

U. PORTO



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

**CONTRIBUIÇÃO PARA A CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS
FOLHAS E SEMENTES DE AVELEIRA (*Corylus avellana* L.)
E DE NOGUEIRA (*Juglans regia* L.)**



Joana Andréa Soares Amaral

Joana Andréa Soares Amaral

Licenciada em Ciências Farmacêuticas

CONTRIBUIÇÃO PARA A CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA
DAS FOLHAS E SEMENTES DE AVELEIRA (*Corylus avellana* L.)
E DE NOGUEIRA (*Juglans regia* L.)

| |
|-----------------------|
| FACULDADE DE FARMÁCIA |
| U. P. |
| BIBLIOTECA |
| Data 09/09/2008 |
| Reg. 621 |
| Cota |

FFD

ATA

6921 2x-2



Porto

2005

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

Trabalho realizado nos Serviços de Farmacognosia e de Bromatologia
da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, sob a orientação da

Professora Doutora Rosa Maria Seabra
Professora Catedrática da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

e co-orientação da

Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira
Professora Auxiliar com Agregação da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

A realização deste trabalho foi possível graças ao apoio financeiro do Programa para o
Desenvolvimento Educativo para Portugal (PRODEP III, Medida 5/ Acção 5.3).

Aos meus Pais...
meu porto seguro

Ao meu Irmão

À memória da minha Avó

TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO ÂMBITO DESTA DISSERTAÇÃO:

PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES

Publicações em revistas estrangeiras referenciadas no *Journal Citation Reports* da ISI Web of Knowledge:

1. Amaral, J.S.; Casal, S.; Pereira, J.A.; Seabra, R.M.; Oliveira, B.P.P. Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, 7698-7702.
2. Amaral, J.S.; Seabra, R.M.; Andrade, P.B.; Valentão, P.; Pereira, J.A.; Ferreres, F. Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves, *Food Chemistry*, 2004, 88, 373-379.
3. Amaral, J.S.; Cunha, S.C.; Alves, M.R.; Pereira, J.A.; Seabra, R.M.; Oliveira, B.P.P. Triacylglycerols composition of walnut (*Juglans regia* L.) cultivars: characterization by HPLC/ELSD and Chemometrics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 7964-7969.
4. Amaral, J.S.; Ferreres, F.; Andrade, P.B.; Valentão, P.; Pinheiro, C.; Santos, A.; Seabra, R.M. Phenolic profile of hazelnut (*Corylus avellana* L.) leaves cultivars, *Natural Product Research*, 2005, 19 (2), 157-163.
5. Amaral, J.S.; Casal, S.; Seabra, R.M.; Oliveira, B.P.P. Development and Evaluation of a Normal Phase Liquid Chromatographic Method for the Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Walnuts, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 2005, 28 (5), 785-795.
6. Amaral, J.S.; Alves, R.M.; Seabra, R.M.; Oliveira, B.P.P. Vitamin E composition of walnuts (*Juglans regia* L.): A 3-year comparative study of different cultivars, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 5467-5472.
7. Amaral, J.S.; Casal, S.; Torres, D.; Seabra, R.M.; Oliveira, B.P.P. Simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in hazelnuts by a normal phase liquid chromatographic method, *Analytical Sciences*, 2005, 21, 1545-1548.

8. Amaral, J.S.; Casal, S.; Citová, I.; Santos, A.; Seabra, R.M.; Oliveira, B.P.P. Characterization of several Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Cultivars based in Chemical, Fatty Acid and Sterol Composition, *European Food Research and Technology*, 2006, 222, 274-280.
9. Amaral, J.S.; Cunha, S.C.; Santos, A.; Alves, M.R.; Seabra, R.M.; Oliveira, B.P.P. Influence of cultivar and environmental conditions on the triacylglycerol profile of hazelnut (*Corylus avellana* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 449-456.
10. Amaral, J.S.; Casal, S.; Seabra, R.M.; Oliveira, B.P.P. Effects of roasting on hazelnut lipids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 1315-1321.
11. Amaral, J.S.; Casal, S.; Alves, M.R.; Seabra, R.M.; Oliveira, B.P.P. Tocopherols and tocotrienols content of hazelnut cultivars grown in Portugal, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 1329-1336.
12. Amaral, J.S.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Martins, R.C.; Seabra, R.M. Variance on the phenolic profile of walnut leaves, *Fitoterapia*, submetido para publicação.
13. Amaral, J.S.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Martins, R.C.; Seabra, R.M. Study of the influence of several factors (cultivar, geographical origin and date of collection) on the phenolic composition of hazelnut leaves: a 3-year study. Em elaboração.

Comunicações:

1. Amaral, J.; Casal, S.; Pereira, J.A.; Seabra, R.; Oliveira, M.B.P.P. Avaliação nutricional e composição em ácidos gordos de 6 variedades de nozes, sementes de *Juglans regia* L., cultivadas em Trás-os-Montes. Comunicação oral, 6º Encontro de Química dos Alimentos, Lisboa, 22-25 Junho, 2003.
2. Amaral, J.; Ferreres, F.; Santos, A.; Pinheiro, C.; Andrade, P.; Seabra, R. Analysis of phenolic compounds from hazelnut (*Corylus avellana* L.) leaves. Poster, 1st International Conference on Polyphenols and Health, Vichy, France, 18-21th of November, 2003.
3. Amaral, J.S.; Casal, S.; Citová, I.; Seabra, R.M.; Oliveira, B.P.P. Chemical composition, fatty acid and sterol contents of nuts grown in Portugal. Poster, 3º Encontro REQUIMTE, Fátima, 9-10 Janeiro, 2004.

4. Amaral, J.S.; Citóva, I.; Casal, S. ; Santos, A.; Seabra, R.; Oliveira, B.P.P. Nutritional value and fatty acid composition of Hazelnut varieties harvested in Portugal. Poster, 6th International Congress on Hazelnut, Tarragona, Spain, 14-18th June of 2004.
5. Amaral, J.S.; Citóva, I.; Mendes, E.; Assunção, A.; Seabra, R.; Oliveira, M.B.P.P. Sterol composition of hazelnuts from different Portuguese cultivars. Poster, Euronalysis XIII Conference, Salamanca, Spain, 5-10th of September, 2004.
6. Amaral, J.S.; Casal, S.; Oliveira, B.P.P.; Seabra, R.M. Determinação da Vitamina E em avelãs: optimização e validação do método analítico. Poster, 7º Encontro de Química dos Alimentos, Viseu, 13-16 Abril, 2005.
7. Amaral, J.S.; Cunha, S.C.; Neves, N.; Oliveira, B.P.P.; Seabra, R.M. Determinação do perfil de triacilgliceróis em nozes. Poster, 7º Encontro de Química dos Alimentos, Viseu, 13-16 Abril, 2005.
8. Amaral, J.S.; Seabra, R.M.; Oliveira, M.B.P.P. Tocopherols and tocotrienols composition of hazelnuts. Poster, EFFoST 2005 Conference, Valencia, Spain, 25–28th October, 2005.
9. Amaral, J.S.; Casal, S.; Seabra, R.M.; Oliveira, M.B.P.P. Composition of walnuts lipid fraction: A 3-year study of different cultivars. Comunicação oral, 231st ACS National Meeting, Atlanta, USA, 26-30th March, 2006.

Neste trabalho foram estudadas as folhas e as sementes de duas espécies: *Corylus avellana* L. (aveleira) e *Juglans regia* L. (nogueira). O trabalho teve por objectivo valorizar e melhor caracterizar estas espécies produzidas em território nacional: as sementes (tradicionalmente designadas como frutos secos) porque são largamente consumidas a nível mundial e representam uma fonte de recursos económicos para as regiões onde são produzidas; as folhas, uma vez que são usadas em medicina tradicional.

