pela Fluka, Espanha.

Foram preparadas soluções mãe dos três padrões, individualmente, tendo para o efeito dissolvido cerca de 1 mg em aproximadamente 10 ml de tetrahidrofurano e completado o volume a 100 ml em balões volumétricos, com uma solução de *n*-hexano e 2-propanol (99:1) e com 0,1% de BHT (Psomiadou *et al.*, 2001).

As concentrações das soluções mãe de luteína e  $\beta$ -caroteno foram determinadas espectrofotometricamente, tendo em conta o coeficiente de absorção específico percentual ( $\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}$ ) em *n*-hexano de cada um deles: 2589, a 445nm, para a luteína (Craft *et al.*, 1992) e 2592, a 454 nm, para o  $\beta$ -caroteno (Minguez-Mosquera *et al.*, 1992). A solução mãe de luteína tinha uma concentração de 8,79  $\mu\text{g/ml}$  e a de  $\beta$ -caroteno a 5,21  $\mu\text{g/ml}$ , no momento da primeira preparação.

Com base nas concentrações obtidas foram preparadas diluições sucessivas dentro dos limites de linearidade à Lei de Beer apresentados pelos compostos. Os padrões de calibração do  $\beta$ -caroteno, num total de 12, foram preparados com concentrações entre 0,02 e 2,23  $\mu\text{g/ml}$ . Para a luteína foram preparadas 8 diluições da solução mãe, que após terem sido submetidas ao processo extractivo, apresentavam no momento da injeção, concentrações entre 1,90 e 57,0  $\mu\text{g/ml}$ . Para efeito de construção das curvas de calibração todos os padrões foram sujeitos ao protocolo extractivo utilizado nas amostras, sempre na presença do padrão interno, numa concentração de 1,7  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.4 Equipamento

As determinações de massa foram efectuadas numa balança analítica Mettler®, modelo Toledo AG204 (Suiça).

Para a extracção foi necessário um vortex Heidolph, modelo Reax 2000 (EUA) e centrifugação a 5000 rpm numa centrífuga Heraeus Sepatech, modelo Labofuge A (Alemanha). No processo de concentração dos extractos utilizou-se uma corrente de azoto numa unidade de evaporação Reacti-Vap (Pierce, USA).

O sistema cromatográfico era da Jasco (Tóquio, Japão), sendo composto por duas bombas de alta pressão PU-980 e um detector de díodos MD-910 com varrimentos entre 195 e 650 nm. As injeções foram feitas manualmente com seringa Hamilton numa válvula Reodhine com um “loop” de 10  $\mu\text{l}$ .

O sistema de aquisição de dados foi o Borwin™ PDA Controller Software (JMBS, França), versão 1.50. Para tratamento dos dados foram utilizados os programas informáticos Microsoft® Excel 2002 (Microsoft Corporation, USA) e Statistica for Windows (Statsoft, Tulsa, OK).

O  $\beta$ -caroteno foi determinado num espectrofotómetro Shimadzu (modelo UV 160A), a 454 nm, em células de quartzo com 1cm.

## 4.5 Protocolo Analítico

A metodologia adoptada para a realização deste trabalho experimental teve como base a descrita por Mínguez-Mosquera *et al.* (1992). Consiste numa extração líquido-líquido, em que os diferentes grupos de carotenóides – carotenos e xantofilas – são separados pelas seguintes fases: DMF que retém clorofilas e xantofilas; e *n*-hexano que retém lípidos e  $\beta$ -caroteno. O  $\beta$ -caroteno é determinado espectrofotometricamente, enquanto as xantofilas são separadas, identificadas e quantificadas cromatograficamente.

No entanto, foi necessário introduzir diversas modificações na metodologia descrita, as quais serão abordadas adiante na descrição da optimização do método.

A metodologia adoptada está esquematizada na Figura 5. Todo o processo de extração decorreu ao abrigo da luz natural, recorrendo-se a uma lâmpada de luz vermelha, e todos os tubos que possuem as diferentes fases extractivas, DMF e *n*-hexano e éter etílico e *n*-hexano (1:1) foram preservados em gelo nos intervalos de tempo entre as diferentes etapas da metodologia. Para além disso, todos os solventes extractores continham BHT.

### 4.5.1 Extração

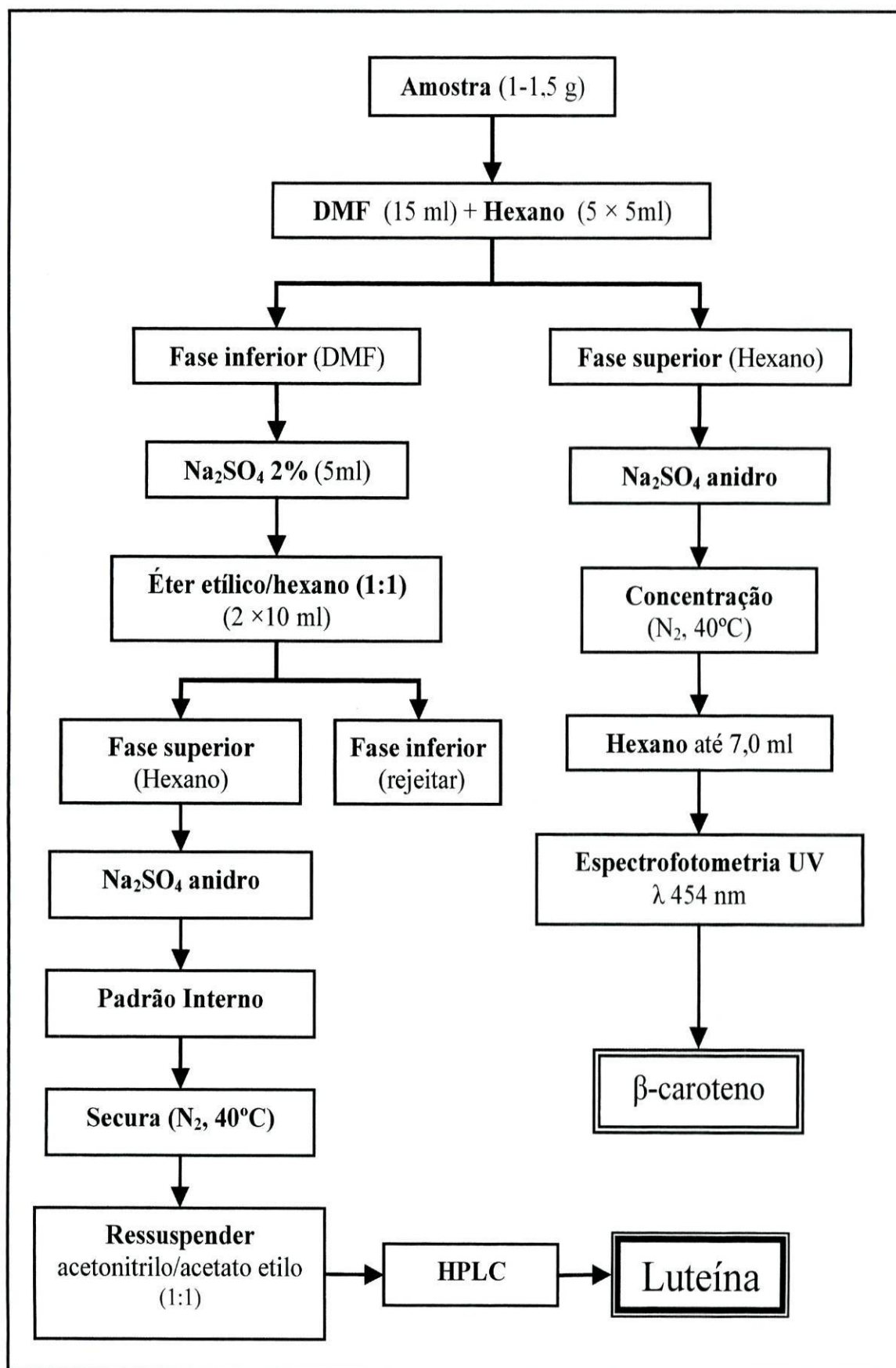
As amostras foram previamente homogeneizadas, utilizando-se cerca de 1-1,5g no processo extractivo, pesados directamente para um frasco de vidro de 30 ml com rolha revestida internamente com septo de PTFE (Supelco). Cada amostra foi analisada em duplicado. A amostra era inicialmente dissolvida em DMF (15 ml) e extraída 5 vezes com 5 ml de *n*-hexano, sempre com agitação em vortex, centrifugação a 5000 rpm durante 5 minutos e recolha da fase superior (*n*-hexano) para um tubo de vidro graduado, onde se juntavam os cerca de 25 ml das 5 extrações. Cada uma das fases, DMF e *n*-hexano, foi tratada separadamente.

Aos 25 ml de *n*-hexano adicionava-se sulfato de sódio anidro, em quantidade

suficiente, e a solução era concentrada até um volume de cerca de 5 ml, em corrente de azoto, à temperatura de 40°C. De seguida diluía-se com *n*-hexano até perfazer 7,0 ml para efectuar a leitura, no espectrofotómetro, da concentração do  $\beta$ -caroteno.

À fase de DMF adicionaram-se 5 ml de solução de sulfato de sódio a 2%, à temperatura de 0°C, e extraiu-se duas vezes com 10 ml da solução de éter etílico e *n*-hexano (1:1). As fases eram misturadas em vórtex e centrifugadas a 5000 rpm, sendo retirada a fase superior (éter etílico e *n*-hexano (1:1)). Aos cerca de 20 ml de fase colectada adicionava-se sulfato de sódio anidro; posteriormente efectuava-se a evaporação dos solventes em corrente de azoto a 40°C até próximo da secura. Ao resíduo líquido eram adicionados 200 $\mu$ l de padrão interno, submetendo-se novamente a evaporação até próximo da secura. O extracto resultante era redissolvido em 200 $\mu$ l de solução acetonitrilo/acetato de etilo (1:1). Os extractos eram armazenados em frascos de vidro âmbar, na arca frigorífica, à temperatura de -18°C, até serem analisados cromatograficamente. Cada amostra era injectada no mínimo 2 vezes.





**FIGURA 5** – Protocolo analítico utilizado para a determinação dos carotenóides maioritários do azeite

## 4.5.2 Separação cromatográfica

A separação cromatográfica utilizou um sistema binário com eluição em gradiente: 0-1 min, 0% B; 1-30 min, 60%B, 30-40 min, 60% B; 40-45 min 0% B, a um fluxo de 1ml/min.

A coluna cromatográfica utilizada foi uma Phenomenex C18, de 25 cm x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 $\mu$ m e diâmetro de poro de 100Å (EUA),

## 4.5.3 Identificação

A identificação dos carotenóides nas amostras foi baseada no espectro dos picos cromatográficos obtidos por detecção de varrimento de díodos entre 195 e 650 nm, por comparação com espectros de padrões obtidos nas mesmas condições (tendo em consideração os máximos de absorvência e a própria estrutura espectral).

Como os tempos de retenção ( $t_r$ ) são difíceis de reproduzir, mesmo em condições cromatográficas controladas, foram calculados factores de capacidade médios ( $k'$ ). Este factor é calculado da seguinte forma:  $(t_r \text{ composto} - t_r \text{ solvente}) / t_r \text{ solvente}$  (Minguez-Mosquera *et al.*, 1992; Rodriguez-Amaya, 1999; Mendes-Pinto *et al.*, 2004).

Para a identificação da luteína,  $\beta$ -caroteno e  $\beta$ -apo-8'-apocarotenal utilizaram-se padrões comercializados, conforme se pode constatar no item 4.3. No entanto, a escassez no mercado de padrões de carotenóides e o seu preço elevado, conduziu a que se recorresse a uma matriz naturalmente rica nestes componentes e bem referenciada na literatura, a alface, para se proceder à identificação de outros compostos presentes no azeite (Kimura *et al.*, 2002).

## 4.5.4 Quantificação

O  $\beta$ -caroteno foi determinado espectrofotometricamente a 454 nm, contra um branco de *n*-hexano pelo método do padrão externo.

A quantificação da luteína foi baseada nos cromatogramas extraídos a  $\lambda = 450$  nm, utilizando o método do padrão interno.

Prepararam-se soluções padrão com diferentes concentrações de luteína, que foram submetidas ao processo extractivo antes da adição da mesma quantidade conhecida de padrão interno. De seguida foram injectadas, construindo-se com os resultados curvas de calibração que representam a concentração do composto em função da razão das áreas (área do composto/área do padrão interno).

Aos extractos de azeite foi também adicionada a mesma quantidade de padrão interno. Da mesma forma foi calculada a razão entre as áreas obtidas no cromatograma e convertidas na concentração correspondente em  $\mu\text{g/ml}$ , através das curvas de calibração previamente construídas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desenvolvimento do método

#### 5.1.1 Optimização das condições de extracção e separação cromatográfica

A metodologia analítica inicialmente adoptada neste trabalho foi a proposta por Minguez-Mosquera e a sua equipa em 1992, para a quantificação rápida de carotenóides em azeites. Estes investigadores propuseram como processo de extracção rápido, eficaz e com consumo reduzido de reagentes, a extracção por fase sólida (SPE), seguido da separação cromatográfica por HPLC em fase reversa.

A metodologia consistia em pesar aproximadamente 1g de azeite para um tubo de vidro dissolvendo-o em 4 ml de *n*-hexano. A solução era transferida para uma coluna C18 previamente acondicionada com metanol e *n*-hexano, ligada a um sistema de vazio. De seguida, e de acordo com a metodologia original, deveria eluir-se com *n*-hexano a fracção do  $\beta$ -caroteno para posterior medição espectrofotométrica. Para a eluição das xantofilas utilizavam-se 5 ml de acetona, após garantir a ausência total de lípidos na coluna. Esta fracção deveria ser posteriormente concentrada por corrente de azoto, antes de ser injectada no sistema de HPLC.

Para além de não existir grande detalhe na quantidade de enchimento da coluna C18 para aquela quantidade de amostra, nem nos volumes utilizados em algumas fases do protocolo analítico, o método de detecção de eventuais lípidos ainda presentes não era indicado. Assim, no trabalho experimental desenvolvido efectuaram-se várias tentativas com diferentes volumes de *n*-hexano. A gordura no extracto traduzia-se pela presença de gotículas de cor amarelada. Somente com 12 ml de *n*-hexano não se verificou a presença das referidas gotículas.

Dado que as colunas com 500 mg de enchimento são as mais usuais, utilizou-se este tipo de colunas inicialmente. Numa primeira aproximação parecia obter-se o  $\beta$ -caroteno e a luteína isoladamente, mas ao reutilizar a mesma coluna verificou-se que a luteína ficava retida parcialmente no enchimento (Tabela 9). O aumento de volume das soluções utilizadas não foi capaz de resolver a situação.