Na fracção lipídica das sementes foi avaliada a composição em ácidos gordos (AG), triacilgliceróis (TAG), fitosteróis, tocoferóis e tocotrienóis. Os perfis de AG e de fitosteróis foram determinados por GC/FID permitindo identificar e quantificar 15 AG e 9 fitosteróis na avelã, e 18 AG e 9 fitosteróis na noz. O perfil de TAG foi analisado por HPLC/ELSD tendo sido quantificados 11 TAG na avelã e 9 na noz. O perfil de tocoferóis e de tocotrienóis foi avaliado por HPLC/DAD/FL, tendo sido desenvolvidas metodologias analíticas específicas, de forma a permitir a quantificação simultânea de todos os isómeros. Na avelã foram identificados e quantificados 4 tocoferóis e 3 tocotrienóis, e na noz 4 tocoferóis e 1 tocotrienol.

As folhas de aveleira e de noqueira foram caracterizadas no que diz respeito ao perfil em compostos fenólicos. A identificação dos compostos foi feita por uma técnica de Ion Trap HPLC/DAD/ESI-MS/MS e a respectiva quantificação, nas várias amostras, por feita por HPLC/DAD. Na folha de aveleira foram identificados 4 ácidos fenólicos e 7 flavonóides (dois dos quais apenas parcialmente identificados) enquanto que a de noqueira apresentou um perfil constituído por 3 ácidos fenólicos e 6 flavonóides. No primeiro ano de estudos procedeu-se à recolha mensal de amostras (entre Maio/Setembro) provenientes de cultivares seleccionadas de ambas as espécies, visando avaliar a variação dos teores em compostos fenólicos e definir qual o período correspondente a teores superiores dos referidos compostos.

Parece ser já facto incontroverso que numerosos factores, incluindo diferenças genéticas, localização geográfica, factores climáticos e práticas agrícolas, podem afectar a composição química das plantas. Por esta razão, o estudo efectuado incluiu amostras de diferentes cultivares, obtidas durante três anos consecutivos e provenientes de diferentes localizações geográficas. Relativamente à aveleira foram estudadas dezanove cultivares, num total de 79 amostras de frutos secos e 93 amostras de folhas. Relativamente à noqueira foram estudadas nove cultivares, num total de 26 amostras de frutos secos e 34 amostras de folhas. Para cada grupo de compostos, os dados obtidos foram submetidos a análise estatística multivariada de forma a avaliar a influência destes factores na composição química das amostras.

Por último, atendendo a que as avelãs são frequentemente consumidas após torrefacção, comparou-se a composição em AG (incluindo os AG *trans*), TAG, fitosteróis, tocoferóis e tocotrienóis de amostras de avelãs cruas com a de amostras submetidas a diferentes intensidades de torra. Esta fase do trabalho teve por objectivo avaliar a influência do processamento térmico no valor nutricional da fracção lipídica das avelãs.

ABSTRACT

This work concerned the study of the leaves and seeds of two species produced in Portugal: *Corylus avellana* L. (hazelnut) and *Juglans regia* L. (walnut). The seeds, usually known as nuts, were studied because they are largely consumed and, in Portugal, they represent a source of economic resources in the regions where they grow; the leaves, because they are used in traditional medicine with several aims.

The fatty acid (FA), triacylglycerol, (TAG), phytosterol, tocopherol and tocotrienol compositions of the seeds lipidic fraction were evaluated. The FA and phytosterols profiles were determined by GC/FID, allowing the identification and quantification of 15 FA and 9 phytosterols in the hazelnut, and 18 FA and 9 phytosterols in the walnut. The TAG profile was analyzed by HPLC/ELSD, allowing the quantification of 11 TAG in hazelnut and 9 in the walnut. The tocopherol and tocotrienol profile was evaluated by HPLC/DAD/FL. Specific analytical methodologies were developed allowing the simultaneous quantification of all vitamers. 4 Tocopherols and 3 tocotrienols were identified and quantified in the hazelnut, whereas 4 tocopherols and 1 tocotrienol were present in the walnut.

The leaves of both species were characterized in terms of its phenolic profile. The identification of the compounds was performed by an Ion Trap HPLC/DAD/ESI-MS/MS technique and its quantification, in the several studied samples, was performed by HPLC/DAD. This technique allowed the identification of 4 phenolic acids and 7 flavonoids (two of which only partially identified) in the hazelnut leaf, whereas the walnut leaf presented a profile consisting of 3 phenolic acids and 6 flavonoids. During the first year of studies, samples of both species from selected cultivars were monthly collected (between May/September) in order to evaluate the variations of the phenolic composition and to establish the period that correspond to higher phenolic contents.

It is already well known that several factors, including genetic differences, geographical origin, climatic factors and agricultural practices, can affect the chemical composition of plants.

For this reason, samples of different cultivars, collected along three consecutive year crops, from different geographical origins, were included in this study.

In the hazelnut evaluation, 19 cultivars, in a total of 79 samples of nuts and 93 samples of leaves, were studied. Relatively to the walnut, the study included 9 cultivars, in a total of 26 nut samples and 34 leaf samples. For each group of compounds, the obtained data was submitted to multivariate statistical analysis in order to evaluate the influence of these factors in the chemical composition of the samples.

Finally, having in mind that hazelnuts are frequently consumed roasted, the FA (including *trans* FA), TAG, phytosterol, tocopherol and tocotrienol composition of raw hazelnuts and samples submitted to different roast intensities were compared. This part of the work was carried out in order to evaluate the thermal processing influence in the nutritional value of the lipidic fraction of hazelnuts.

L'objectif de ce travail était de contribuer à une meilleure connaissance des graines et des feuilles de deux espèces produites dans le territoire national: *Corylus avellana* L. (le noisetier) et *Junglans regia* L. (le noyer). Les graines, dans ce cas traditionnellement désignées comme fruits secs, parce elles sont largement consommées au niveau mondial et représente une source de ressources économiques pour les populations portugaises de plusieurs régions et les feuilles puisqu'elles sont utilisées dans la médecine traditionnelle.

Dans la fraction lipidique des graines, nous avons évalué la composition en acides gras (AG), triacylglycérols (TAG), phytostérols, tocophérols et tocotriénols. Les profils en AG et en phytostérols ont été déterminés par GC/FID, permettant l'identification et la quantification de 15 AG et de 9 phytostérols dans la noisette, et de 18 AG et de 9 phytostérols dans la noix. Le profil en TAG a été analysé par HPLC/ELSD; cette technique a permis l'identification de 11 TAG dans la noisette et 9 dans la noix. Pour la détermination du profil en tocophérols et tocotriénols il a été nécessaire de développer des méthodologies analytiques spécifiques par HPLC/DAD/FL qui ont permis la quantification simultanée de tous les isomères. Dans les noisettes, nous avons identifié et quantifié 4 tocophérols et 3 tocotriénols et, dans les noix, 4 tocophérols et 1 tocotriénol.

Les feuilles de noisetier et de noyer ont été caractérisées en ce qui concerne le profil en composés phénoliques. L'identification des composés a été faite par une technique de Ion Trap HPLC/DAD/ESI-MS/MS et leur respective quantification a été faite par HPLC/DAD. Dans les feuilles de noisetier, nous avons identifié 4 acides phénoliques et 7 flavonoïdes (deux d'entre eux ont été partiellement identifiés) alors que le noyer a présenté un profil constitué par 3 acides phénoliques et 6 flavonoïdes. Pour les deux espèces, dans la première année de travail, nous avons procédé à la récolte mensuelle d'échantillons (entre les mois de Mai et de Septembre) qui provenaient de cultivars sélectionnées; cet étude visait à évaluer la variation des teneurs en composés phénoliques et à définir quelle était la période correspondante aux teneurs supérieures des composés référés.

Il paraît être déjà un fait incontesté que de nombreux facteurs, incluant les différences génétiques, la localisation géographique, les facteurs climatiques et les pratiques agricoles, peuvent affecter la composition chimique des plantes. Pour cette raison, l'étude effectuée a inclus des échantillons de différentes cultivars, obtenus pendant trois ans consécutifs et provenant de différentes localisations géographiques.

En ce qui concerne le noisetier, nous avons étudié 19 cultivars dans un total de 79 échantillons de noisettes et 93 échantillons de feuilles. Pour le noyer, nous avons étudié 9 cultivars, dans un total de 26 échantillons de fruits secs et de 34 échantillons de feuilles. Pour chaque groupe de composés, les données obtenues ont été soumises à une analyse multivariée de forme à évaluer l'influence de ces facteurs dans la composition chimique des échantillons.

Finalement, et étant donné que les noisettes sont fréquemment consommées après la torréfaction, nous avons comparé la composition de AG (incluant les AG *trans*), TAG, phytostérols, tocophérols et tocotriénols d'échantillons de noisettes crues avec des échantillons soumis à de différentes intensités de torréfaction. Cette phase de travail a eu pour objectif évaluer l'influence du processus thermique dans la valeur nutritionnelle de la fraction lipidique des noisettes.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Rosa Seabra, manifesto o meu mais sincero reconhecimento por toda a ajuda, apoio e imensa compreensão com que me distinguiu. Queria ainda agradecer-lhe o seu exemplo de competência, tranquilidade, bom senso e espírito de justiça, bem como todos os ensinamentos, especialmente os de cariz pessoal, que me passou ao longo deste trabalho.

À Prof. Doutora Beatriz Oliveira agradeço a sua disponibilidade, empenho, competência e dinamismo incansável que a caracterizam. Queria também manifestar o meu reconhecimento por me ter acolhido no Serviço de Bromatologia e pelo esforço em proporcionar todos os meios e condições necessárias à realização deste trabalho.

À Prof. Doutora Lurdes Bastos, por se ter disponibilizado a aceitar-me no Serviço de Toxicologia da FFUP. Lamento que o tempo disponível não tenha permitido a concretização do trabalho experimental originalmente idealizado para realização neste Serviço.

Ao Instituto Politécnico de Bragança, na pessoa do seu presidente, Prof. Doutor Dionísio Gonçalves, pelo empenho na formação avançada do seu corpo docente.

Uma palavra muito especial à Prof. Doutora Susana Casal, pela amizade, por toda a ajuda concedida quando o equipamento analítico nos exasperava, pelos conselhos úteis e conhecimentos transmitidos.

A todos os colaboradores que trabalham diariamente no Serviço de Bromatologia, pelo ambiente de trabalho acolhedor e pela camaradagem com que fui recebida. Uma palavra especial à Dra. Eulália, pelo carinho e amizade que reservou para esta "filha adoptiva do laboratório". E um obrigada especial à Mestre Sara Cunha pela amizade, colaboração no trabalho, disponibilidade e solidariedade manifestadas.

Aos colaboradores do Serviço de Farmacognosia, agradeço o auxílio e sugestões recebidas na realização deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Federico Ferreres, do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Murcia (Espanha), agradeço a disponibilidade e toda a colaboração prestada, nomeadamente o importante auxílio na identificação de compostos fenólicos por HPLC/DAD/ESI-MS/MS.

Ao Mestre Rui Alves, agradeço a colaboração e auxílio no tratamento estatístico dos dados. Um obrigada sincero pela paciência manifestada e pela boa disposição que o caracteriza.

Ao Doutor Rui Martins, agradeço a colaboração empenhada no tratamento estatístico dos dados, bem como a disponibilidade e simpatia com que o fez.

À aluna de Erasmus, Ivana Citová, pela contribuição nas determinações analíticas, mas sobretudo pela amizade, e à aluna de investigação Cristina Pinheiro, pela contribuição nos estudos fitoquímicos.

Ao Prof. Doutor Alberto Santos (UTAD) e à Sra. Isabel, sua colaboradora, bem como ao Doutor José Alberto Pereira (IPB-ESA), ao Eng. Augusto Assunção (DRAEDM), ao Eng. Óscar Pereira (DRAEDM) e ao Eng. Nuno Neves (DRABL) agradeço as amostras fornecidas. Ao Prof. Doutor Alberto Santos, dirijo ainda uma palavra de apreço pela bibliografia cedida e pelas suas excelentes sugestões. Agradeço igualmente a colaboração da firma Transagri Lda., na pessoa do Eng. José Figueiredo, na cedência de amostras de avelãs cruas e torradas.

A todos aqueles, cujo nome embora não expressamente mencionado, contribuíram, directa ou indirectamente, para a realização deste trabalho.

Às amigas Andrea, Carla, Filipa e Sofia, perdoem por toda a ausência de notícias... obrigada por sempre torcerem por mim.

À Lena...obrigada "miga linda" pela amizade de infância que perdura até hoje, pelos conselhos, pelos desabafos e apoio incondicional.

A toda a minha família que torceu por mim. À minha avó, continuas comigo. Um obrigada especial para além mar, mesmo tão longe não se esquecem dos seus, à tia Cecília pelas orações (e pelos Santos aconselhados!!), à tia Helena e aos primos mais chegados, Marcos, Marcelo e Márcia, pelo carinho que sei terem por mim, e ao tio Florêncio e ao tio Dimas (que de uma forma ou de outra continuam entre nós).

Um obrigada muito especial ao Getúlio, amigo de todas as horas, minutos e segundos!!, por tudo.

Por fim, um obrigada especial aos meus Pais e Irmão pelo constante apoio. Desculpem as ausências e todas as rabugices, embirrices e desabafos que literalmente tiveram que aturar!!

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------------|---|
| AA | Ácido araquidónico |
| ADN | Ácido Desoxirribonucléico |
| ANOVA | Analysis of variance |
| AOAC | American Official of Analytical Chemists |
| CQA | Ácido Cafeoilquínico |
| AG | Ácidos Gordos |
| APCI | Atmospheric Pressure Chemical Ionization |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BHA | Butil-hidroxianisol |
| BHT | Butil-hidroxitolueno |
| CLA | Conjugated Linolei Acid |
| COX | Ciclo-oxigenase |
| cv. | Cultivar |
| CV | Coefficiente de Variação |
| CVA | Canonical Variate Analysis |
| CV ₁ , CV ₂ | Canonical Variate 1, Canonical Variate 2 |
| CZE | Capillary-zone Electrophoresis |
| DA | Discriminant Analysis |
| DAD | Diode Array Detector |
| DCV | Doenças Cardiovasculares |
| DHA | Ácido Docosahexaenóico |
| DRABL | Direcção Regional de Agricultura da Beira Litoral |
| DRAEDM | Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho |
| DRI | Dietary References Intakes |
| ECN | Equivalent Chain Number |
| EIC | Extracted Ion Chromatogram |
| ELSD | Evaporative Light Scattering Detector |
| EPA | Ácido Eicosapentaenóico |
| ESI | Electrospray Ionization |
| FAME | Fatty acid methyl esters |
| FAO | Food and Agriculture Organization |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FID | Flame Ionization Detector |
| FL | Fluorescence Detector |
| F _{obs} | F observado |
| GC | Gas Chromatography |
| GRAS | Generally Recognized as Safe |
| HDL | High Density Lipoprotein |
| HHS | Department of Health and Human Services |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| [M - H] ⁻ | Ião Pseudomolecular |
| i.d. | Internal diameter |
| INE | Instituto Nacional de Estatística de Portugal |
| IOM | Institute of Medicine of the National Academies |
| IPB-ESA | Instituto Politécnico de Bragança – Escola Superior Agrária |
| IPM | Instituto Português de Meteorologia |
| ISO | International Standard Organization |
| IU | International Units |