TABELA 9 – Comparação dos métodos de extracção

Método de Extracção	Extracções do azeite AZCOA	Luteína /g amostra (unidade cromatográfica de área a 450 nm)
SPE (uso da mesma coluna)	1 <sup>a</sup>	635873
	2 <sup>a</sup>	1290798
Líquido-líquido (utilizado neste trabalho)	1 <sup>a</sup>	2368977
	2 <sup>a</sup>	2354996
	3 <sup>a</sup>	2409572

Os mesmos autores comparavam, no referido artigo, o método de SPE com outro método de extracção, extracção líquido-líquido. Neste último, os diferentes grupos de carotenóides – carotenos e xantofilas eram separados em duas fases: uma de DMF que retém clorofilas e xantofilas e outra de *n*-hexano que retém lípidos e  $\beta$ -caroteno. Este processo era realizado numa ampola de decantação, utilizando cerca de 10-15 g de azeite em 150 ml de DMF e adicionando 5 porções de 50 ml de *n*-hexano. O *n*-hexano, que continha o  $\beta$ -caroteno e os lípidos, era concentrado em rotavapor, filtrado e diluído num volume conhecido, para se efectuar posteriormente a determinação espectrofotométrica. À fase de DMF, onde se encontravam as xantofilas e clorofilas, adicionava-se uma solução de sulfato de sódio a 2%, à temperatura de 0°C. De seguida era transferida para uma nova ampola, à qual se adicionavam 100 ml de solução de *n*-hexano/ éter etílico (1:1 v/v). A fase aquosa era descartada, eliminando-se os compostos hidrossolúveis e polifenóis, e a fase orgânica era desumidificada com sulfato de sódio anidro e evaporada até próximo da seca em rotavapor, à temperatura de 30°C. O resíduo seco, depois de redissolvido num volume apropriado de acetona era submetido a análise por HPLC.

Embora esta metodologia pudesse constituir uma alternativa mais fiável, foi necessário efectuar diversas modificações no sentido de a tornar mais rápida, simples e eficiente. Para além disso, o volume proposto para cada reagente era excessivo, tornando o método demasiado dispendioso e, acima de tudo, nocivo para saúde e para o ambiente.

Numa primeira aproximação optou-se por fazer um micrométodo baseado no anterior, reduzindo proporcionalmente o volume de amostra e reagentes dez vezes. Trabalhou-se com tubos de rolha que permitiam uma agitação mais vigorosa por vórtex, bem como uma efectiva separação das fases, mesmo na presença de emulsões, por centrifugação. Os resultados foram animadores, permitindo logo à partida obter uma

extracção superior da luteína, comparativamente ao método de SPE inicial, bem como uma boa repetibilidade, embora numa fase inicial apenas por comparação das áreas cromatográficas (Tabela 9).

O volume de *n*-hexano, 5×5ml, utilizado para separar o β-caroteno e os lípidos dos restantes componentes, parecia demasiado, além de tornar o método moroso. Para contrariar este facto, efectuou-se um ensaio comparativo das áreas dos picos de luteína e β-caroteno com apenas 4 extracções. No cromatograma resultante foi detectado um pico atribuído ao β-caroteno, facto que comprova a ineficiência da extracção. Este deveria passar totalmente para a fase do *n*-hexano para ser quantificado espectrofotometricamente. Tal procedimento seria evitado se não se tratasse de uma matriz lipídica, em que é necessário garantir a ausência de lípidos na solução a injectar no sistema de HPLC, sob pena de comprometer o tempo de vida da coluna cromatográfica. Conforme se pode verificar na Tabela 10, a extracção de uma amostra, em duplicado, com diferentes volumes de *n*-hexano, demonstrou que efectivamente são necessárias as 5 extracções para garantir a ausência do β-caroteno.

A adição de sulfato de sódio anidro ao *n*-hexano, no momento que antecede a sua concentração, pretendeu eliminar quaisquer vestígios de DMF, evitando a sua interferência na determinação espectrofotométrica.

As etapas de concentração e evaporação foram efectuadas por corrente de azoto em vez do rotavapor, atendendo aos volumes reduzidos e ao facto de cada amostra ter que ser evaporada individualmente.

**TABELA 10** – Determinação do volume de *n*-hexano que garante a ausência de β-caroteno

Quinta das Marvalhas	Luteína		β-caroteno
	Área /g	%	Área/g
Extracção c/ 5× 5 ml de hexano	2176182	100	n.d
Extracção c/ 4×5 ml de hexano	2140256	98	71170

n.d – não detectado

A diluição da fase contendo o  $\beta$ -caroteno e os lípidos foi efectuada com *n*-hexano até perfazer 7,0 ml. Este volume foi definido com base no volume de solução que a célula espectrofotométrica necessitava para cada determinação, que correspondia a 3 ml. Os 7 ml permitiam efectuar duas determinações e ainda a lavagem da célula. Não é conhecido o volume utilizado na eluição por Minguez-Mosquera *et al.* (1992).

Na etapa em que se adicionava a solução de *n*-hexano/ éter etílico (1:1 v/v) à fase de DMF (contém as xantofilas e clorofilas), em vez dos 10 ml (volume correspondente ao proposto por Minguez-Mosquera *et al.* (1992)) foram utilizados  $2 \times 10$  ml. Este aumento de volume da referida solução deve-se ao facto da fase de DMF, após a primeira adição, apresentar ainda bastante coloração. No fim da segunda adição, ficou incolor, sendo rejeitada posteriormente.

Desde o início do trabalho o objectivo era utilizar um padrão interno para aumentar a reprodutibilidade do método na fase extractiva. Embora existam algumas sugestões na literatura para outras matrizes, os protocolos extractivos não contemplam a separação das duas fases. No caso em estudo dispunha-se de um padrão interno descrito frequentemente (Rodriguez-Amaya, D. 1999; Mendes-Pinto *et al.*, 2004), o  $\beta$ -apo-8'-carotenal. No entanto, dada a sua solubilidade em *n*-hexano era quantificado juntamente com o  $\beta$ -caroteno, aparecendo apenas parcialmente na fase da luteína (Tabela 11). A utilização de uma xantofila ou seu derivado teria sido uma aproximação mais plausível, mas não se encontrou uma opção viável. Assim, e de forma a compensar, pelo menos, as últimas fases do processo, adicionou-se o padrão interno após a separação total das duas fases. Garantiu-se assim que o padrão interno permanecia, na sua totalidade, na fase da luteína.

**TABELA 11** – Utilização do  $\beta$ -apo-8'-carotenal como padrão interno

<b>Padrão interno</b>	<b>Área do Pico</b>	<b>%</b>
Injecção directa	6988891	100
Após extracção	1732161	25

No que respeita à separação cromatográfica por HPLC, Minguez-Mosquera e colaboradores (1992) propuseram uma fase móvel relativamente complexa, constituída por 2 eluentes: um deles era água-par iónico (solução de tetrabutylamónio-0,05M e acetato de amónio-1M em água) - metanol (1:1:8 v/v) e outro acetona-metanol (1:1 v/v), em gradiente, com fluxo de 2 ml/min. Dada a sua complexidade (elevado número de componentes e necessidade de acerto de pH), bem como o facto de requerer algum tempo para remoção da solução salina, este sistema não foi adoptado.

A escolha recaiu no sistema de eluentes utilizado por Mendes-Pinto *et al.* (2004) em que o eluente A é uma solução de acetonitrilo: água (9:1, v/v), à qual se adicionou BHT a 0,01%, e o eluente B, uma solução com 100% de acetato de etilo, com o gradiente detalhado no protocolo analítico. O referido sistema permitiu uma boa separação da luteína e do padrão interno. Permitiu ainda a detecção de outros compostos, igualmente bem separados, devendo tratar-se de outras xantofilas e clorofilas, atendendo aos seus máximos de absorção.

Para tornar o processo de separação cromatográfica mais prático e rápido, recorreu-se inicialmente ao injector automático. No entanto, verificaram-se problemas de degradação dos carotenóides, visíveis entre duas injeções simultâneas, mesmo se o ambiente em volta do injector fosse refrigerado (Tabela 12) e utilizando frascos de cor ambar.

**TABELA 12** – Degradação de carotenóides (luteína) em relação ao tipo de injeção

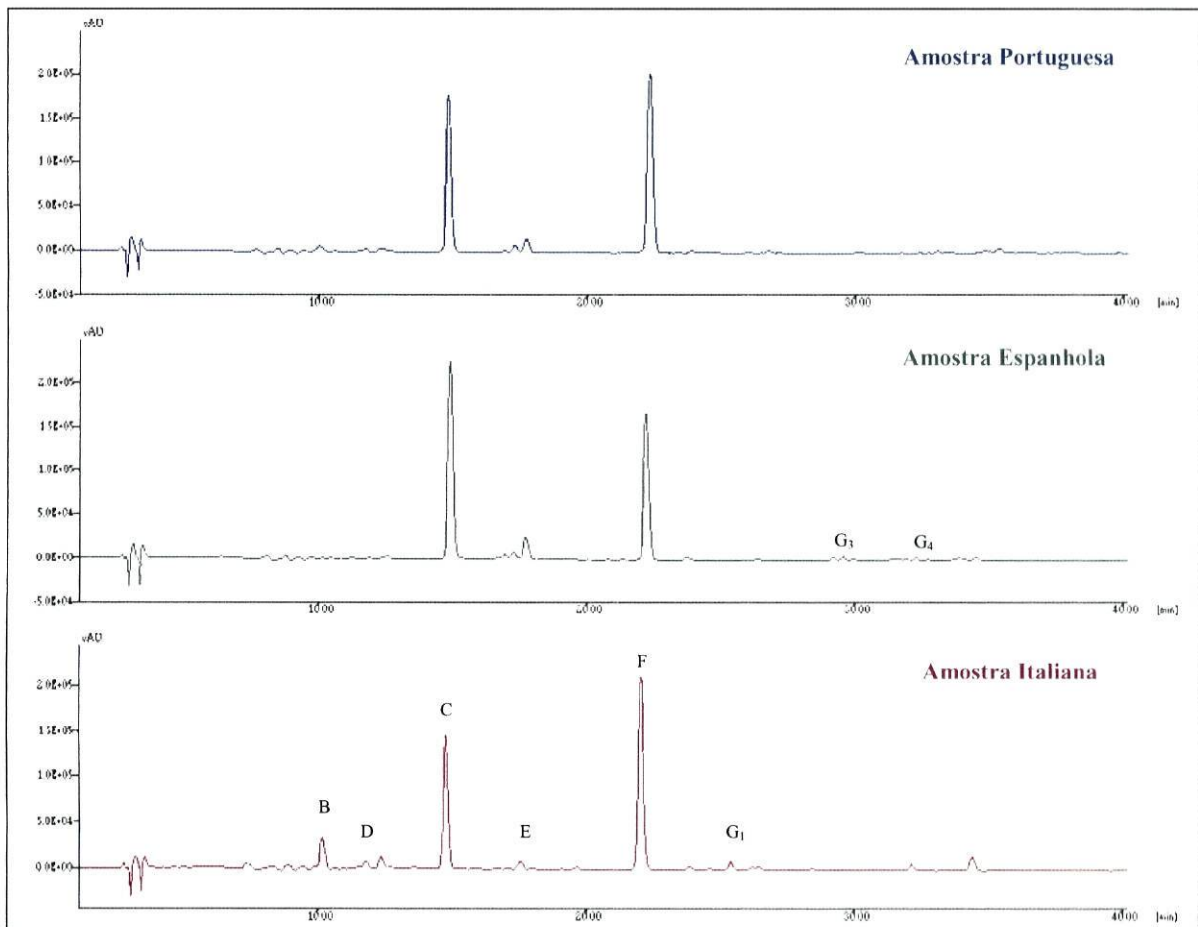
Tipo de Injecção	Preservação	Padrão de luteína		%
		1ª Injecção	2ª Injecção	
Automática	Ambiente	1639994	1265727	77
	Frio	1628611	1408686	86
Manual	-18°C	1624314	1590988	98

Os resultados evidenciam a impossibilidade de injeção automática. Tudo indica que este facto estará relacionado com a instabilidade dos carotenóides. Desta forma recorreu-se sempre à injeção manual conservando as amostras a -18°C entre as injeções.

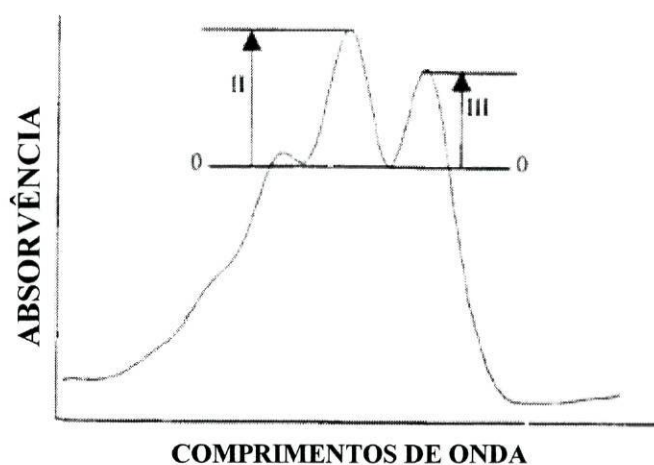
### 5.1.2 Identificação dos carotenóides presentes nas amostras

Conforme é visível na Figura 6, cromatogramas correspondentes a azeites de origem portuguesa, espanhola e italiana, a luteína é o composto maioritário a 450 nm, embora se verifique a existência de outros compostos, alguns com máximos de absorção na mesma gama que pareceu interessante tentar identificar.

A identificação dos carotenóides, tal como foi referido anteriormente, foi realizada com base no espectro de absorção que apresenta três máximos de absorvência, na estrutura espectral (Figura 7) definida pela razão percentual da altura dos picos (%III/II), sendo: III – altura do pico correspondente à banda de absorção do comprimento de onda superior; II – altura do pico correspondente à banda de absorção do comprimento de onda médio e ainda pelo factor de capacidade médio



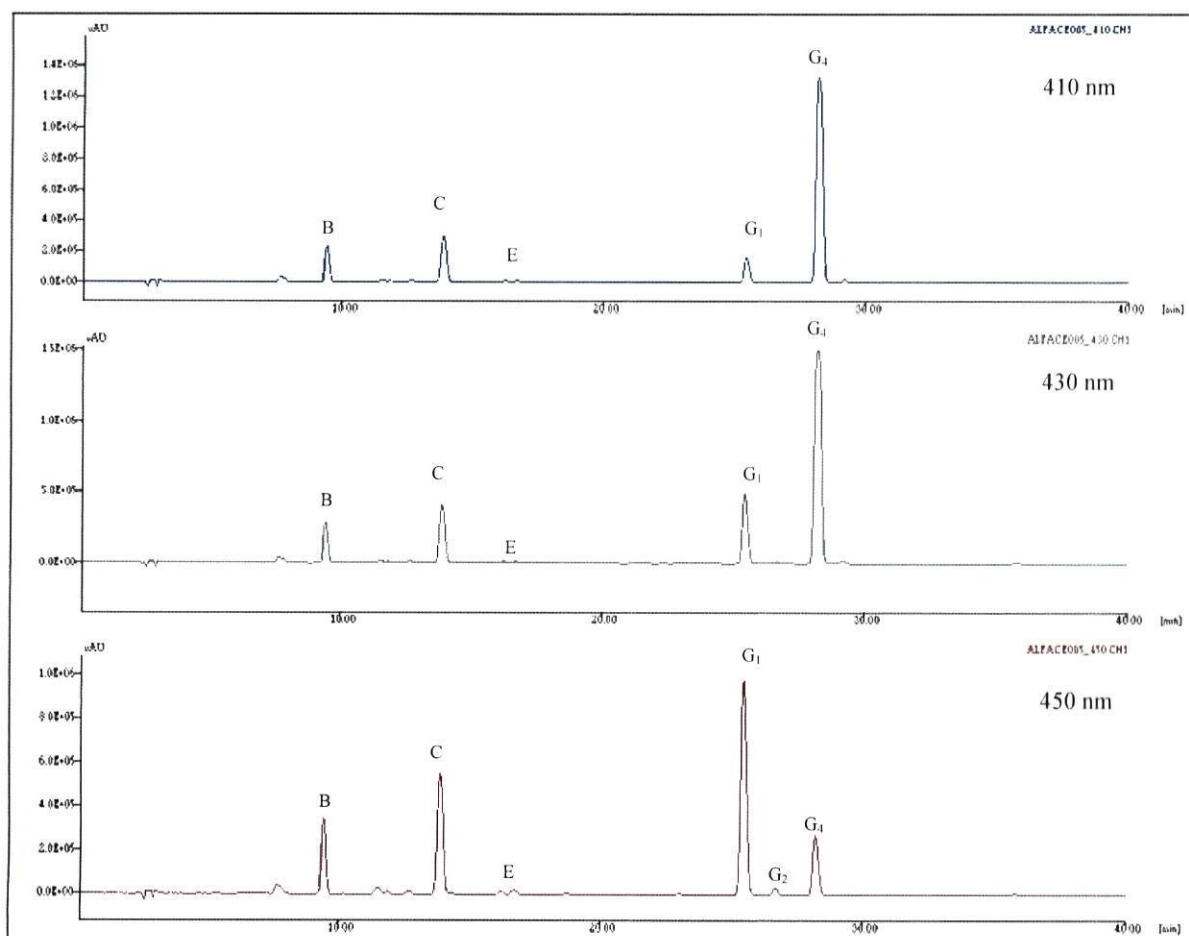
**FIGURA 6** – Cromatogramas de amostras dos diferentes países a 450 nm: B-violaxantina; C-Luteína; D-Luteoxantina; E-Carotenóides não identificados; F- $\beta$ -apo-8'-carotenal; G<sub>1</sub>-clorofila *b*; G<sub>3</sub>-feofitina *b*; G<sub>4</sub>-feofitina *a*