| | |
|-----------------------|---|
| IUPAC-IUB | International Union of Pure and Applied Chemistry – International Union of Biochemistry |
| L | Ácido linoleico |
| LD | Ligações duplas |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| Ln | Ácido linolénico |
| LOD | Limit of Detection |
| LOQ | Limit of Quantification |
| <i>m/z</i> | Relação massa/carga |
| MALDI-TOF | Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight |
| MANOVA | Multivariate Analysis of Variance |
| MEKC | Micellar Electrokinetic Chromatography |
| MS | Mass Spectrometry |
| MSHFBA | <i>N</i> -metil- <i>N</i> -(trimetilsilil)-heptafluorobutiramida |
| MUFA | Monounsaturated fatty acids |
| NA | Não aquosos |
| NC | Número de Carbonos |
| nd | Não detectado |
| NEC | Non-end-capped |
| NP | Norma Portuguesa |
| NP-HPLC | Normal Phase High Performance Liquid Chromatography |
| nr | Não referido |
| ns | Não significativo |
| O | Ácido oleico |
| OGM | Organismos Geneticamente Modificados |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| <i>p</i> | Probabilidade |
| P | Ácido palmítico |
| PC | Principal component |
| PCA | Principal component analysis |
| p.e. | Ponto de ebulição |
| PI | Padrão interno |
| PN | Partition number |
| PUFA | Polyunsaturated fatty acids |
| <i>r</i> ² | Coefficiente de correlação |
| RDA | Recommended Daily Allowance |
| RI | Refraction index |
| R.O. | Resistência à Oxidação |
| RP-HPLC | Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography |
| Rt | Retention time |
| S | Ácido esteárico |
| SCF | Scientific Committee on Food |
| SD | Standard deviation |
| SFA | Saturated fatty acids |
| <i>sh</i> | Sholder |
| <i>sn</i> | Stereospecific number |
| SPE | Solid-phase extraction |
| T | Tocoferol |
| TAG | Triacilgliceróis |
| TBHQ | <i>Terc</i> -butil-hidroquinona |
| TE | Tocopherol Equivalents |

| | |
|------------------|---|
| TFA | Trifluoroacetic acid |
| TLC | Thin layer chromatography |
| T _{obs} | T observado |
| TTR | Tocotrienol |
| USDA | United States Department of Agriculture |
| UTAD | Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro |
| UV | Ultravioleta |
| UV-Vis | Ultravioleta / Visível |
| v/v | Volume/volume |
| VLDL | Very Low Density Lipoprotein |

Nota: Na lista anterior constam termos em inglês uma vez que a abreviatura usada habitualmente corresponde à designação por extenso em inglês.

| | |
|--|-----------|
| Resumo..... | XI |
| Abstract..... | XII |
| Resumé..... | XIII |
| Agradecimentos..... | XV |
| Abreviaturas..... | XVII |
| Índice..... | XXI |
| | |
| Enquadramento Geral e Objectivos do Trabalho..... | 3 |
| I. Considerações Gerais..... | 3 |
| II. Objectivos..... | 5 |
| III. Organização da Dissertação..... | 8 |
| | |
| PARTE 1 – Folhas de aveleira e de noqueira..... | 9 |
| CAPÍTULO 1 – Perfil Fenólico..... | 11 |
| I– Compostos fenólicos. Considerações teóricas..... | 13 |
| 2. Estrutura química..... | 13 |
| 2.1 Ácidos fenólicos..... | 13 |
| 2.2 Flavonóides..... | 14 |
| 3. Actividade biológica..... | 15 |
| 4. Fontes e consumo..... | 16 |
| 5. Utilização..... | 17 |
| 5.1 Folhas de aveleira e de noqueira e a medicina tradicional..... | 18 |
| 6. Perfil fenólico no controlo de qualidade..... | 19 |
| 7. Metodologias analíticas – breve revisão bibliográfica..... | 19 |
| II – Compostos fenólicos. Parte experimental..... | 21 |
| 1. Amostragem..... | 21 |
| 2. Reagentes e padrões..... | 22 |
| 3. Colunas de extracção em fase sólida (SPE)..... | 22 |
| 4. Extracção dos Compostos Fenólicos..... | 23 |
| 5. Análise Cromatográfica..... | 23 |
| 5.1. Análise qualitativa por Ion Trap HPLC/DAD/ESI-MS/MS..... | 23 |
| 5.2 Análise quantitativa por HPLC/DAD..... | 24 |
| 5.3 Quantificação dos compostos fenólicos..... | 25 |
| 6. Análise estatística..... | 26 |
| 7. Resultados e Discussão..... | 26 |
| 7.1 Aveleira..... | 26 |
| 7.2 Nogueira..... | 48 |
| 8. Conclusões..... | 62 |

| | |
|---|-----|
| PARTE 2 – Sementes de aveleira e de noqueira | 65 |
| CAPÍTULO 2- Introdução Geral | 67 |
| I – Introdução..... | 69 |
| 1. Frutos Secos..... | 69 |
| 2. Aveleira..... | 73 |
| 2.1. Introdução..... | 73 |
| 2.2. Importância económica da aveleira..... | 74 |
| 3. Nogueira..... | 76 |
| 3.1 Introdução..... | 76 |
| 3.2 Importância económica da noqueira..... | 78 |
| II - Estudo da fracção lipídica..... | 79 |
| CAPÍTULO 3 – Perfil em Ácidos Gordos | 81 |
| I – Ácidos Gordos. Considerações Teóricas..... | 83 |
| 1. Introdução..... | 83 |
| 2. Estrutura Química..... | 83 |
| 3. Actividade Biológica..... | 85 |
| 4. Fontes e Consumo..... | 88 |
| 5. Perfil em AG na detecção de adulterações..... | 89 |
| 6. Metodologias Analíticas – Breve Revisão Bibliográfica..... | 90 |
| II – Ácidos Gordos. Parte Experimental..... | 91 |
| 1. Reagentes e padrões..... | 91 |
| 2. Preparação da Amostra..... | 92 |
| 3. Análise Cromatográfica..... | 92 |
| 4. Análise Estatística..... | 93 |
| 5. Resultados e Discussão..... | 93 |
| 5.1. Aveleira..... | 93 |
| 5.2 Nogueira..... | 110 |
| 6. Conclusões..... | 120 |
| CAPÍTULO 4 – Perfil em Triacilgliceróis | 123 |
| I. Triacilgliceróis. Considerações Teóricas..... | 125 |
| 1. Introdução..... | 125 |
| 2. Estrutura química e nomenclatura..... | 126 |
| 3. Metodologias analíticas – breve revisão bibliográfica..... | 127 |
| II – Triacilgliceróis. Parte Experimental..... | 129 |
| 1. Reagentes e padrões..... | 129 |
| 2. Preparação da amostra..... | 129 |
| 3. Análise Cromatográfica..... | 130 |
| 4. Análise estatística..... | 131 |
| 5. Resultados e Discussão..... | 131 |

| | |
|--|------------|
| 5.1 Aveleira | 134 |
| 5.2 Nogueira..... | 145 |
| 6. Conclusões | 152 |
| CAPÍTULO 5 – Perfil em Fitosteróis | 155 |
| I – Fitosteróis. Considerações Teóricas..... | 157 |
| 1. Introdução | 157 |
| 2. Estrutura química..... | 157 |
| 3. Fontes e consumo | 159 |
| 4. Actividade biológica | 160 |
| 4.1 Redução dos níveis de colesterol..... | 160 |
| 4.1.1 Eficácia hipocolesterolémica | 160 |
| 4.1.2 Mecanismo de acção..... | 161 |
| 4.2 Redução do risco de doenças cardiovasculares..... | 163 |
| 4.3 Propriedades anticancerígenas e outros potenciais benéficos..... | 163 |
| 4.4 Efeitos adversos..... | 164 |
| 4.4.1 Absorção de vitaminas lipossolúveis | 164 |
| 4.4.2 Outros possíveis efeitos adversos | 165 |
| 5. Parâmetro na avaliação da Autenticidade..... | 165 |
| 6. Metodologias analíticas – Breve revisão bibliográfica | 166 |
| II – Fitosteróis. Parte Experimental | 167 |
| 1. Reagentes e padrões | 167 |
| 2. Preparação da amostra | 167 |
| 3. Análise Cromatográfica | 167 |
| 4. Análise estatística | 168 |
| 5. Resultados e Discussão | 169 |
| 5. 1. Aveleira | 169 |
| 5. 2. Nogueira..... | 181 |
| 6. Conclusões | 189 |
| CAPÍTULO 6 – Perfil em Tocoferóis e Tocotrienóis..... | 193 |
| I – Tocoferóis e Tocotrienóis. Considerações Teóricas..... | 195 |
| 1. Introdução | 195 |
| 2. Estrutura química..... | 195 |
| 3. Actividade biológica | 197 |
| 3.1 Doenças Cardiovasculares | 198 |
| 3.2 Cancro..... | 198 |
| 3.3 Desordens neurológicas | 199 |
| 4. Fontes e consumo | 200 |
| 5. Parâmetro na avaliação da Autenticidade..... | 201 |
| 6. Metodologias analíticas – Breve revisão bibliográfica | 202 |

| | |
|--|----------------|
| II - Tocoferóis e Tocotrienóis. Parte Experimental..... | 202 |
| 1. Reagentes e substâncias de referência..... | 202 |
| 2. Preparação de soluções..... | 202 |
| 3. Preparação da amostra..... | 203 |
| 4. Análise Cromatográfica..... | 204 |
| 5. Análise estatística..... | 204 |
| 6. Resultados e discussão..... | 205 |
| 6.1 Optimização da análise cromatográfica..... | 205 |
| 6.1.1 Fase móvel e fase estacionária..... | 205 |
| 6.1.2 Padrão interno..... | 206 |
| 6.1.3 Parâmetros do detector..... | 207 |
| 6.2 Processo extractivo..... | 207 |
| 6.2.1 Aveleira..... | 207 |
| 6.2.2 Nogueira..... | 209 |
| 6.3 Validação do método..... | 210 |
| 6.3.1 Aveleira..... | 210 |
| 6.3.2 Nogueira..... | 212 |
| 6.4 Determinação da composição em vitamina E das amostras..... | 214 |
| 6.4.1 Aveleira..... | 214 |
| 6.4.2 Nogueira..... | 225 |
| 7. Conclusões..... | 231 |
| CAPÍTULO 7 – Torra de Avelã..... | 233 |
| I – Torra. Considerações Teóricas..... | 235 |
| II – Torra. Parte Experimental..... | 237 |
| 1. Amostras..... | 237 |
| 2. Reagentes e padrões..... | 237 |
| 3. Preparação da Amostra..... | 238 |
| 4. Análise Cromatográfica..... | 238 |
| 5. Resultados e Discussão..... | 238 |
| 6. Conclusões..... | 249 |
| Conclusões Globais..... | 251 |
| Anexos..... | 257 |
| Dados Climáticos (Bragança)..... | 259 |
| Dados Climáticos (Coimbra)..... | 265 |
| Dados Climáticos (Felgueiras)..... | 271 |
| Dados Climáticos (Vila Real)..... | 275 |
| Bibliografia..... | 281 |

**ENQUADRAMENTO GERAL
E OBJECTIVOS DO TRABALHO**

I. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Tal como os restantes animais, o Homem, para obter os nutrientes de que necessita, consome alimentos. Desde há anos que a composição dos alimentos suscita o interesse de muitos investigadores. Alguns estudos têm por objectivo a sua caracterização, outros têm por intuito a melhoria da qualidade dos produtos, ou ainda, frequentemente avaliar a autenticidade ou a segurança alimentar. Por outro lado, vários estudos têm evidenciado que a dieta pode estar relacionada com determinados riscos ou benefícios para a saúde humana tendo, nas últimas décadas, sido lançados vários conselhos e advertências por parte de diversas entidades e organismos da área alimentar.

Numa análise da população mundial, ainda que superficial, podem observar-se grandes diferenças no que diz respeito ao tipo de alimentos consumidos, diferenças estas que se prendem com a localização geográfica, as condições socio-económicas, a disponibilidade e facilidade em obter determinados alimentos e com as tradições culturais das diversas populações.

A dieta Mediterrânica caracteriza-se pelo consumo abundante de alimentos vegetais, preferencialmente frescos ou minimamente processados (entre os quais se destacam os frutos, legumes, cereais, grão e frutos secos¹), azeite como principal fonte de gordura, moderadas quantidades de lacticínios e peixe e um baixo consumo de carne (Parikh *et al.*, 2005). Múltiplos estudos, clínicos e epidemiológicos, têm associado a dieta Mediterrânica a diversos benefícios para a saúde, principalmente no que diz respeito à prevenção de doenças cardiovasculares (DCV). Pacientes que aderiram a esta dieta mostraram uma diminuição de peso, níveis inferiores de proteína-C reactiva, menor resistência à insulina, decréscimo dos níveis de triacilgliceróis e de colesterol-LDL e aumento dos níveis de colesterol-HLD (Parikh *et al.*, 2005).

Como referido, os frutos secos são um componente importante da dieta mediterrânica, estando preconizada a sua inclusão nas dietas consideradas saudáveis. A produção Europeia de frutos secos encontra-se concentrada na zona do Mediterrâneo sendo, desde há séculos, uma cultura tradicional daquela região (Comissão das Comunidades Europeias, 2002).

Os frutos secos, na sua generalidade, são ricos em macro e micronutrientes, para além de conterem vários constituintes bioactivos (Sabaté *et al.*, 2000). São considerados alimentos ricos em gordura, podendo apresentar teores variáveis de lípidos (por exemplo, desde cerca de 48% nos pistachios até aproximadamente 74% nas macadâmias).

¹ A expressão "fruto seco" está sujeita a duplo sentido. Em termos botânicos, as espécies em estudo fornecem frutos secos, isto é, não carnudos e, nestes casos, nem sequer edíveis. Em linguagem popular o termo é por vezes aplicado a qualquer semente grande e oleaginosa, encontrada dentro de uma casca.

Nos últimos anos, com o acréscimo do número de casos de obesidade e das doenças que lhe estão associadas, mas também por influência de um estereótipo de beleza associada a silhuetas magras, assiste-se a uma tendência, quase obsessiva, em evitar alimentos ricos em gordura. Consequentemente, poder-se-á verificar o decréscimo do consumo de frutos secos e até mesmo a sua exclusão das dietas.

Portugal, pela sua localização geográfica e condições edafo-climáticas daí resultantes, bem como pelo uso de práticas específicas de agricultura que advêm da nossa tradição e cultura, é um país de grande agrodiversidade. A utilização de práticas transmitidas ao longo de gerações de agricultores, associada ao conhecimento, tecnologia e desenvolvimento que caracterizam a época actual, pode ser um meio de obtenção de produtos típicos e de elevada qualidade alimentar e, consequentemente, uma mais valia económica para o país. A Nogueira (*Juglans regia* L.) e a Avelaira (*Corylus avellana* L.) são duas espécies cultivadas na área de Trás-os-Montes e uma importante fonte de rendimento para as suas populações. Segundo o relatório da Comissão das Comunidades Europeias (SEC 797 de 2002), a produção de frutos secos desempenha um papel preponderante na protecção e manutenção do balanço ambiental, social e rural de muitas regiões, constituindo um factor chave para a sustentabilidade de várias áreas rurais e o seu desaparecimento poderá implicar consequências significativamente negativas. A produção de avelã e noz na Comunidade Europeia, apesar de ocupar uma área considerável, caracteriza-se pelos baixos níveis de competitividade e reduzidas margens de lucro. No caso da avelã, este fenómeno explica-se sobretudo pela concorrência da produção turca, com baixos custos de produção e, consequentemente, muito competitiva a nível dos preços praticados. Relativamente à noz, a concorrência vem sobretudo dos EUA e da China, países com a maior produção deste fruto seco. Ao longo da década de 90 foram realizados investimentos significativos nestas culturas através de fundos comunitários. Em Portugal, cerca de 88% do investimento foi canalizado para os campos de cultivo e os restantes 12% para assistência técnica (Comissão das Comunidades Europeias, 2002).