**FIGURA 7** – Estrutura espectral

Na identificação da luteína, do  $\beta$ -caroteno e do  $\beta$ -apo-8'-apocarotenal recorreu-se a padrões comercializados como já foi referido anteriormente. Por sua vez, a identificação da violaxantina, das clorofilas e seus derivados foi realizada com base nos espectros obtidos a partir de um extracto de alface. A alface é uma matriz naturalmente rica em neoxantina, violaxantina, clorofila *a* e *b* e feofitina *a* e *b*, que foi submetida à mesma metodologia analítica utilizada no azeite, de modo a que o comportamento dos compostos não sofresse modificações. A Figura 8 representa um cromatograma da alface a diferentes comprimentos de onda: 410 nm (feofitina *a*), 430 nm (clorofila *a*) e 450 nm (carotenóides e clorofila *b*). A feofitina *b* absorve a 430nm, embora não tenha sido detectada na alface.

De seguida irá proceder-se à descrição individual dos compostos detectados.

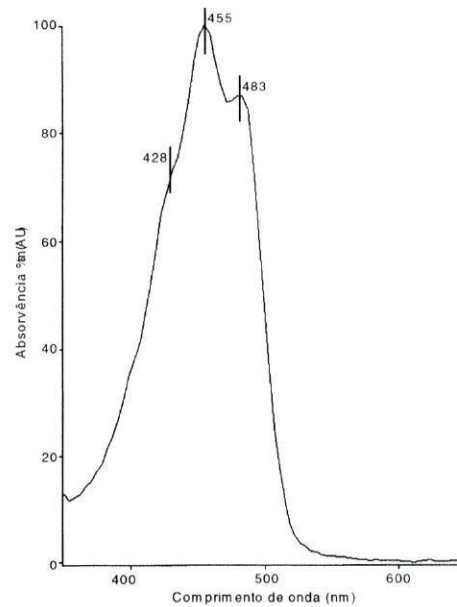


**FIGURA 8** – Cromatograma de um extracto de alface a diferentes comprimentos de onda: 410, 430 e 450 nm. B-violaxantina; C-Luteína; D-Luteoxantina; E-Carotenóides não identificados; G<sub>1</sub>-clorofila *b*; G<sub>2</sub> clorofila *a*; G<sub>4</sub>-feofitina *a*

### A. $\beta$ -caroteno

É um carotenóide que pertence ao grupo dos carotenos, pois não apresenta na sua estrutura átomos de oxigénio (ver Figura 2). Possui dois anéis  $\beta$ -ionona nas extremidades e 11 ligações duplas conjugadas, duas das quais localizadas nos anéis (Figura 2). Apresenta 3 máximos de absorção (428), 455 e 483 nm; uma estrutura fina espectral de 21% e um  $k' = 9,9$ .

Este composto não se encontra presente nos cromatogramas, pois durante o processo de extracção foi separado das xantofilas, sendo determinado por espectrofotometria de UV/Vis. No entanto, o seu espectro de absorção pode ser visualizado na Figura 9.

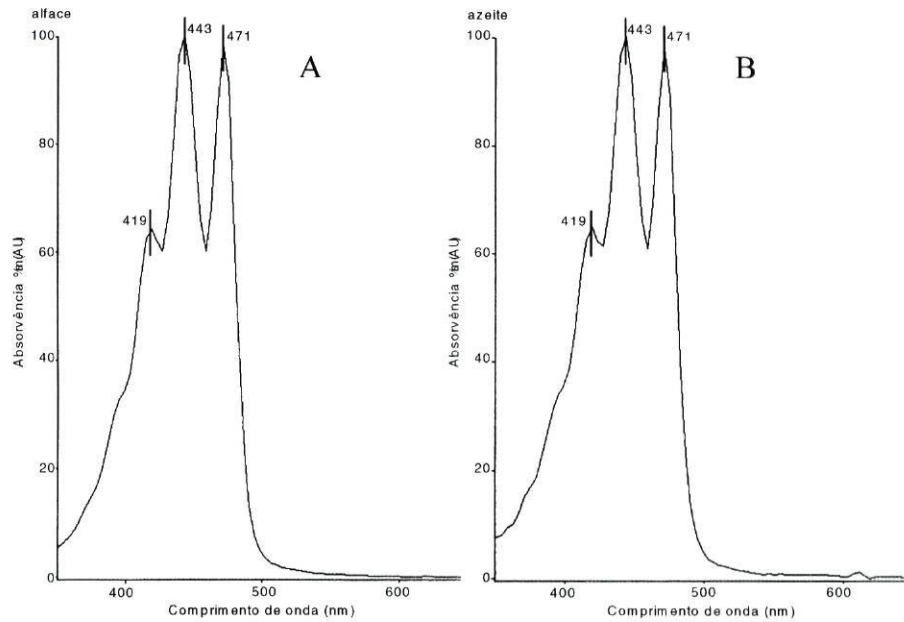


**FIGURA 9** – Espectro de absorção do  $\beta$ -caroteno

### **B. Violaxantina**

É um epoxicarotenóide (ver Figura 2): possui dois grupos epóxido nas posições 5,6 e 5',6', que resulta de reações de hidroxilação e epoxidação do  $\beta$ -caroteno, de acordo com a Figura 1. A sua ausência nas amostras espanholas, Crismoliva, Verde Salud, Virgen d'Oro, Mueoliva, Capricho Andaluz e Óleo de Cazorla, poderá estar relacionada com a reduzida quantidade de  $\beta$ -caroteno, comparativamente com as amostras portuguesas e italianas, conforme será detalhado a seguir.

O seu espectro apresenta máximos de absorção a 419, 443 e 471 nm (Figura 10), uma estrutura espectral de 90% e um  $k' = 2,0$ . Os valores de máximos de absorvência são aproximadamente 10 nm abaixo do  $\beta$ -caroteno e tem uma estrutura espectral maior, devido às ligações duplas conjugadas que permanecem após a epoxidação na cadeia poliénica (Rodríguez-Amaya, 1999).



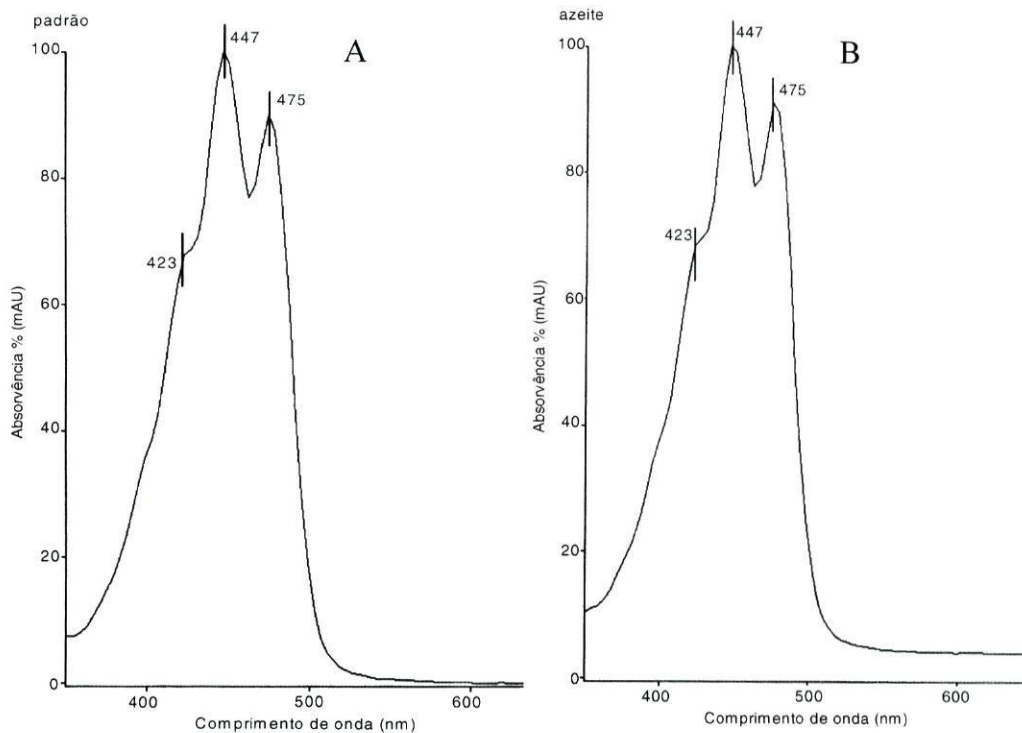
**FIGURA 10** – Espectros de absorção da violaxantina no extracto de alface (A) e no azeite (B)

### C. Luteína

Trata-se de um hidroxicarotenóide (ver Figura 2), pertencente ao grupo das xantofilas e que tem como precursor o  $\alpha$ -caroteno, conforme se pode observar na Figura 1. Apresenta máximos de absorção a (423), 447 e 475 nm e uma estrutura espectral de 56% que reflecte as 10 ligações duplas conjugadas da cadeia poliénica (Figura 11) e  $k' = 3,3$ .

### D. Luteoxantina

Trata-se de um epoxicarotenóide que resulta da conversão do grupo epóxido do C5' e C6' da violaxantina num grupo furano, facto que se pode observar na Figura 1. Este composto não se encontra presente na alface, contudo a sua identificação foi efectuada tendo como base a informação publicada por Minguez-Mosquera *et al.* (1992) e Giuffrida *et al.* (2007). A luteoxantina possui 3 máximos de absorção: 399, 423 e 451 nm (apresenta um desvio aproximadamente de - 20 nm relativamente à violaxantina), estrutura espectral de 110% e um  $k' = 2,7$ . Está presente apenas em amostras italianas e algumas portuguesas (Quinta das Marvalhas, Azeite do Norte Alentejano-Continente, Azeite de Moura, Relíquia da Vidigueira, Ficalho e Quinta do Juncal



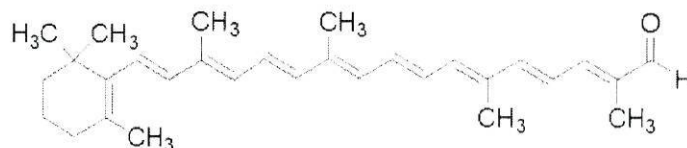
**Figura 11** – Espectros de absorção da luteína no extracto de alface (A) e no azeite (B)

### E. Carotenóides não identificados

No padrão de luteína, no extracto de alface e em todas as amostras analisadas é possível constatar a presença de 3 picos a seguir à luteína, picos esses que se referem a compostos que apresentam máximos de absorção idênticos ( $E_1$  – (419), 443 e 471 nm;  $E_2$  – 423, 443 e 471 nm;  $E_3$  – (419), 443 e 467 nm) todos na gama de absorção da luteína. No entanto, a estrutura espectral e os  $k'$  são diferentes ( $E_1= 53\%$  e  $k'= 4,3$ ;  $E_2= 64\%$  e  $k'= 4,4$ ;  $E_3= 34\%$  e  $k' = 4,5$ ). Tudo indica tratar-se de isómeros da luteína.

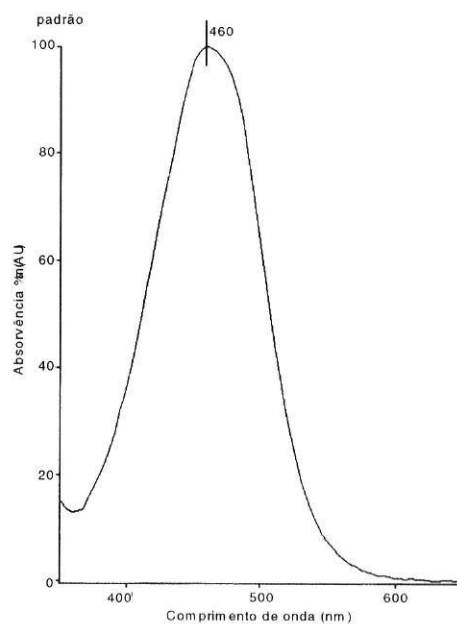
### F. $\beta$ -apo-8'-carotenal

Este composto foi utilizado como padrão interno, tendo sido obtido comercialmente. Trata-se de um produto resultante da degradação oxidativa do  $\beta$ -caroteno. O fenómeno de oxidação ocorre a nível do C8' do  $\beta$ -caroteno, conduzindo à quebra na cadeia poliénica, originando dois produtos: o  $\beta$ -apo-8'-carotenal (Figura 12) e o ciclotrial (composto de baixo peso molecular).



**FIGURA 12** – Estrutura química do  $\beta$ -apo-8'-carotenal

O  $\beta$ -apo-8'- carotenal apresenta, ao contrário dos carotenóides, apenas um máximo de absorvência a 460 nm (Figura 13) e um  $k = 5,5$ , facto que permite facilmente a sua identificação.