Para além das sementes (única parte edível do fruto), ambas as espécies fornecem outros produtos de grande interesse que não devem, por conseguinte, ser menosprezados. Refira-se o caso das folhas utilizadas em medicina tradicional e do tronco, sobretudo o da nogueira, cuja madeira é muito apreciada em marcenaria.

A utilização de plantas, ou respectivas preparações, para a prevenção ou cura de doenças é conhecida desde os primórdios da história da Humanidade. É de facto longa a história da medicina tradicional, entrelaçando-se com o acumular de conhecimentos, transmitidos de geração em geração ao longo de milhares de anos. Segundo a OMS, a medicina tradicional traduz-se no somatório dos conhecimentos, técnicas e práticas

baseadas em teorias, crenças e experiências indígenas de diferentes culturas, explicáveis ou não, utilizadas na manutenção da saúde, assim como na prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento de doenças físicas ou mentais (OMS, 2000).

Tal como atrás referido para a dieta alimentar, também as práticas relacionadas com o uso de fitoterápicos variam muito de região para região, uma vez que sofrem a influência de factores como a cultura e a história dos povos, a natureza da flora disponível e, muitas vezes até, de factores religiosos. O uso de plantas medicinais é, portanto, recorrente nos cuidados de saúde primários dos países subdesenvolvidos ou em vias de desenvolvimento, uma vez que são economicamente mais acessíveis do que os produtos obtidos por síntese química. No entanto, nas últimas décadas tem-se assistido a um crescendo do consumo de plantas medicinais nos chamados países desenvolvidos. Com esta expansão de popularidade, assiste-se, simultaneamente, a uma crescente preocupação, quer por parte do público quer das autoridades, relativamente à sua segurança, eficácia e controlo de qualidade.

A escolha destas duas espécies como objecto de estudo desta dissertação resultou de vários factores. De entre estes factores muito pesou o facto deste trabalho ter sido realizado com o apoio financeiro concedido pelo Programa para o Desenvolvimento Educativo para Portugal (PRODEP III) enquanto docente do Instituto Politécnico de Bragança. Azeiteira e noqueira são, de facto, duas espécies que podem ser encontradas com uma certa frequência, entre outras atracções e encantos, no nordeste Transmontano.

II. OBJECTIVOS

No seguimento do que foi referido, este trabalho teve por objectivo principal contribuir para um melhor conhecimento de ambas as espécies, azeiteira e noqueira, de modo a valorizar os produtos delas obtidos e, de algum modo, contribuir para a sua divulgação, incentivando o país à sua produção e consumo. Dois produtos foram alvo de principal enfoque: as folhas, utilizadas na medicina tradicional, e as sementes, as únicas partes edíveis, que com tanto prazer degustamos. Sempre que possível, e tendo em conta os dados disponíveis na literatura, tentou-se encontrar uma relação entre cada um dos grupos de compostos estudados e o seu possível contributo benéfico para a saúde .

Relativamente às folhas das espécies estudadas, procedeu-se ao estudo do seu perfil em compostos fenólicos, uma vez que estão descritas, para estes compostos, propriedades antioxidantes a diversos níveis. A Farmacopeia Francesa (1989) preconiza a caracterização química das folhas de noqueira através da detecção, por TLC, de dois derivados da quercetina (quercetina 3-galactósido e quercetina 3-ramnósido), não tendo sido encontrada qualquer referência, em Farmacopeias, relativa à caracterização das folhas de azeiteira.

Porém, uma vez que estes dois derivados da quercetina estão amplamente distribuídos na natureza, a detecção da sua presença em qualquer espécie não nos parece suficiente para a respectiva caracterização. Desta forma, e tendo em conta que o estudo do perfil qualitativo e quantitativo de ácidos fenólicos e flavonóides foi já aplicado ao controlo de qualidade de várias plantas medicinais, neste trabalho procurou-se estabelecer uma metodologia de rotina que permitisse traçar o perfil fenólico das folhas das espécies em estudo. Para tal, procurou-se identificar o maior número de compostos tendo-se utilizado, com esta finalidade, uma técnica de Ion Trap HPLC/DAD/ESI-MS/MS. Todavia, sabendo de antemão que a produção de compostos fenólicos pode ser influenciada por factores genéticos e ambientais, tais como a cultivar, factores climáticos, práticas agrícolas e tipo de solo, optamos por recolher amostras de várias cultivares, ao longo de três anos, abrangendo duas localizações geográficas. Também para ambas as matrizes, durante o primeiro ano de estudos, procedeu-se a recolhas de amostras mensais de modo a monitorizar a variação dos perfis destes compostos e estabelecer os meses em que a colheita de folhas com finalidades medicinais, isto é, com teores mais elevados de compostos fenólicos, seria a mais aconselhada.

Relativamente às sementes, avelã e noz, pretendeu-se estudar a composição química da fracção lipídica, nomeadamente em ácidos gordos, triacilgliceróis, fitosteróis e tococromanóis. A determinação de ácidos gordos, triacilgliceróis e fitosteróis baseou-se em técnicas já implementadas. Para a determinação de tocoferóis e tocotrienóis, procedeu-se à validação de metodologias específicas para cada uma das matrizes estudadas.

Com o trabalho desenvolvido e aqui apresentado pretendeu-se, não só, contribuir para a caracterização da composição química das espécies em estudo, mas também avaliar a influência dos factores genéticos e edafo-climáticos na composição química dos parâmetros estudados. Com este propósito procedeu-se ao estudo de 79 amostras de avelãs, correspondentes a um total de 19 cultivares, 2 localizações geográficas e 3 anos consecutivos de produção, e de 36 amostras de nozes, correspondentes a um total de 9 cultivares, 2 localizações geográficas e 3 anos consecutivos de produção.

Posteriormente, procedeu-se à análise estatística dos resultados obtidos, de forma a avaliar a influência da cultivar (factores genéticos), da localização geográfica (factores edafo-climáticos) e do ano de produção (factores climáticos) na composição da fracção lipídica.

Na sequência dos trabalhos desenvolvidos, e uma vez que a avelã é sobretudo consumida após processamento térmico, avaliou-se a influência do processo de torra na composição da fracção lipídica das avelãs, nomeadamente em ácidos gordos, incluindo os isómeros *trans*, em triacilgliceróis, fitosteróis, tocoferóis e tocotrienóis. Para tal, procedeu-se à análise destes compostos em amostras de avelãs cruas e de avelãs submetidas a torras com diferentes intensidades.

Face ao enquadramento geral referido, apresentam-se então, e de forma resumida, os objectivos desta dissertação:

- Contribuição para a caracterização química da aveleira (*Corylus avellana* L.) e da noqueira (*Juglans regia* L.), nomeadamente no que respeita às folhas e sementes.

No caso das folhas:

- Estudo do perfil qualitativo em compostos fenólicos através da aplicação da técnica de Ion Trap HPLC/DAD/ESI-MS/MS;
- Estabelecimento de metodologias analíticas que possam ser aplicadas na elaboração de eventuais processos de controlo de qualidade e/ou autenticidade envolvendo estas espécies;
- Estudo sistemático de amostras de diferentes cultivares, provenientes do mesmo campo e submetidas às mesmas práticas agrícolas, recolhidas mensalmente (Maio – Setembro) durante o primeiro ano de estudos, de forma a monitorizar as variações da composição em compostos fenólicos, quer em termos qualitativos quer quantitativos;
- Estudo sistemático de diversas amostras recolhidas ao longo de três anos, e subsequente aplicação da análise estatística multivariada aos resultados obtidos, de forma a avaliar influências da cultivar, da localização geográfica e do ano de colheita, na composição fenólica das matrizes em estudo.

No caso das sementes:

- Determinação dos perfis em ácidos gordos, triacilgliceróis, fitosteróis e tococromanóis, recorrendo a diversas metodologias (baseadas em técnicas já existentes ou, se assim se justificasse, através de técnicas implementadas e validadas para o efeito);
- Estudo sistemático de diversas amostras e subsequente aplicação da análise estatística multivariada aos resultados obtidos, de forma a avaliar possíveis influências, na composição dos referidos compostos, por parte da cultivar, da localização geográfica e do ano de colheita;
- Avaliação da influência do processo de torra na composição da fracção lipídica de avelãs.

III. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação encontra-se estruturada em duas partes principais, designadas por Parte 1 e Parte 2, estabelecidas segundo a parte da planta estudada. Na Parte 1 aborda-se o estudo das folhas, ao passo que a Parte 2 se refere ao estudo das sementes.

Ambas as partes estão subdivididas em capítulos, sendo o critério principal de divisão o grupo de compostos estudado. Assim, a Parte 1, dirigida ao estudo das folhas, é constituída apenas por um capítulo que contempla o estudo do perfil fenólico. A Parte 2 é constituída por seis capítulos. Destes, o primeiro consiste numa introdução teórica generalista dirigida aos frutos secos estudados. Em cada um dos quatro capítulos seguintes é abordada uma diferente família de compostos: ácidos gordos, triacilgliceróis, fitosteróis e tococromanóis. O último capítulo desta parte é dedicado ao estudo da influência do processo de torrefacção na fracção lipídica da avelã.

Os diferentes capítulos apresentam uma estrutura idêntica entre si. Cada um começa por um enquadramento teórico referente à família de compostos em questão, no qual, sempre que possível, e à luz dos conhecimentos actuais, se tenta fazer a ligação entre a família de compostos estudada e o seu possível contributo benéfico para a saúde. Nesta introdução teórica apresenta-se ainda, para além da estrutura química e principais características dos compostos estudados, uma breve revisão das metodologias descritas na literatura para a sua análise. Após a introdução teórica, segue-se a secção experimental, na qual se referem os materiais e métodos utilizados, os resultados e discussão e, por fim, as conclusões.

Ao longo de toda a dissertação as espécies, aveleira e noqueira, são referidas em bloco ainda que sequencialmente por ordem alfabética.

No final da dissertação apresenta-se uma resenha das conclusões tiradas ao longo dos diferentes capítulos.

De forma a facilitar a consulta bibliográfica, e porque alguma literatura é referida em mais do que um capítulo, no final apresenta-se a listagem de todas as referências bibliográficas citadas ao longo do texto.

PARTE 1

FOLHAS DE AVELEIRA E DE NOGUEIRA

CAPÍTULO 1

PERFIL FENÓLICO

I- COMPOSTOS FENÓLICOS. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os fitoquímicos existentes nos vegetais, quer os utilizados em alimentação quer os utilizados em medicina tradicional, tornaram-se alvo de um crescente número de estudos. Para este facto contribuíram, de forma determinante, os resultados obtidos em estudos epidemiológicos, os quais sugerem a existência de uma correlação entre o consumo de dietas contendo elevadas quantidades de fitoquímicos e uma menor incidência de determinadas doenças, nomeadamente cardiovasculares e cancro. Uma vez que, actualmente, se considera que os radicais livres e as espécies reactivas de oxigénio ou de azoto desempenham um papel activo no desenrolar destas doenças, os compostos antioxidantes têm, conseqüentemente, sido alvo de grande atenção, não somente por parte do mundo científico como também do público consumidor. De entre a diversidade de fitoquímicos presentes na dieta, os compostos fenólicos têm sido especialmente abordados em diversos tipos de investigação.

Os compostos fenólicos, embora produtos do metabolismo secundário das plantas, são componentes quase universais do reino vegetal. Desempenham numerosas e importantes funções fisiológicas e bioquímicas nestes seres, tais como a protecção contra o stress oxidativo e os raios UV, resistência a patógenos, e intervenção na lenhificação e na cor das plantas (Miller e Ruiz-Larrea, 2002; Shahidi, 2002; Yao *et al.*, 2004).

De uma forma simples, estes compostos caracterizam-se pela presença de pelo menos um anel benzénico, ao qual se liga pelo menos um grupo hidroxilo, podendo este estar livre ou não (Bruneton, 1993). Os compostos fenólicos são também frequentemente designados como polifenóis, termo este que, tal como o primeiro, é suficientemente amplo para abranger diferentes grupos de compostos, de entre os quais os ácidos fenólicos e os flavonóides são os mais amplamente distribuídos e estudados.

2. ESTRUTURA QUÍMICA

2.1 Ácidos fenólicos

Segundo Bruneton (1993), a designação "ácido fenólico" pode-se aplicar a todos os compostos orgânicos que apresentem, pelo menos, um grupo carboxílico e um hidroxilo fenólico. No entanto, por motivos de abundância relativa, a expressão acabou por se tornar, na prática corrente em fitoquímica, sinónimo de ácido benzóico e/ou de ácido cinâmico e respectivos derivados, cujas estruturas se representam na Figura 1.1



| Ácidos benzóicos | R ₁ | R ₂ | Ácidos cinâmicos | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|---------------------------------|------------------|------------------|--------------------------|------------------|----------------|-----------------|
| Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico | H | H | Ácido <i>p</i> -cumárico | H | H | H |
| Ácido gálico | OH | OH | Ácido cafeico | OH | OH | H |
| Ácido protocatéquico | H | OH | Ácido ferúlico | H | OH | H |
| Ácido vanílico | OCH ₃ | H | Ácido sinápico | OCH ₃ | H | H |
| Ácido siríngico | OCH ₃ | OCH ₃ | Ácido clorogénico | H | OH | ácido 5-quinico |

FIGURA 1.1. Exemplos de estruturas de ácidos benzóicos e ácidos cinâmicos (adaptado de Tsao e Deng, 2004).

Os ácidos benzóicos são comuns na natureza, sendo particularmente abundantes nos frutos com sabor ácido (Miller e Ruiz-Larrea, 2002). Apresentam sete átomos de carbono na sua estrutura (C₆-C₁), podendo existir na forma livre ou combinados com outros compostos na forma de éster ou heterósidos.

Os ácidos cinâmicos apresentam uma estrutura base com nove átomos de carbono (C₆-C₃). De entre este grupo de compostos, mais abundante e diverso que o grupo dos ácidos benzóicos, alguns encontram-se amplamente distribuídos na natureza, ao passo que outros são menos frequentes (Bruneton, 1993; Miller e Ruiz-Larrea, 2002). Estes compostos raramente existem na forma livre, encontrando-se geralmente na forma esterificada, através de uma ligação entre o seu grupo carboxílico e o grupo álcool de outros compostos orgânicos (Macheix, 1990; Bruneton, 1993).

Apesar da possibilidade de existência de isomeria *cis/trans*, existem naturalmente na forma *trans*, podendo no entanto, em laboratório, haver interconversão das duas formas por influência dos raios ultravioleta ou quando em meios alcalinos ou ácidos (Bruneton, 1993).

2.2 Flavonóides

Conhecem-se actualmente mais de 4000 flavonóides diferentes, encontrando-se sobretudo nas partes externas das plantas, como nas folhas, cascas e sementes (Miller e Ruiz-Larrea, 2002). Caracterizam-se pela sua estrutura geral C₆-C₃-C₆, em que dois anéis benzénicos se encontram ligados por uma cadeia com três átomos de carbono, a qual pode ou não formar um terceiro anel. A designação frequentemente conferida aos anéis e o

sistema de numeração usado para a maioria dos flavonóides encontra-se representado na Figura 1.2.