**FIGURA 13** – Espectro de absorção do padrão  $\beta$ -apo-8'-carotenal

### G. Clorofilas e seus derivados

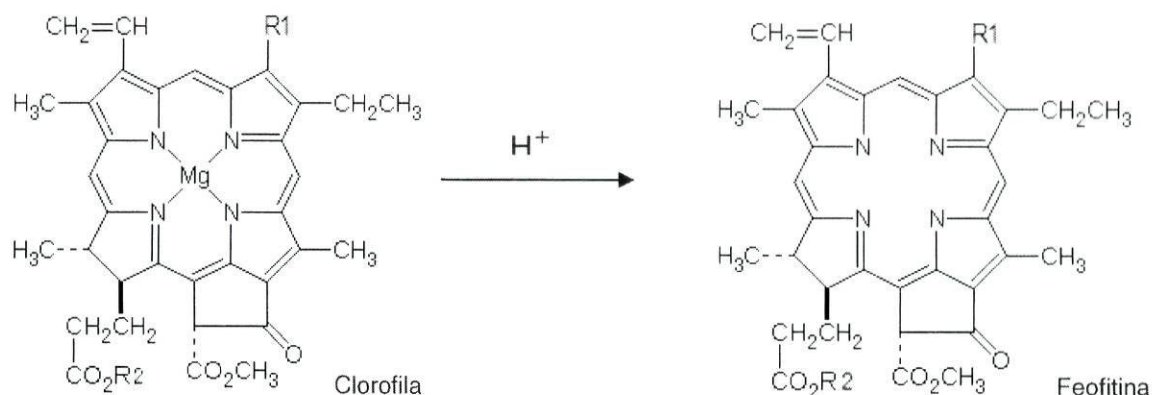
Tal como já foi referido anteriormente, existem outros compostos, para além dos carotenóides, no extracto das amostras submetido à separação cromatográfica – as clorofilas. A metodologia analítica aplicada à determinação dos carotenóides não permite eliminar as clorofilas, podendo mesmo ser identificadas e quantificadas conjuntamente com os referidos, uma vez que esta metodologia revelou ser eficiente na separação, detecção e identificação dos dois tipos de compostos (Minguez-Mosquera *et al.*, 1992).

As clorofilas são protegidas pelos carotenóides do ataque do oxigénio molecular produzido pelo processo fotossintético e, tal como os carotenóides, são pigmentos responsáveis pela coloração dos alimentos. Como é sabido trata-se de um factor que exerce bastante influência no julgamento do consumidor relativamente à qualidade de um determinado produto. Deste modo, contribuem para a coloração do azeite, produto que varia desde o verde, ao verde amarelado até ao amarelo dourado. As clorofilas encontram-se amplamente distribuídas na natureza. A clorofila *a* é comum em todos os organismos fotossintéticos, enquanto que a clorofila *b* está presente apenas em plantas superiores. A sua estrutura consiste num anel porfirina complexado com um ião magnésio, transformando-se numa estrutura macrocíclica tetrapirrólica conjugada e insaturada, ligada através de pontes de metileno. O magnésio das clorofilas pode ser removido das clorofilas *a* e *b*, originando as feofitinas *a* e *b*, respectivamente (Figura 14) (Lee *et al.*, 2005).

O processo de extracção do azeite virgem permite que as clorofilas presentes nas azeitonas sejam transferidas para o azeite devido ao seu carácter lipofílico, sofrendo simultaneamente alguma degradação, caso da feofitinação (remoção do magnésio). Assim, a fracção de clorofilas presentes no azeite virgem é formada pela clorofilas *a* e *b* e ainda pelas feofitinas *a* e *b*. A feofitina *a* é o composto predominante. Nos azeites submetidos a refinação verifica-se uma redução no teor destes pigmentos (Minguez-Mosquera *et al.*, 2002b).

O sistema de ligações duplas conjugadas e a estrutura básica da porfirina originam nas clorofilas e as feofitinas um espectro de absorção muito característico, com bandas relativamente pronunciadas na região amarela, vermelha e próxima do infravermelho e uma banda de absorção fortemente pronunciada na região azul-violeta (“Soret band”). A presença desta banda indica ausência de degradação na estrutura básica da porfirina (Minguez-Mosquera *et al.*, 2002b)

A ordem de eluição ocorreu de acordo com Minguez-Mosquera *et al.* (1992) e Mendes-Pinto *et al.* (2004).



R1 = - CH<sub>3</sub> – Clorofila *a*; Feofitina *a*; CHO – Clorofila *b*; Feofitina *b*

R2 = grupo fitilo

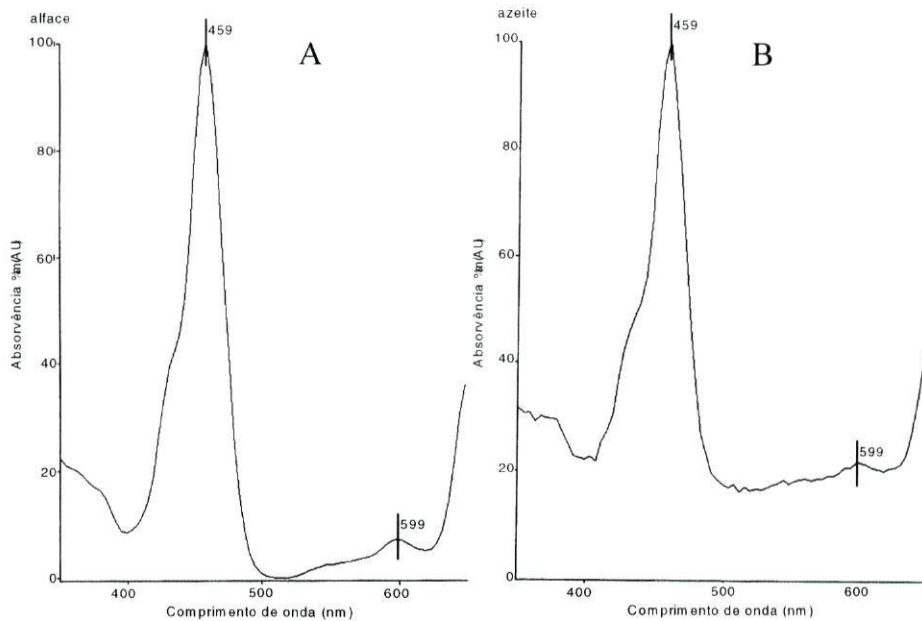
**FIGURA 14** – Reacção de feofitinação (adaptado de Minguez-Mosquera *et al.*, 2002b)

### G<sub>1</sub>. Clorofila *b*

Esta clorofila resulta da oxidação do grupo metilo (R1) da clorofila *a*, tornando-se num composto mais polar, relativamente ao que lhe deu origem. Possui um máximo de absorvência na região azul-violeta, a 459 nm, e 3 bandas características: 551, 599 e 647 nm (Figura 15). O  $k'$  é igual a 7,2.

A clorofila *b* foi detectada somente em algumas amostras italianas (Ferradini, Rocchi, Duca di Toscana) e portuguesas (Azeite da Casa Grande, Quinta das Marvalhas, Quinta das Marvalhas – Reserva, Moura e Trás-os-Montes – Continente).

A sua presença nas amostras referidas poderá dever-se ao facto de a cinética de reacção de feofitinação não ser tão rápida na série *b* como na série *a* (Minguez-Mosquera *et al.*, 2002b).

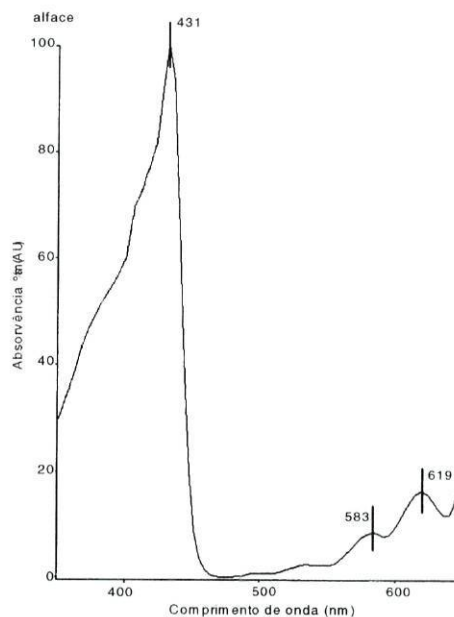


**FIGURA 15** – Espectros de absorção da clorofila *b* no extracto de alface (A) e no azeite (B)

## G<sub>2</sub>. Clorofila *a*

Este composto apresenta um máximo de absorvência a 431nm e 3 bandas: 583, 619 e 662 nm (Figura 16); a última banda não foi determinada, pois o detector de díodos não detecta comprimentos de onda além dos 650 nm.

A clorofila *a* não foi detectada em nenhuma amostra, possivelmente devido à cinética da reacção de feofitinação (Minguez- Mosquera *et al.*, 2002b).



**FIGURA 16** – Espectro de absorção da clorofila *a* no extracto de alface

### G<sub>3</sub>. Feofitina *b*

Trata-se de um composto resultante da degradação da clorofila *b* (remoção do magnésio), que conduz a um desvio hipsocrómico na “Soret band”, de 459 para 435 nm, e um desvio batocrómico (deslocação para um comprimento de onda superior) na última das 3 bandas, cujo comprimento de onda não foi determinada pela razão mencionada atrás, no entanto situar-se-ia a 654 nm. As outras duas bandas ocorrem a 527 e 599 nm (Figura 16) e o  $k' = 8,2-8,5$ .

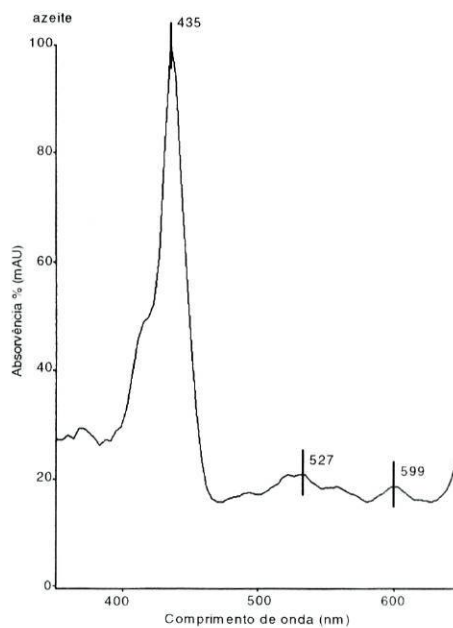
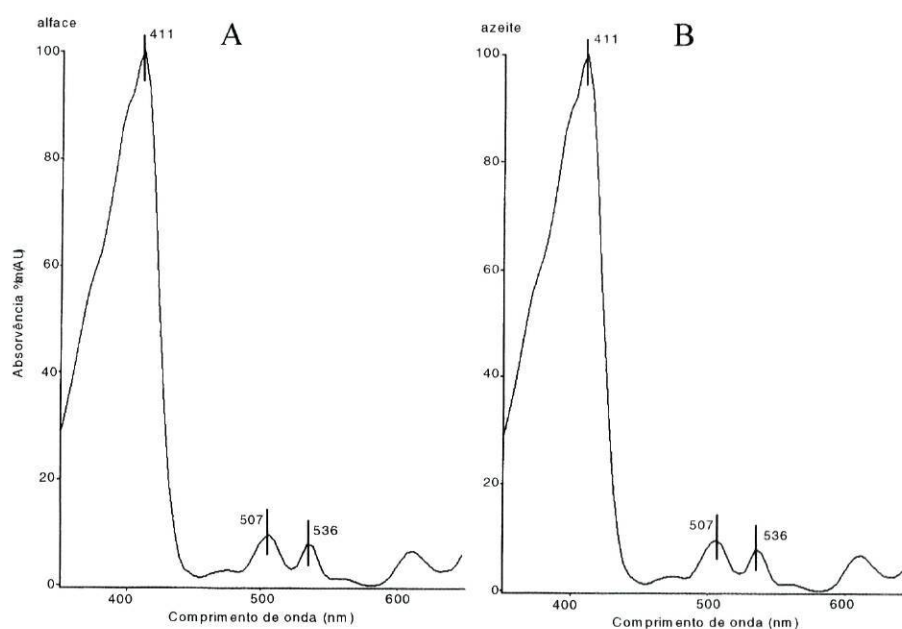


FIGURA 17 – Espectros de absorção da feofitina *b* no azeite

### G<sub>4</sub>. Feofitina *a*

Este derivado resulta da reacção de feofitinação da clorofila *a*. Tal como acontecia com a clorofila *b* ocorre um desvio hipsocrómico na “Soret band”, de 431 para 411 nm, um desvio batocrómico (deslocação para um comprimento de onda superior) na última das 3 bandas, cujo comprimento de onda pela razão não foi determinado pela razão mencionada anteriormente, no entanto situar-se-ia a 666 nm. As outras duas bandas ocorrem a 507 e 536 nm (Figura 17) e o  $k' = 8,9-9,1$ .



**FIGURA 18** -Especros de absorção da feofitina *a* no extracto de alfaca (A) e no azeite(B)

Os valores referentes aos máximos de absorvência de cada composto e o  $k'$  estão de acordo com o que se encontra descrito (Minguez- Mosquera *et al.*, 1992; Mendes-Pinto *et al.*, 2004; Giuffrida *et al.*, 2007).

## 5.2 Validação

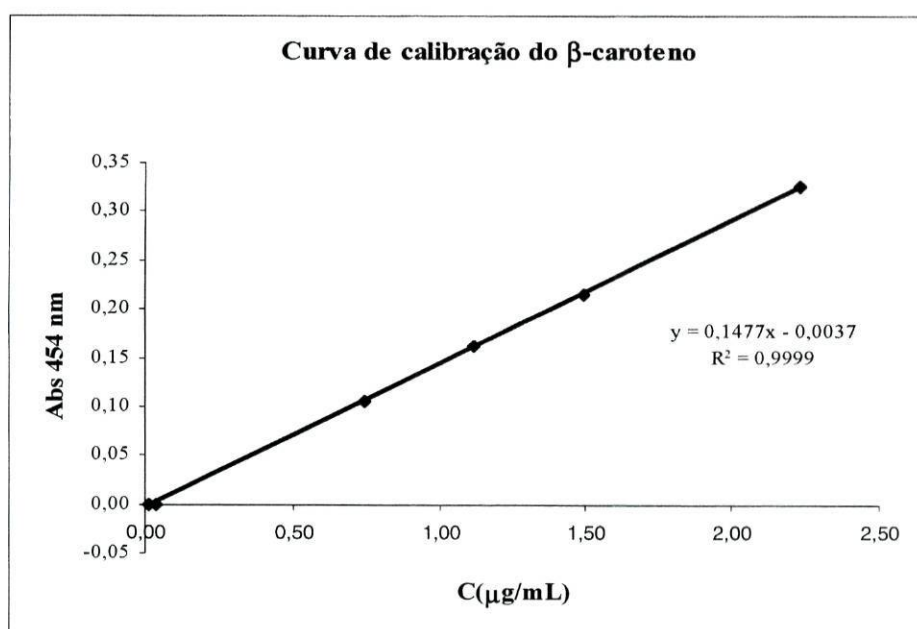
As diversas modificações no método descrito por Minguez-Mosquera *et al.* (1992) implicaram a validação da nova metodologia.

### 5.2.1 Linearidade

No estudo da linearidade do método realizaram-se curvas de calibração na gama de concentrações descritas em materiais e métodos. No que toca à luteína foi elaborada com o padrão interno.

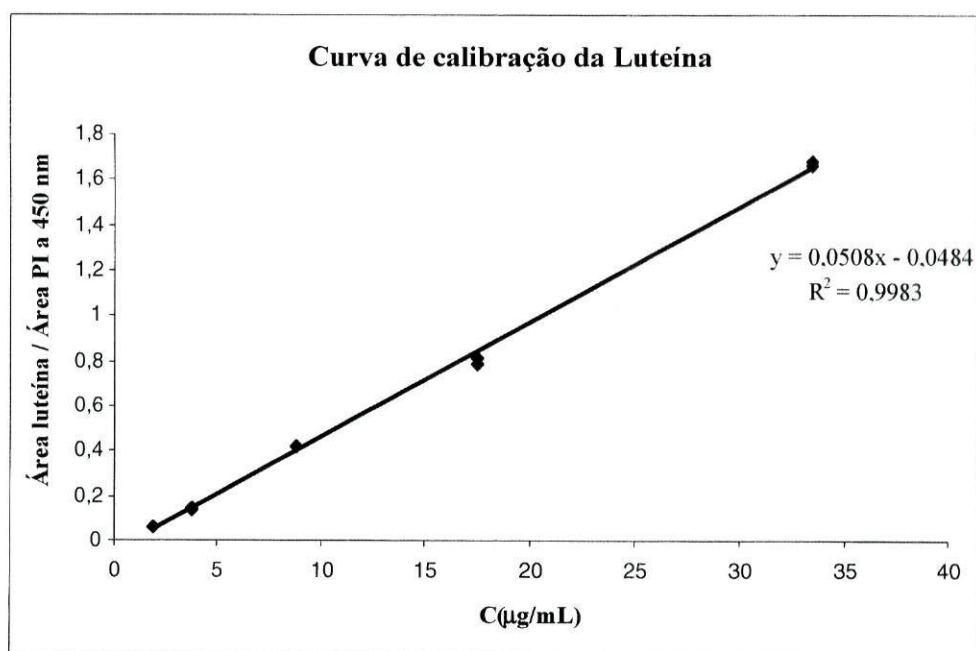
Em ambos os casos, as soluções padrão foram previamente submetidas a um processo de extracção completo, como se de amostras se tratassem. Foram realizados previamente testes de extracção de padrões, verificando-se perdas efectivas, facto que deveria ser compensado. No caso do  $\beta$ -caroteno ocorria uma perda constante de cerca de 25%, independentemente da concentração inicial testada; no caso da luteína essa perda era superior, atingindo os 33%, facto este não relatado por Minguéz-Mosquera *et al.* (1992).

No caso do  $\beta$ -caroteno, o protocolo mostrou-se linear na gama de concentrações testada: de 0,02 a 2,23  $\mu\text{g/ml}$  ( $y = 0,1447x - 0,0037$ ), apresentando, mesmo após o protocolo extractivo, um elevado coeficiente de correlação (0,9999) (Figura 19).



**FIGURA 19** – Linearidade do  $\beta$ -caroteno na gama de concentrações testadas

Para a luteína determinou-se a correlação das áreas com o padrão interno a 450 nm, numa gama de concentrações entre 1,90 e 57,0  $\mu\text{g/ml}$ . A resposta do detector de díodos revelou-se linear para a gama de concentrações entre 0,4 e 34,0  $\mu\text{g/ml}$ . O coeficiente de correlação obtido foi 0,9983 (Figura 20).



**Figura 20** – Linearidade da luteína no método analítico

### 5.2.2 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a concentração mais baixa de analito capaz de ser detectada pelo método. Para a luteína foi calculado como a concentração correspondente a três vezes o desvio padrão do ruído de fundo de um cromatograma de uma amostra com um teor reduzido do referido carotenóide.

No que respeita ao  $\beta$ -caroteno, não foi possível determinar o limite de detecção concreto devendo situar-se na zona dos 0,03  $\mu\text{g/ml}$ , onde a leitura no espectrofotómetro se apresentava muito instável.

O limite de quantificação (LQ) define-se como a menor concentração capaz de ser quantificada num método analítico. No caso dos 2 carotenóides em estudo foram calculados com base em diluições sucessivas de um extracto, de forma a permitir leituras estáveis no espectrofotómetro, no que se refere ao  $\beta$ -caroteno, e 10 vezes o desvio padrão do ruído cromatográfico de fundo no que se refere à luteína.

Os resultados encontram-se detalhados na Tabela 13, sendo apresentados para a solução injectada ( $\mu\text{g/ml}$ ) e para o correspondente em azeite ( $\text{mg/kg}$ ), partindo do pressuposto que se utilizou sempre aproximadamente 1g de amostra.

**TABELA 13 – Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do  $\beta$ -caroteno e da luteína**

Composto	LD		LQ	
	$\mu\text{g/ml}$	$\text{mg/kg}$	$\mu\text{g/ml}$	$\text{mg/kg}$
$\beta$ -caroteno	-----	-----	0,09	0,44
Luteína	0,11	0,01	0,35	0,05

$\mu\text{g/ml}$  – concentração da solução injectada  
 $\text{mg/kg}$  – concentração em azeite

Cichelli *et al.* (2004) determinaram os teores de luteína, em azeite, utilizando o mesmo método de extracção líquido-líquido com *n*-hexano e DMF descrito por Minguez-Mosquera *et al.* (1992). Obtiveram um LD também de 0,01  $\text{mg/kg}$ . Contudo, para o  $\beta$ -caroteno não se encontrou descrito qualquer limite de detecção.

No que respeita ao limite de quantificação, não estão descritos valores para o  $\beta$ -caroteno nem para a luteína.

### 5.2.3 Precisão

O estudo da repetibilidade num mesmo dia foi realizado pela extracção simultânea, em triplicado de uma amostra. Expressa-se pelo valor do coeficiente de variação (CV%). No caso do  $\beta$ -caroteno foi 1,3% e para a luteína 3,3%, o que parece ser aceitável para este tipo de compostos sensíveis.

A precisão intermédia, definida como a variação de uma determinação ao longo do tempo, é calculada por comparação dos resultados obtidos em diferentes dias. No caso em estudo, uma mesma amostra foi extraída em 3 dias diferentes, tendo-se obtido para o  $\beta$ - e luteína coeficientes de variação de 3% e 7%, respectivamente.

#### **5.2.4 Exactidão**

A exactidão do método foi avaliada por ensaios de recuperação. Estes consistiram na determinação da percentagem de recuperação obtida pela extracção de amostras antes e após adição de quantidades conhecidas de padrões.

Estes consistiram na determinação da percentagem de recuperação dos analitos das amostras antes e após adição de quantidades conhecidas de padrões.

Foi realizado, para cada um dos carotenóides, um ensaio de recuperação em duplicado e em simultâneo, com um índice de fortificação de 40%.

Os resultados dos ensaios de recuperação foram de 101% para o  $\beta$ -caroteno e 97% para a luteína. Os resultados para a luteína revelaram-se muito satisfatórios, sendo inferiores aos obtidos por Minguez-Mosquera e seus colaboradores (1992) (106%) e ligeiramente superiores aos obtidos por Cichelli e seus colaboradores (2004) (95%). Para o  $\beta$ -caroteno não se encontraram descritos resultados de ensaios de recuperação em azeite.

### **5.3 Quantificação**

Com o objectivo de conhecer os teores de luteína e  $\beta$ -caroteno em azeite, foram avaliadas 38 amostras (25 portuguesas, 6 espanholas e 7 italianas), conforme descrito na amostragem, extraídas pelo menos em duplicado.

Os resultados obtidos para todas as amostras, agrupadas por país, encontram-se detalhados nas Tabelas 14, 15 e 16.

**TABELA 14** – Teores médios de luteína e  $\beta$ -caroteno nos azeites DOP portugueses avaliados

Origem	Nome	Luteína	$\beta$ -caroteno
		Média $\pm$ sd (mg/kg)	Média $\pm$ sd (mg/kg)
Beira Interior	Rodão	2,25 $\pm$ 0,02	4,38 $\pm$ 0,02
	Malpica do Tejo	1,97 $\pm$ 0,04	3,31 $\pm$ 0,03
Moura	Ficalho	2,13 $\pm$ 0,07	4,69 $\pm$ 0,05
	Herdade do Esporão	3,66 $\pm$ 0,17	5,42 $\pm$ 0,07
	Herdade dos Coteis	2,22 $\pm$ 0,04	4,24 $\pm$ 0,04
	Moura	2,42 $\pm$ 0,20	5,14 $\pm$ 0,19
	Relíquia da Vidigueira	2,77 $\pm$ 0,06	4,72 $\pm$ 0,11
Norte Alentejano	Azeites do Norte Alentejano - Continente	2,47 $\pm$ 0,01	5,56 $\pm$ 0,02
	Lagar do Monte	2,84 $\pm$ 0,05	4,91 $\pm$ 0,05
Ribatejo	Quinta da Rainha	1,41 $\pm$ 0,03	5,53 $\pm$ 0,03
	Quinta do Juncal	3,17 $\pm$ 0,13	5,25 $\pm$ 0,04
Trás os Montes	AZCOA	1,45 $\pm$ 0,02	5,03 $\pm$ 0,07
	Azeites de Trás-os- Montes- Continente	4,31 $\pm$ 0,13	5,97 $\pm$ 0,11
	Carm Premium - Carm	1,03 $\pm$ 0,05	4,14 $\pm$ 0,21
	Casa Aragão	2,64 $\pm$ 0,18	4,84 $\pm$ 0,06
	Casa Grande	3,30 $\pm$ 0,01	7,97 $\pm$ 0,09
	Casal da Vilarica	1,32 $\pm$ 0,03	2,96 $\pm$ 0,15
	Castello d' Alba	1,63 $\pm$ 0,10	4,20 $\pm$ 0,05
	Ouro do Tua	2,27 $\pm$ 0,20	5,15 $\pm$ 0,23
	Porca de Murça	2,10 $\pm$ 0,02	5,63 $\pm$ 0,44
	Quinta das Marvalhas	1,87 $\pm$ 0,11	3,96 $\pm$ 0,09
	Quinta das Marvalhas – Reserva	1,75 $\pm$ 0,03	4,65 $\pm$ 0,20
	Quinta do Bispado	1,42 $\pm$ 0,10	4,37 $\pm$ 0,28
Serrata	1,88 $\pm$ 0,11	5,79 $\pm$ 0,18	
Vila Nova	5,53 $\pm$ 0,28	5,98 $\pm$ 0,06	
<b>Média (total das amostras)</b>		<b>2,39<math>\pm</math> 1,01</b>	<b>4,95<math>\pm</math>0,99</b>
<b>Média dos dois compostos</b>		<b>6,17<math>\pm</math> 3,06</b>	

**TABELA 15** – Teores médios de luteína e  $\beta$ -caroteno nos azeites DOP espanhóis avaliados

Comunidade	Região DOP	Nome	Luteína	$\beta$ -caroteno
			Média $\pm$ sd (mg/kg)	Média $\pm$ sd (mg/kg)
Andaluzia	Baena	Crismoliva	3,70 $\pm$ 0,04	3,84 $\pm$ 0,05
	Sierra Mágina	Verde Salud	4,29 $\pm$ 0,18	3,51 $\pm$ 0,15
	Sierra Mágina	Virgen d' Oro	3,31 $\pm$ 0,20	3,05 $\pm$ 0,05
	Priego de Córdoba	Mueoliva	1,26 $\pm$ 0,07	1,58 $\pm$ 0,06
	Priego de Córdoba	Capricho Andaluz	4,17 $\pm$ 0,13	2,87 $\pm$ 0,03
	Sierra Cazorla	Óleo da Cazorla	4,62 $\pm$ 0,23	4,35 $\pm$ 0,00
<b>Média total</b>			<b>3,56<math>\pm</math>1,22</b>	<b>3,20<math>\pm</math>0,96</b>
<b>Média dos dois compostos</b>			<b>6,37<math>\pm</math>2,35</b>	

**TABELA 16** – Teores médios de luteína e  $\beta$ -caroteno nos azeites DOP italianos avaliados

Região	Região DOP	Nome	Luteína	$\beta$ -caroteno
			Média $\pm$ sd (mg/kg)	Média $\pm$ sd (mg/kg)
Toscana	Chianti Clássico	Ferradini	1,85 $\pm$ 0,09	5,39 $\pm$ 0,07
	Toscana	Ardoino	1,25 $\pm$ 0,08	5,24 $\pm$ 0,05
		Caparelli Firenze	1,37 $\pm$ 0,02	3,01 $\pm$ 0,02
		Calia	1,56 $\pm$ 0,10	5,69 $\pm$ 0,10
		Rocchi	1,45 $\pm$ 0,04	5,27 $\pm$ 0,08
		Levacelle	1,17 $\pm$ 0,04	4,68 $\pm$ 0,00
		Duca di Toscana	2,70 $\pm$ 0,21	6,72 $\pm$ 0,05
<b>Média total</b>			<b>1,62<math>\pm</math>0,52</b>	<b>5,14<math>\pm</math>1,13</b>
<b>Média dos dois compostos</b>			<b>5,64<math>\pm</math>2,70</b>	

Os resultados obtidos apontam para uma grande variabilidade entre os países e dentro de cada país. Na generalidade, os teores em  $\beta$ -caroteno são superiores aos da luteína, excepto nas amostras espanholas onde os valores são inferiores ou muito semelhantes. Parece ser de salientar, no entanto, que o somatório de carotenóides é semelhante nos azeites de origem estrangeira apresentando os azeites portugueses teores mais elevados.

No que se refere à luteína os valores médios mais elevados foram encontrados nas amostras espanholas ( $n=6$ ), com um teor médio de 3,6 mg/kg, seguidos dos azeites portugueses com 2,4 mg/kg ( $n=25$ ), e dos italianos com 1,6 mg/kg. Os teores médios em  $\beta$ -caroteno variaram de forma inversa com as amostras italianas a apresentarem os valores mais elevados (5,1mg/kg) muito semelhantes aos dos azeites portugueses (5,0 mg/kg) e por último os espanhóis com (3,2 mg/kg). A soma dos dois carotenóides apresenta valores médios semelhantes nos azeites portugueses e espanhóis (6,2 e 6,4 mg/kg, respectivamente) e um teor ligeiramente inferior nos azeites italianos (5,6 mg/kg).

Estes resultados estão concordantes com os descritos na literatura, onde os teores de luteína reportados em azeites de origem espanhola (Minguez-Mosquera *et al.*, 1992; Gandul-Rojas *et al.*, 2000) são, na generalidade, superiores aos de azeites italianos (Ranalli *et al.*, 1992; 2000; 2001 e 2005). Cichelli *et al.* (2004) descrevem, no entanto, valores superiores, o que poderá estar relacionado com as diferentes origens dos azeites (diversas regiões de Itália). Por sua vez, a maioria das amostras espanholas usadas nos trabalhos mencionados são da Andaluzia, sendo por isso coincidentes com as amostras analisadas neste trabalho. Os valores aqui apresentados para o  $\beta$ -caroteno são, na sua generalidade, superiores aos reportados por Minguez-Mosquera *et al.* (1992) e Ranalli *et al.* (1992; 2000; 2001 e 2005). Contudo, são inferiores aos obtidos por Guiffrida *et al.* (2007) que utilizaram eram somente azeites da Sicília.

Os teores médios determinados para as amostras portuguesas estão certamente afectados pelo facto de englobarem todas as regiões de denominação de origem protegida existentes, o mesmo não sucedendo com as amostras espanholas e italianas. Itália, segundo informação da Comunidade Europeia (<http://ec.europa.eu/agriculture/qual/pt/pgi11pt.htm>) tem 37 regiões de azeite DOP, embora a quase totalidade das amostras utilizadas neste trabalho pertença à região DOP da Toscana, o que certamente contribui para uma dispersão de resultados inferior. Espanha, também segundo informação da Comunidade Europeia tem 17 regiões de azeite DOP, embora neste

trabalho apenas se encontrem representadas 4 regiões DOP que pertencem à mesma comunidade autónoma espanhola, a Andaluzia, que se localiza no sul de Espanha e engloba 8 regiões DOP de azeite.

Para maior esclarecimento das diferenças indiciadas em cada país procedeu-se a um tratamento estatístico mais aprofundado dos resultados obtidos.

Numa primeira fase pretendeu-se verificar se, individualmente, algum dos compostos em estudo permitiria distinguir os azeites pela origem, tendo para o efeito sido efectuado uma análise da variância (ANOVA) (Dagnelie, 1973; Alves, 2006).

### Luteína

Conforme se pode observar na Tabela 17, utilizando todas as amostras dos diferentes países em conjunto, verifica-se que as diferenças observadas são altamente significativas ( $p < 0,000$ ).

**TABELA 17** – Análise da variância dos teores de luteína por país

Origem da variação	Graus de Liberdade (GL)	Soma dos Quadrados	Quadrados médios	F	Nível de significância (p)
País	2	49,0315	24,51573	26,77954	0,000000
Erro	149	136,4043	0,91546		
Total	151				

As diferenças globais poderão estar relacionadas com a origem geográfica, assim como com as condições ambientais, a variedade, as técnicas utilizadas no processamento e no armazenamento do próprio azeite. Todos estes factores influenciam a composição química do azeite, nomeadamente a cor, uma das características primordiais para a qualidade do azeite virgem. Consequentemente afectam os teores de carotenóides, compostos responsáveis pela cor amarelo esverdeada do azeite (Cichelli *et al.*, 2004). Portugal e Espanha embora constituam a Península Ibérica têm clima e topologia geográfica diferente. Portugal é influenciado pelo Oceano Atlântico, sendo um país de temperaturas mais amenas e com maior índice de pluviosidade; Espanha e Itália são

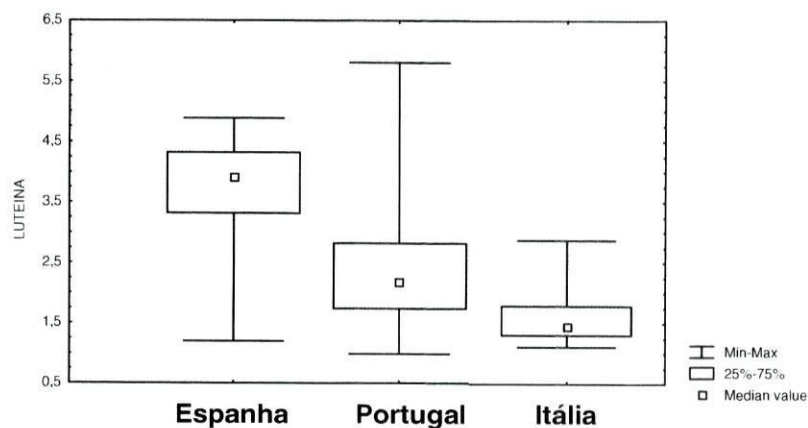
países tipicamente mediterrânicos, onde o clima é seco e existem grandes amplitudes térmicas.

Uma ANOVA apenas indica se, globalmente, existem ou não diferenças significativas entre as amostras analisadas, sem contudo indicar quais as amostras diferentes das restantes. Assim, para compreender melhor as diferenças encontradas, efectuaram-se testes *t* de Student (Dagnelie, 1973; Alves, 2006) aos teores de luteína para cada par de países: Espanha, Itália e Portugal (Tabela 18).

**TABELA 18** – Diferenças detectadas pelo teste de *t* Student nos teores de luteína dos azeites DOP dos países analisados

	<b>t<sub>observado</sub></b>	<b>GL</b>	<b>p</b>
Portugal vs Itália	3,91300	126	0,000148
Portugal vs Espanha	-4,986400	122	0,000002
Espanha vs Itália	8,121125	50	0,000000

Os testes mostraram que os azeites dos diferentes países apresentam teores significativamente diferentes de luteína. Para melhor visualizar estas diferenças, construíram-se diagramas de caixa-e-bigodes (dispersão inter-quartílica) tal como representado na Figura 21.



**FIGURA 21** – Diagramas de caixa e bigode construídos a partir dos teores de luteína dos azeites DOP dos 3 países em estudo

Analisando os teores de luteína das amostras italianas *versus* espanholas, verifica-se que a totalidade dos resultados obtidos para as amostras italianas se enquadra no 1º quartil calculado para as amostras espanholas, isto é, as amostras italianas têm teores de luteína no máximo comparáveis aos 25% das amostras espanholas com teores de luteína mais baixos (Figura 21).

Este facto pode dever-se à localização geográfica das regiões DOP de cada um dos países. A região da Toscana localiza-se na Itália Central onde o clima, apesar de ser referido como mediterrânico, varia um pouco, pois esta região apresenta uma zona costeira com temperaturas são mais amenas e uma zona montanhosa onde as temperaturas são elevadas no Verão e a estação fria é húmida. Por sua vez, as amostras espanholas, apesar de representarem regiões diferentes de uma mesma comunidade, a Andaluzia, localizam-se no sul de Espanha onde o clima é seco. O número de regiões DOP abrangidas por este estudo é também diferente para os dois países, o que contribui certamente para a menor dispersão apresentada nas amostras de Itália.

Da mesma forma, o facto das amostras portuguesas englobarem todas as regiões DOP do território nacional, cobrindo regiões geográficas com condições climáticas e topográficas muito díspares, justifica a dispersão de resultados apresentada.

A origem geográfica e o clima influenciam também o estado de maturação da azeitona quando é colhida. A azeitona é conhecida pela sua cor verde antes da maturação; durante o processo de amadurecimento escurece, adquirindo uma coloração púrpura a preto. À medida que o referido processo vai decorrendo, a actividade fotossintética diminui e as concentrações dos carotenóides também decrescem progressivamente.

No que respeita à luteína, o decréscimo que se verifica pode variar entre os 50 e os 80%, de acordo com um estudo elaborado por Roca e Mínguez-Mosquera (2001) com 5 variedades de azeitonas espanholas em 6 estados de maturação consecutivos.

Criado e seus colaboradores (2007) efectuaram também um estudo em que avaliaram as modificações dos carotenóides, nomeadamente da luteína e do  $\beta$ -caroteno, durante a maturação de azeitonas espanholas e ainda a transformação dos carotenóides nos azeites virgem provenientes de azeitonas em diferentes estados de maturação. Concluíram que os teores de luteína presentes nas azeitonas, em diferentes estados de maturação, vão decrescendo à medida que estas vão adquirindo diferentes tonalidades (*e.g.* azeitonas verdes - 30,3 mg/kg; azeitonas com pontos avermelhados - 10,6 mg/kg; azeitonas pretas - 1,8 mg/kg). No que respeita ao azeite, também se constata uma diminuição nos teores de

luteína (e.g. azeite obtido de azeitonas verdes – 8,1 mg/kg; azeite obtido de azeitonas com pontos avermelhados, 3,1 mg/kg; azeite obtido de azeitonas pretas – 0,5 mg/kg).

### $\beta$ -caroteno

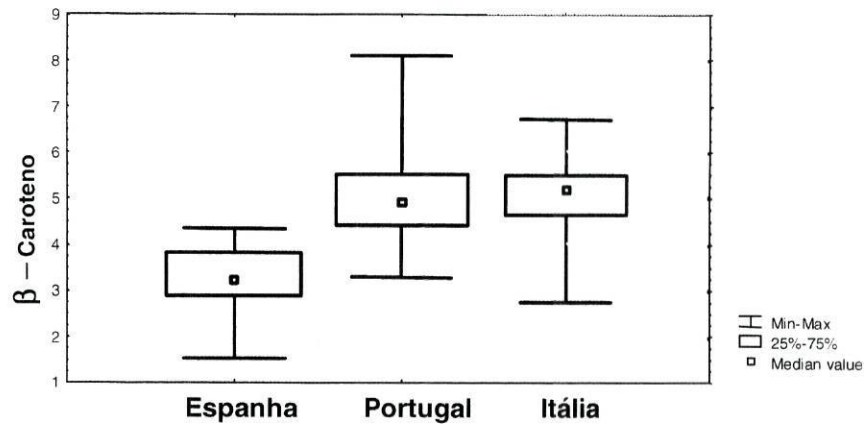
Tal como sucedeu com a luteína efectuou-se a análise da variância (ANOVA), utilizando todas as amostras em estudo (Dagnelie, 1973; Alves, 2006). Verificaram-se diferenças altamente significativas nos teores de  $\beta$ -caroteno (Tabela 19), embora apenas se possa concluir que, pelo menos, um dos países é diferente dos restantes.

**TABELA 19** – Análise da variância dos teores de  $\beta$ -caroteno por país

<b>Origem da variação</b>	<b>GL</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Quadrados médios</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
País	2	69,1193	34,55967	39,66674	0,000000
Erro	149	129,8163	0,87125		
Total	151				

As diferenças que se observam poderão estar relacionadas, tal como já foi referido para a luteína com diferentes factores. Todos eles determinam a composição química do azeite, principalmente no que se refere aos carotenóides.

Quando se analisam os valores de cada país, em detalhe, verifica-se que os teores de  $\beta$ -caroteno das amostras portuguesas e italianas são bastante semelhantes, com medianas relativamente próximas, embora os das amostras portuguesas sejam mais dispersos (ver Figura 22).



**FIGURA 22** – Diagramas de caixa e bigode construídos a partir dos teores de  $\beta$ -caroteno dos azeites DOP dos países em estudo

Analisando as médias dos teores de  $\beta$ -caroteno para as amostras dos diferentes países, através da aplicação do teste t de Student (Dagnelie, 1973; Alves, 2006) (Tabela 20) confirma-se que não existem diferenças significativas entre os teores de  $\beta$ -caroteno das amostras portuguesas e italianas. Verifica-se, no entanto, que ambas possuem teores significativamente mais elevados do que as amostras espanholas. Os gráficos de dispersão inter-quartilica permitem evidenciar estas conclusões.

**TABELA 20** – Diferenças detectadas pelo teste de t Student nos teores de  $\beta$ -caroteno dos azeites DOP dos países analisados

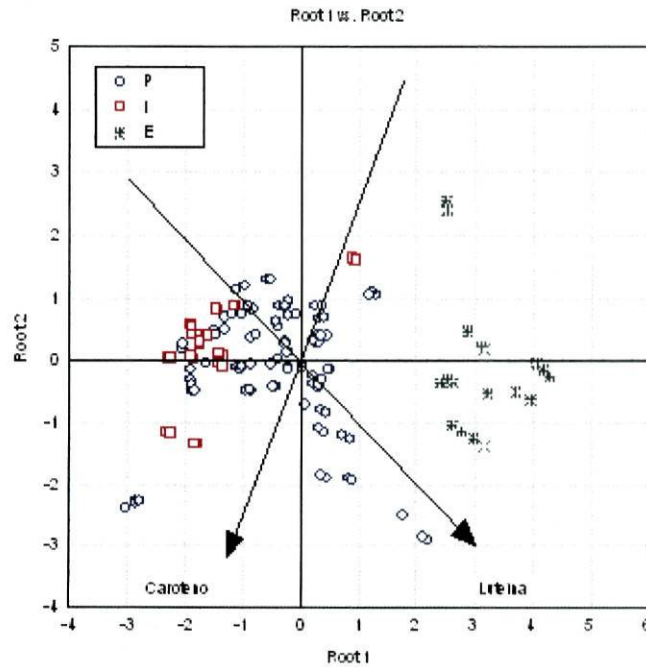
	$t_{\text{observado}}$	GL	p
Portugal vs Itália	-0,628739	126	0,530658
Portugal vs Espanha	8,86949	122	0,000000
Espanha vs Itália	-7,04662	50	0,000000

A ausência de diferenças significativas entre Portugal e Itália poderá explicar-se pelo facto das amostras portuguesas englobarem um maior número de amostras provenientes da região de Trás-os-Montes (n=14), que se situa a norte de Portugal e tem um clima, ao que parece, idêntico ao da região da Toscana em Itália. As diferenças encontradas entre as amostras portuguesas e espanholas poderão dever-se à origem das

amostras espanholas, todas provenientes do sul de Espanha, ao contrário das portuguesas que provêm de diversas regiões, sobretudo da região de Trás-os-Montes. Estas duas regiões da Península Ibérica têm condições climáticas e topologia de solo bastante diferentes.

O mesmo sucede com as amostras espanholas *versus* italianas. A explicação, tal como acontecia com as portuguesas, está relacionada com a localização geográfica, as condições climáticas e a topologia do solo diferentes, as quais condicionam, como já foi referido, o estado de maturação da azeitona. Mencionou-se anteriormente que, à medida que ocorre o processo de maturação, a fotossíntese e as concentrações dos carotenóides decrescem progressivamente. Rocas e Minguez-Mosquera (2001) verificaram que as azeitonas negras apresentam teores de  $\beta$ -caroteno que correspondem a 65% dos teores das azeitonas verdes. As alterações nos teores de  $\beta$ -caroteno das azeitonas, também se vão reflectir a nível dos azeites virgens. Tal como com a luteína, Criado *et al.* (2007) constataram também que os teores de  $\beta$ -caroteno diminuía à medida que o processo de maturação avançava (*e.g.* azeitonas verdes - 11,1 mg/kg; azeitonas com pontos avermelhados - 3,8 mg/kg; azeitonas pretas - 0,8 mg/kg). Os azeites virgem provenientes das referidas azeitonas também apresentavam uma diminuição nos teores de  $\beta$ -caroteno (*e.g.* azeite obtido de azeitonas verdes - 4,2 mg/kg; azeite obtido de azeitonas com pontos avermelhados - 1,0 mg/kg; azeite obtido de azeitonas pretas - 0,3 mg/kg).

Nos resultados verificaram-se diferenças significativas nos teores de luteína, e em parte nos teores de  $\beta$ -caroteno, mas também se verificaram dispersões, de algum modo elevadas, nos grupos que representam alguns países. Para entender a forma como os teores de  $\beta$ -caroteno e luteína variaram entre si e como poderão ser usados em conjunto para uma melhor distinção entre países, realizou-se uma análise de variáveis canónicas (Figura 23) (Mardia, 1979; Alves, 2006). A análise de variáveis canónicas consiste em encontrar a configuração que melhor permite separar os 3 grupos considerados (azeites dos 3 países), mantendo a dispersão observada dentro de cada país. Permite assim uma visualização de conjunto, e mais realista, de todos os dados disponíveis.



**FIGURA 23** – Gráfico do plano das variáveis canônicas 1 vs 2, mostrando a posição dos azeites analisados em relação a esse plano e também a localização aproximada da luteína e do  $\beta$ -caroteno no mesmo plano

As amostras espanholas são nitidamente diferentes das restantes, devido aos teores em luteína e em  $\beta$ -caroteno. Tal como já foi referido anteriormente são amostras que maioritariamente apresentam teores de luteína superiores e de  $\beta$ -caroteno inferiores.

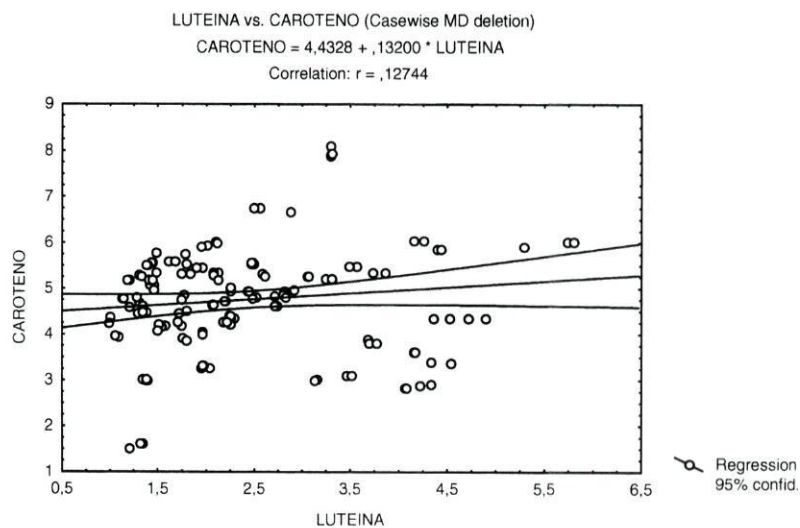
Existe uma sobreposição entre as amostras italianas e parte das portuguesas, com teores de  $\beta$ -caroteno superiores e inferiores de luteína. Grande parte das amostras portuguesas é distinta das italianas, com valores similares de  $\beta$ -caroteno mas superiores em luteína. Este facto, tal como já mencionado anteriormente, será devido às regiões de denominação de origem protegida envolvidas.

A região de Trás-os-Montes, com solo montanhoso e temperaturas extremas é semelhante às condições de Itália, também montanhosa. Por sua vez, o Alentejo é uma região onde predominam as planícies, com temperaturas bastante elevadas no Verão e um índice de pluviosidade que se assemelha ao clima do Sul de Espanha, idêntico à Andaluzia.

### Luteína versus $\beta$ -caroteno

A luteína e o  $\beta$ -caroteno derivam de um mesmo precursor - o licopeno (ver figura 1) – que, ao sofrer ciclização, origina dois compostos:  $\gamma$ -caroteno e  $\delta$ -caroteno. O  $\gamma$ -caroteno sofre nova ciclização e origina o  $\beta$ -caroteno. Este é um precursor intermediário da violaxantina e neoxantina, que se formam por reacções de hidroxilação e epoxidação. Por sua vez, a luteína resulta de hidroxilações sofridas pelo  $\delta$ -caroteno. Pelo facto destes compostos terem um precursor em comum, torna-se interessante verificar se os teores de ambos os compostos estão correlacionados.

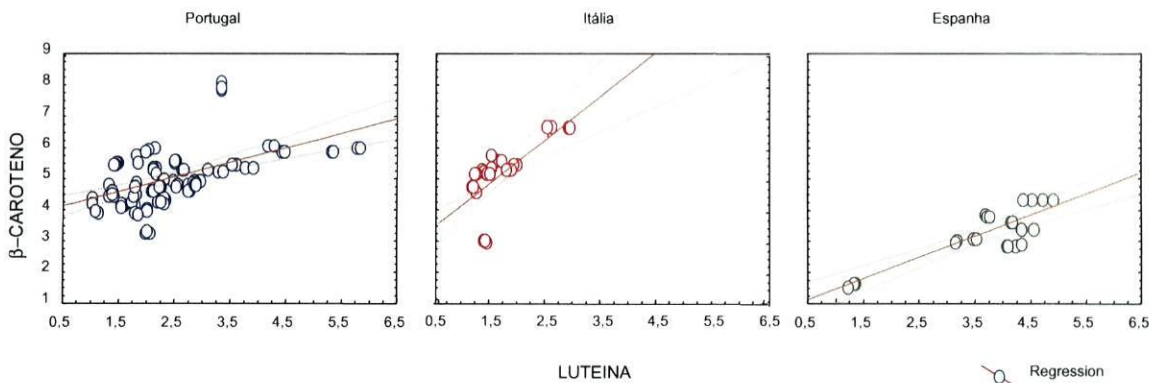
Considerando todas as amostras disponíveis, sem a definição de agrupamentos por países, verificou-se a inexistência de correlação entre os teores de luteína e de  $\beta$ -caroteno, pois o coeficiente de regressão foi igual a 0,13 (Figura 24).



**FIGURA 24** – Correlação entre os teores de luteína e  $\beta$ -caroteno para todas as amostras em análise

Analisando o que sucede em cada país, constatou-se que em Espanha, há uma correlação entre os teores de luteína e os de  $\beta$ -caroteno ( $r = 0,866$ ), embora este valor esteja um pouco exagerado devido à presença de uma amostra que revelou ser muito diferente das restantes.

Nas amostras italianas verificou-se ainda uma ligeira correlação entre os teores dos referidos compostos ( $r = 0,663$ ). Nas amostras portuguesas não é possível afirmar a existência de uma correlação ( $r=0,519$ ) entre os teores destes dois compostos (Figura 25).



**FIGURA 25** – Correlação entre os teores de luteína e  $\beta$ -caroteno nas amostras de Portugal, Itália, Espanha

### Regiões DOP

As amostras espanholas e italianas utilizadas neste trabalho não são representativas das várias regiões de denominação de origem protegida de cada país. Tal facto deve-se essencialmente à grande dificuldade na sua obtenção. A sua inclusão decerto engrandeceria muito este trabalho.

No caso dos azeites portugueses, o mercado disponibiliza amostras das diferentes regiões de Denominação de Origem Protegida (DOP). Mesmo assim foi difícil encontrar azeites de algumas regiões, dado que a maior cota de mercado parece englobar os azeites Transmontanos e os de Moura. Assim, analisaram-se amostras de: Trás-os-Montes ( $n = 14$ ), Moura ( $n = 5$ ), Beira Interior (Beira Alta e Beira Baixa;  $n = 2$ ), Norte Alentejano ( $n = 2$ ) e Ribatejo ( $n = 2$ ). A proximidade geográfica da região de Trás-os-Montes, com uma vasta produção de azeite disponível no mercado da Região Norte fez com que o número de amostras desta região fosse elevado relativamente ao total das amostras. As restantes amostras englobam as comercialmente mais importantes. Os valores médios e as variações expressas em termos do desvio padrão, por região encontram-se detalhados na Tabela 21. Na generalidade, os valores de luteína mantêm-se constantes, mas os teores de  $\beta$ -caroteno, sempre superiores, apresentam alguma variação, com valores inferiores nas amostras da Beira Interior.

**TABELA 21** – Teores médios de luteína e  $\beta$ -caroteno dos azeites de regiões DOP portuguesas

Regiões DOP	Teores médios $\pm$ sd (mg/kg)	
	Luteína	$\beta$ -Caroteno
Trás-os-Montes (n= 14)	2,32 $\pm$ 1,23	5,16 $\pm$ 1,03
Beira Interior (n=2)	2,11 $\pm$ 0,15	3,84 $\pm$ 0,57
Ribatejo (n=2)	2,29 $\pm$ 0,94	5,39 $\pm$ 0,16
Norte Alentejano (n=2)	2,65 $\pm$ 0,20	5,24 $\pm$ 0,35
Moura (n=5)	2,64 $\pm$ 0,58	4,84 $\pm$ 0,42

Uma análise de variância (Dagnelie, 1973; Alves, 2006) mostrou que as diferenças nos teores de luteína entre os azeites das diferentes regiões portuguesas não eram significativas; contudo existiam diferenças significativas no que diz respeito aos teores de  $\beta$ -caroteno. Assim, na sequência destas conclusões, efectuaram-se testes t de Student (Dagnelie, 1973; Alves, 2006) comparando todas as regiões aos pares. Os resultados obtidos mostram-se na Tabela 22.

A região da Beira Interior é uma zona de vales e montanhas, onde os cursos de água são escassos e a permeabilidade do solo é fraca. Trata-se de uma região com grandes amplitudes térmicas tal como Trás-os-Montes. As variedades de azeitona permitidas nesta região são a Galega (essencialmente), Bical e Cordovil (em pouca quantidade). No caso dos azeites analisados, a variedade Cordovil é designada Cordovil de Castelo Branco.

O Ribatejo é uma região que se localiza na zona centro do país “encravada” entre a cordilheira central e as longas planícies alentejanas e encontra-se dividido em três sub-regiões segundo uma perspectiva geomorfológica: Ribatejo-Norte (Bairro), Ribatejo Sul (Charneca) e Lezíria. É na região do Ribatejo Norte, onde o solo apresenta características argilo-arenosas ou argilo-calcárias que se produz azeite. As variedades que se podem encontrar são: Galega, Cobrançosa, Arbequina, Picual, Blanqueta e Lentrisca. A maioria dos azeites DOP desta região tem na sua constituição 95% de galega, sendo os restantes 5% constituídos pelas outras variedades. Nos azeites analisados e de acordo com os

rótulos, a Quinta do Juncal possui apenas Galega e Cobrançosa, já a Quinta da Rainha é um azeite DOP monovarietal de Lentrisca.

**TABELA 22 – Teste t Student aplicado às diferentes regiões DOP portuguesas**

		<b>Trás-os-Montes</b>	<b>Norte Alentejano</b>	<b>Moura</b>	<b>Beira Interior</b>
<b>Norte Alentejano</b>	$t_{\text{observado}}$	0,197928			
	<b>GL</b>	62			
	$p$	0,84379			
<b>Moura</b>	$t_{\text{observado}}$	-1,336354	- 2,325611		
	<b>GL</b>	74	26		
	$p$	0,185528	0,028108		
<b>Beira Interior</b>	$t_{\text{observado}}$	-3,496508	-5,879233	-5,093636	
	<b>GL</b>	62	14	26	
	$p$	0,000877	0,000040	0,000026	
<b>Ribatejo</b>	$t_{\text{observado}}$	0,614853	1,13731	3,53099	7,39203
	<b>GL</b>	26	14	26	14
	$p$	0,540902	0,274501	0,001568	0,000003

O Alentejo caracteriza-se por grande uniformidade de planícies, com Verões muito quentes e secos e Invernos suaves. Possui duas regiões DOP: Norte Alentejano e Moura com diferentes variedades de azeitonas permitidas. Nos azeites provenientes do Norte Alentejano encontra-se predominantemente a Galega, sendo as restantes Carrasquenha, Redondil, Bical, Blanqueta e Cobrançosa. Por sua vez, os azeites de Moura são obtidos a partir de Galega (maioritariamente), Cordovil, Verdeal e Cobrançosa. Os azeites desta região referem no rótulo a presença de Galega, Verdeal e Cordovil e somente duas incluem também Cobrançosa.

A região de Trás-os-Montes caracteriza-se essencialmente pelas variedades: Verdeal transmontana, Madural, Cobrançosa e Cordovil. Contudo, em alguns azeites desta região em vez de Cordovil e Cobrançosa referiam no rótulo Negrinha.

Os resultados indicam que a região da Beira Interior é a única que se destaca de todas as outras regiões, pois os valores de  $p$  são todos inferiores a 0,05. Este facto pode estar relacionado com as variedades de azeitonas usadas, ou seja a presença de Bical e Cordovil de Castelo Branco, ausentes nas outras regiões DOP.

As diferenças encontradas entre as regiões de Norte Alentejano e Moura, devem-se possivelmente às minoritárias presentes. Como já foi referido os azeites do Norte Alentejano possuem Carrasquenha, Redondil, Bical, Blanqueta e Cobrançosa; os de Moura, Cordovil, Verdeal e Cobrançosa. A presença da variedade Cobrançosa poderá estar na origem da semelhança entre os azeites alentejanos e os de Trás-os-Montes.

A região do Ribatejo também possui a variedade Cobrançosa, factor que contribuirá para a ausência de diferenças com a região de Trás-os-Montes. No entanto, constata-se diferenças entre os azeites do Ribatejo e os azeites de Moura. Essas diferenças poderão ser devido à quantidade de Galega presente, bem como de outras variedades como a Lentrisca, Verdeal e Cordovil.

É importante ressaltar como já foi referido anteriormente, que o número de amostras de azeite analisados para cada região é diferente o que está relacionado com as dificuldades na obtenção de amostras e certamente interfere nos resultados obtidos.

## CONCLUSÃO

A metodologia utilizada neste trabalho para a determinação de  $\beta$ -caroteno e luteína, em azeites virgem-extra, foi adaptada de Minguez-Mosquera *et al.* (2002) de forma a torná-la simples, rápida e fiável, em micro-escala, diminuindo o consumo de reagentes e favorecendo o ambiente. As alterações introduzidas conduziram à validação da metodologia. Esta demonstrou ser precisa, com coeficientes de variação inferiores a 8% para a luteína e  $\beta$ -caroteno, e exacta com taxas de recuperação de 97% para a luteína e 101% para o  $\beta$ -caroteno.

Os resultados das análises dos azeites DOP mostraram grande variabilidade nos teores de  $\beta$ -caroteno e luteína, principalmente entre os países. Os teores encontrados variaram entre 1 e 6 mg/kg para a luteína e de 1 a 8 mg/kg no  $\beta$ -caroteno. As amostras de Portugal e Itália apresentaram os teores de  $\beta$ -caroteno mais elevados, contrariamente às de Espanha que apresentaram os teores de luteína mais elevados.

Discute-se e interpreta-se ao longo do texto as diferenças verificadas à luz das condições edafo-climáticas e da presença das diferentes variedades/cultivares de oliveira constituintes do azeite. O teor médio de carotenóides determinado nos azeites portugueses (6,2 mg/kg) e espanhóis (6,4mg/kg) é superior ao teor médio de carotenóides apresentado pelos azeites italianos (5,7 mg/kg). É de salientar ainda que nas amostras portuguesas o teor de  $\beta$ -caroteno (5,0 mg/kg) é muito superior ao da luteína (2,4 mg/kg), contrariamente ao que sucede nas amostras espanholas em que os teores são muito semelhantes. Esta diferença é sem dúvida uma mais valia dos azeites portugueses DOP, pois o  $\beta$ -caroteno constitui uma importante fonte de reserva de vitamina A.

**BIBLIOGRAFIA**

Alves, M. R. (2006) Qualidade e autenticidade de produtos: Uso da quimiometria no estudo de parâmetros químicos, reológicos e sensoriais, Tese de Doutorado, Faculdade de Farmácia, Porto

Arab, L., Steck-Scott, S., Fleishauer, A. (2002) Lycopene and the lung, *Experimental Biology and Medicine*, 227, 894-899

Baron, J., Cole, B., Mott, L., Haile, R., Gran, M., Church, T., Beck, G., Greenberg, E. (2003) Neoplastic and antineoplastic effects of  $\beta$ -carotene on colorectal adenoma recurrence: results of randomized trial, *Journal of the National Cancer Institute*, 95, 717-722

Beatty, S., Boulton, M., Henson, D., Koh, H-H., Murray, I. (1999), Macular pigment and age related macular degeneration, *British Journal of Ophthalmology*, 83, pp 867-877

Belitz, H.D., Grosch, W. Shieberle, P. (2004) *Food Chemistry*, 3ª Edição, Springer-Verlag, Alemanha

Bendich, A. (1993) Symposium: Antioxidants, Immune Response, and Animal Function – Physiological Role of Antioxidants in the Immune System, *Journal Dairy Science* 76, 2789-2794

Beta Carotene Cancer Prevention Study Group The Alpha-Tocopherol (1994), The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers, *The New England Journal of Medicine*, 330, 1029-1035

Borek, C. (2004) Dietary Antioxidants and Human Cancer, *Integrative Cancer Therapies*, 3, 333-341

Britton, G., Liaasen-Jesen, J. and Pfander, H. (1995a) *Carotenoids Vol. 1A: Isolation and Analysis*, Birkäuser, Basel, Boston

Britton, G., Liaasen-Jesen, J. and Pfander, H. (1995b) *Carotenoids Vol. 3: Biosynthesis and metabolism*, Birkäuser, Basel, Boston

Capelo, M.A.C.G (2001) Evolução de alguns parâmetros químicos durante a maturação de azeitonas das cultivares cobrançosa, madural e verdeal transmontana, Tese de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Porto

Cichelli, A., Pertesana, G. (2004) High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oil: chemometric approach to variety classification, *Journal of Chromatography A*, 1046, 141-146

- Cohen, J., Kristal, A., Stanford, J. (2000) Fruit and Vegetables Intakes and Prostate Cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 61-68
- Craft, N., Soares, J. (1992) Relative Solubility and Absorvity of Lutein and  $\beta$ -Carotene in Organic Solvents, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 431-434
- Criado, M., Moltiva, M., Groñi, M., Romero, M. (2007) Comparative study of the effect of the maturation process on the chlorophyll and carotenoid fractions of drupes and virgin olive oils from *Arbequina* and *Farga* cultivars, *Food Chemistry*, 100, 748-755
- Cunha, S., Casal, S., Oliveira, M.B. (2005) Triacylglycerol profile by HPLC/ESLD as a discrimant parameter of varietal olive oils in Portugal, *Italian Journal of Food Science*, 17, 447-454
- Cunha, S., Oliveira, M.B. (2006) Discrimination of vegetables oils by triacylglycerols evaluation of profile using HPLC/ELSD, *Food Chemistry*, 95, 518-524
- Dagnelie, P. (1973) *Estatística, teoria e métodos*, Vol I e II., Edições Europa-América
- Decreto-Lei nº 193/2000, 18 de Agosto, Corantes na alimentação, I SÉRIE-A – Diário da República
- Decreto-Lei nº 16/2004, 14 de Janeiro, Normas de comercialização do azeite, I SÉRIE-A – Diário da Republica
- Faulks, R.M., Southon, S. (2001) Carotenoids, metabolism and disease. In *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*, United States: CRC Press, Chapter 9
- Feltl, L., Pácakova, V., Stulik, K., Volka, K. (2005) Realiability of Carotenoid Anayses: A Review, *Current Analytical Chemistry*, 1, 93-102
- Gandul-Rojas, B., Roca, M., Minguez-Mosquera, M. I. (2000) Use of chlorophyll and carotenoids pigment composition to determine authenticity of virgin olive oil, *Journal American of Oil Chemical Society*, 77, 853-858
- Garcia, E., Luh, B., Martin, M. (2005) Olives. In D.M. Barrett, L.P.Somogyi, H. Ramaswamy, *Processing Fruits Science and Technology*, 2<sup>nd</sup> Edition, CRC Press, Florida, EUA.
- Giovacchino, L., Sestili, S., Di Vincenzo, D. (2002) Influence of olive processing on virgin oilve oil quality, *European Journal of Lipid Science Technolgy*, 104, 587 - 601
- Giuffrida, D., Salvo, F., Salvo, A., La Pêra, L., Dugo, G. (2007) Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from sicilian olive varities, *Food Chemistry*, 101, 833-837
- Grievink, L., Frouwkje, G., Evert, G., Frans, J. (2000) Serum carotenoids,  $\alpha$ -tocopherol, and lung function among ducth elderly, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medical*, 161, 790-795
- Gussow, J. (1995) Mediterranean diets: are they environmentally responsible? *American Journal of Clinical Nutrition*, 61, 1383S-1389S

Harwood, J., Yaqoob, P. (2002) Nutritional and health aspects of olive oil, *European Journal Lipid Science Technology*, 104, 685-697

Heinrich, U., Garter, C., Wiebusch, M., Eichler, O., Sies, H., Tronnier, H., Stahl, W. (2003) Supplementation with  $\beta$ -carotene or similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV- induced , *Journal of Nutrition*, 133, 98-101

Hennenkens, C., Buring, J., Manson, J., Stamper, M., Rosner, B., Cook, N., Belanger, C., LaMotte, F., Gaziano, J., Ridker, P., Willet, W., Peto, R. (1996) Lack of effects of long-term supplementation with beta-carotene on the incidence and of malignant neoplasm and cardiovascular disease, *The New England Journal of Medicine*, 334, 1145-1149

Jacques, P., Chylack, L., (1991), Epidemiologic evidence of a role for antioxidant vitamins and carotenoids in cataract prevention, *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 352S-355S

Keys, A. (1995) Mediterranean diet and public health, *American Journal of Clinical Nutrition*, 61, 1321S-1323S

Kimura, M., Rodriguez-Amaya, D.B. (2002) A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids, *Food Chemistry*, 78, 389-398

Klipstein-Grobush, K., Geleijnse, J., den Breeijen, J, Boeing, H., Hofman, A., Grobbee, D., Witteman, J. (1999) Dietary antioxidants and risk of myocardial in elderly: the Rotterdam Study, *American Journal of Clinical Nutrition*, 69, 261-266

Kolhmeier, L., Kark, J., Gomez-Gracia, E., Martin, B., Steck, S., Kardinaal, A., Ringstad, J., Thamm, M., Masaev, V., Riemersma, R., Martin-Moreno, J., Huttenen, J., Kok, F. (1997) Lycopene and Myocardial Infarction Risk in the EURAMIC Study, *American Journal of Epidemiology*, 1997, 146, 618-626

Kritchesky, S. (1999),  $\beta$ -Carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease, *Journal of Nutrition*, 129, 5-8

Kromhout, D., Keys, A., Aravanis, C., Fidanza, F., Giampoli, S., Jansen, A., Menotti, A, Nedeljkovic, S., Pekkarinem, M., Simic, B., Toshima, H. (1989) Food consumption patterns in the 1960s in seven countries, *American Journal of Clinical Nutrition*, 49, 889-894

Kushi, L., Lenart, E., Willett, W. (1995) Health implications of Mediterranean diets in light of contemporary knowledge. 2 Meat, wine, fats and oils, *American Journal of Clinical Nutrition*, 61, 1416S-1427S

Lastra, C., Barranco, M., Motilva, V., Herrerias, J. (2001) Mediterranean Diet and health: Biological Importance of Olive Oil, *Current Pharmaceutical Design*, 7, 933-950

Lee, J., Jang, S., Levine, N., Watson, R. (2000), Carotenoid supplementation reduces erythema in human skin after simulated solar radiation exposure, *P.S.E.B.M.*, 223, 170-174

- Lee, J., Schwartz, S. (2005) Analysis of Carotenoids and Chlorophylls in Foods. In S. Ötles, *Methods of Analysis of Food Components and Additives*. Boca Raton : Taylor & Francis Group, Chapter 8, Florida, EUA
- López-Miranda, J., Pérez-Martínez, P., Pérez-Jiménez, F. (2006) Health benefits of monounsaturated fatty acids. In C. Williams, J. Buttriss, *Improving the fat content of foods* Chapter 4, Woodhead Publishing Limited, England
- Lu, Q., Hung, J., Hber, D., Go, V., Reuter, V., Cordon-Cardo, C., Scher, H., Marshall, Zhang, Z. (2001) Inverse associations between plasma lycopene and other carotenoids and prostate cancer, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 10, 749-756
- Mardia, K.V., Kent, J.T., Bibby, J.M. (1979) *Multivariate Analysis*, Academic Press: London
- Marques-Vidal, P., Ravasco, P., Dias, C.M., Caculo, M.E. (2006) Trends of food intake in Portugal, 1987-1999: results from the National Health Surveys: *European Journal of Clinical Nutrition*, em publicação
- Martin, H., Ruck, C., Schmitdt, M., Sell, S., Beutner, S., Mayer, Walsh, R. (1999) Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 71, 2253-2262
- Medeiros, D. (2001) Olive oil and Health benefits. In R.E.C. Wildman, *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*, Chapter 15, United States: CRC Press
- Mendes-Pinto, M., Silva, A., Oliveira, M., Guedes de Pinho, P. (2004) Evaluation of some carotenoids in grapes by reversed and normal-phase liquid chromatography: a qualitative analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3182-3188
- Meydani, S., Wu, D., Santos, M., Hayek, M. (1995) Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence, *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1462S-1476S
- Michaud, D., Feskanich, D., Rimm, E., Golditz, G., Speizer, F, Willett, W., Giovannucci, E. (2000) Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts, *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 990-997
- Minguez-Mosquera, M.I., Rejano-Navarro, L., Gandul-Rojas, B., Sanchez-Gomez, A., Garrido-Fernandez, J. (1990) Color-Pigment Correlation in Virgin Olive Oil, *Journal of the Americans Oil Chemists Society*, 68, 332-336
- Minguez-Mosquera, M. Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, M. (1992) Rapid Method of Quantification of Chlorophylls and Carotenoids on Virgin Olive oil by High Performance Liquid Chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 60-63
- Minguez-Mosquera, M., Hornero-Méndez, D., Pérez-Galvez (2002a). Carotenoids and Provitamin A in Functional Foods. In J. W. Hurst, *Methods of analysis for Functional Foods and Nutraceutical*, Chapter 3, United States: CRC Press

- Minguez-Mosquera, M., Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, L., Jarén-Galán, M (2002b). Chlorophylls. In J. W. Hurst, *Methods for Functional Foods and Nutraceutical*, Chapter 4, United States: CRC Press
- Nestle, M. (1995) Mediterranean diets: historical and research overview, *American Journal of Clinical Nutrition*, 61, 1313S-1320S.
- Oliver, J., Palou, A. (2000) Chromatographic determination of carotenoids in foods, *Journal of Chromatography A*, 881, 543-555
- Omedilla, B., Granado, P., Blanco, P., Vaquero, M. (2003) Lutein, but not  $\alpha$ -tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: A 2-y double blind, placebo controlled pilot study, *Nutrition*, 19, 21-24
- Omenn, G., Goodman, G., Thornquist, M., Balmes, J., Cullen, M., Glass, A., Keogh, J., Meyskens, F., Valanis, B., Williams, J., Branhart, S., Hammar, S. (1996) Effects of combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease, *The New England Journal of Medicine*, 334, 1150-1155
- Osganian, S., Stampfer, M., Rimm, E., Spiegelman, D., Manson, J., Willett, W. (2003) Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women, *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 1390-1399
- Pereira, J., Alves, M., Casal, S., Oliveira M.B. (2004) Effect of Olive Fruit fly infestation on the quality of olive oil from cultivars cobrançosa, madural and verdeal transmontana, *Italian Journal of Food Science*, 3, 16, 355-365
- Psomiadou, E., Tsimidou, M. (2001) Pigments in Greek virgin olive oils: occurrence and levels, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 640-647
- Quirós, A., Costa, H. (2006) Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 97-111
- Ranalli, A. (1992) Carotenoids in virgin olive oils - effects of technology, *Italian Journal of Food*, 1, 53-57
- Ranalli, A., Modesti, G., Patumi, M., Fontanazza, G. (2000) The compositional quality and sensory properties of virgin olive oil from a new olive cultivar – I-77, *Food Chemistry*, 69, 37-46
- Ranalli, A., Cabras, P., Iannucci, E., Contento, S. (2001) Lipochromes, vitamins, aromas and other components of virgins olive oil are affected by processing technology, *Food Chemistry*, 73, 445-451
- Ranalli, A., Malfati, A., Lucera, L., Contento, E., Sotiriou, E. (2005) Effects of processing techniques on natural colorings and the other functional constituents in virgin olive oil, *Food Research International*, 38, 873-878

Rao, A. (2002) Lycopene, tomatoes, and prevention of coronary heart disease, *Experimental Biology of Medicine*, 227, 908-913

Regulamento (CE) nº 1107/96 da Comissão de 12 de Junho de 1996 – Jornal Oficial das Comunidades Europeias, nº148, 21 de Junho 1996, 1-9

Regulamento (CE) nº 392/2004 da Conselho de 24 de Fevereiro de 2004 – Jornal Oficial da União Europeia, nº165, 3 de Março 2004, 1-3

Roca, M., Minguez-Mosquera, M. I. (2001) Changes in Chloroplast pigments of olive varieties during fruit with ripening, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 832-839

Rodriguez-Amaya D.B. (1997) em Rodriguez-Amaya D.B. (Eds) Preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods, OMNI Research, ILSI Human Institute, Washington DC

Rodriguez-Amaya D.B. (1999) em Rodriguez-Amaya D.B. (Eds) A guide to carotenoids analysis in foods, OMNI Research, ILSI Human Institute, Washington DC

Russel, R. (2002) Beta carotene and lung cancer, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 74, 1461-1467

Schünemann, H., Grant, B., Freudenheim, J., Muti, P., Browne, Drake, J., Klocke, R., Trevisan, M. (2001) The relation of serum levels of antioxidant vitamins C and E, retinol and carotenoids with pulmonary function in the general population, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medical*, 163, 1246-1255

Slattery, M., Benson, J., Curtin, K., Ma, K., Schaeffer, D., Potter, J. (2000) Carotenoids and colon cancer, *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 575-582

Snodderly, M. (1995) Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins, *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1448S-1461S.

Sommerburg, O., Keunen, J., Bird, A., Huijk, J., (1998), Fruits and vegetables that are the sources for lutein and zeaxanthin, *British Journal of Ophtalmology*, 82, 907-910

Stahl, W., Heinrich, U., Jungmann, H., Sies, H, Tronnier, H. (2000), Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans, *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 795-798

Street, D., Comstock, G., Slaked, R., Schüep, W., Klag, J. (1994) Serum Antioxidants and Myocardial Infarction, *Circulation*, 90, 1154-1161

Su, Q., Rowley, K., Balazs, N. (2002) Carotenoids: separation methods applicable to biological samples, *Journal of Chromatography B*, 781, 393-418

Tamimi R., Hankinson, S., Campos H., Spiegelman, D., Zhang, S., Colditz, G., Willett, W., Hunter, D. (2005) Plasma Carotenoids, Retinol, and Tocopherol and Risk of Breast Cancer, *American Journal of Epidemiology*, 161, 153-160

Toniolo, P., Kappel, A., Akhmedkhanov, A., Ferrari, P., Kato, I, Shore, R., Riboli, E. (2001) Serum Carotenoids and Breast Cancer, *American Journal of Epidemiology*, 153, 1142-1147

Trichopoulou, A., Vasilopoulou, E. (2000) Mediterranean diet and longevity, *British Journal of Nutrition*, 84, 205S-209S

Tsao, R., Deng, Z. (2004) Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals, *Journal of Chromatography B*, 812, 85-99

Umegaki, K., Ikegami, S., Inoue, K., Ichikawa, T., Koybayashi, S., Soeno, N., Tomabechi, K. (1994) Beta-carotene prevents x-ray induction of micronuclei in human lymphocytes, *American Journal of Clinical Nutrition*, 59, 409-412

Wahrburg, U., Kratz, M., Cullen, P. (2002) Mediterranean, olive oil health, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 698-705

Willcox, J., Catignani, L., Lazarus, S. (2003) Tomatoes and Cardiovascular diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 1-18

Willett W., Sacks, F., Trichopoulou, A., Drescher, G., Ferro-Luzzi, A., Helsing, E., Trichopoulos, D. (1995) Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating, *American Journal of Clinical Nutrition*, 61, 1402S-1406S

Zhang, S., Hunter, D., Forman, M., Rosner, B., Speizer, F., Colditz, G., Manson, J., Hankinson, S., Willett, W. (1999) Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risks of breast cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 91, 547-556

[http://ec.europa.eu/agriculture/qual/pt/pgi\\_11pt.htm](http://ec.europa.eu/agriculture/qual/pt/pgi_11pt.htm), 2006-11-25