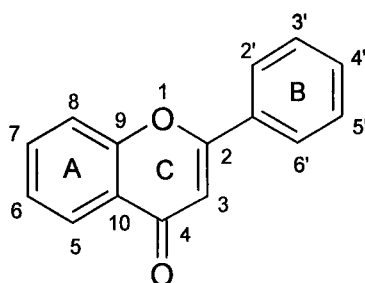


FIGURA 1.2. Estrutura geral dos flavonóides ($C_6-C_3-C_6$).

Os flavonóides podem ser divididos em subgrupos com base nas variações evidenciadas pelo anel C (Iwashina, 2000; Miller e Ruiz-Larrea, 2002), nomeadamente em flavonas, flavonóis, flavanóis, flavanodióis, flavanonas, flavanonóis, isoflavonas, antocianidinas, chalconas e auronas.

Podem ocorrer na forma livre (agliconas) ou conjugada (heterósidos), diferindo entre si no número e tipo dos substituintes e no número, natureza e posição dos resíduos de açúcar (Sivam, 2002). Na natureza, as formas mais comuns são as heterosídicas. Se a ligação entre a genina e o açúcar ocorre através de um grupo hidroxilo da genina, estamos perante um O-heterósido. Os C-heterósidos são menos frequentes, e ocorrem quando se estabelece uma ligação carbono-carbono entre a genina e o açúcar. Os resíduos açucarados podem ser mono, di ou trissacarídeos, estes últimos podendo ainda ser lineares ou ramificados (Bruneton, 1993). O açúcar mais frequente é a glucose, sendo ainda frequentes a galactose, a ramnose, a xilose e a arabinose, bem como o dissacarídeo rutinose.

3. ACTIVIDADE BIOLÓGICA

A propriedade “vitamínica P”, isto é, a capacidade de diminuir a permeabilidade dos capilares sanguíneos e aumentar da sua resistência, é a actividade mais frequentemente referida por vários autores (Bruneton, 1993; Cunha e Pereira, 2003). No entanto, outras actividades nomeadamente actividades antialérgica, anticancerígena, antitrombótica, anti-inflamatória, anti-hepatotóxica, antiviral, antimicrobiana e antioxidante têm sido atribuídas a muitos polifenóis, mais concretamente a diversos flavonóides (Shi, 2001; Sivam, 2002; Yao *et al.*, 2004).

Pensa-se que a maioria dos efeitos biológicos atribuídos a estes compostos advenha das suas propriedades antioxidantes, traduzindo-se de diversas formas, nomeadamente inibindo enzimas (caso da xantina-oxidase e ciclo-oxigenase), quelatando metais, interagindo com outros antioxidantes e inactivando radicais livres (Hall, 2001; Shi, 2001). A actividade

antioxidante dos flavonóides encontra-se directamente relacionada com a sua estrutura química. De facto, os flavonóides são excelentes doadores de electrões, formando radicais intermediários relativamente estáveis por mecanismos de deslocalização de electrões e ressonância (Merken e Beecher, 2000; Eskin e Przybylski, 2001; Hall, 2001). É geralmente aceite que a posição e o número de grupos hidroxilo influi de forma importante na eficiência antioxidante destes compostos (Eskin e Przybylski, 2001; Hall, 2001; Shi, 2001). A presença de grupos hidroxilo livres em C₃ e C₅ é particularmente importante pois permite a formação de pontes de hidrogénio com o grupo carbonilo em C₄, contribuindo deste modo para a estabilização das estruturas (Shi, 2001). Também a presença da dupla ligação no anel C, em posição vizinha do grupo carbonilo, revelou influenciar positivamente a actividade antioxidante destes compostos (Eskin e Przybylski, 2001; Shi, 2001).

Apesar de diversos estudos epidemiológicos terem mostrado uma correlação entre o consumo de antioxidantes fenólicos, nomeadamente de flavonóides, e a redução da mortalidade por DCV e cancro (Hertog *et al.*, 1993 e 1995; Johnson, 2001), há que utilizar com cuidado essas conclusões, pois muitos dos efeitos biológicos foram apenas verificados *in vitro* ou em animais, e ainda são poucos os dados acerca da biodisponibilidade destes compostos. Segundo a opinião de Miller e Ruiz-Larrea (2002) dietas ricas em flavonóides, administradas durante um período de tempo curto poderão não surtir qualquer efeito benéfico no sentido de reverter danos oxidativos estabelecidos. Este facto não invalida que determinados hábitos alimentares preconizados durante a expectativa de vida, nomeadamente o consumo de alimentos ricos nos referidos fitoquímicos, possam ter um efeito preventivo de danos oxidativos. Os mesmos autores referem também que estes compostos podem exercer a sua actividade antioxidante nos próprios alimentos, nomeadamente quando são cozinhados, e ainda no tracto gastrointestinal, poupando outros antioxidantes durante o processo digestivo (caso do α -tocoferol) e levando, conseqüentemente, a uma maior biodisponibilidade daqueles. Johnson (2001) refere ainda que estes compostos poderão exercer, no intestino, uma actividade anticancerígena local.

4. FONTES E CONSUMO

Para o Homem, a principal fonte de flavonóides são os vegetais, frutos e seus derivados (Shi, 2001), devendo-se considerar ainda o vinho e o chá como importantes contribuintes (Yao *et al.*, 2004).

Yao e co-autores (2004) referem que a quantidade diária de flavonóides ingerida poderá estar compreendida entre 100 e 1000 mg/dia. No mesmo sentido, Johnson (2001) refere que esta quantidade possa situar-se à volta de 1g/dia. Miller e Ruiz-Larrea (2002) referem valores bastante inferiores (23 mg/dia) relativos à ingestão média de flavonóides na Holanda, referindo que as consideráveis melhorias analíticas que ocorreram nos últimos anos poderão

ser a justificação para a discrepância dos valores descritos na literatura. No entanto, parece ser opinião da generalidade dos autores que se debruçaram sobre esta questão, que é difícil estabelecer estimativas concretas, não somente devido à diversidade de hábitos alimentares entre a população mundial, mas sobretudo porque os dados sobre quantidades de compostos específicos, como ácidos fenólicos e flavonóides, nos diversos alimentos e bebidas são ainda muito escassos, havendo um longo caminho a percorrer neste sentido. Por outro lado, há ainda que considerar a existência de uma variabilidade natural dos níveis destes compostos, os quais podem ser influenciados por factores genéticos, ambientais e outros, como o estado de maturação e o tipo de processamento culinário a que os alimentos são sujeitos (Yao *et al.*, 2004).

5. UTILIZAÇÃO

Os compostos fenólicos, bem como as plantas que os contêm, podem ser utilizados para fins medicinais, para a preservação dos alimentos ou pelas suas qualidades organolépticas (Chu *et al.*, 2002; Sakakibara *et al.*, 2003).

A nível industrial, é frequente a adição de antioxidantes a produtos alimentares, tais como óleos refinados, de forma a retardar possíveis fenómenos oxidativos e aumentar o seu prazo de validade (Fujisaki *et al.*, 2000). Apesar dos antioxidantes mais utilizados com esta finalidade serem o BHA (butil-hidroxianisol), o BHT (butil-hidroxitolueno) e o TBHQ (*terc*-butil-hidroquinona) a utilização de antioxidantes naturais é cada vez mais frequente, indo de encontro às expectativas dos consumidores que preferem a utilização de produtos naturais, uma vez que os consideram melhores e mais seguros que os sintéticos.

Têm sido levados a cabo numerosos estudos equacionando a utilização de plantas, ou seus extractos, contendo antioxidantes naturais tais como flavonóides, catequinas ou ácidos fenólicos (Evans, 1997; Wanasundara e Shahidi, 1998; Yanishlieva e Marinova, 2001; Yanishlieva, 2001). Estes estudos demonstraram a eficácia dos produtos naturais, frequentemente superior à apresentada pelos antioxidantes sintéticos. Por este motivo, a utilização de plantas, extractos ou compostos delas extraídos, é cada vez mais encarada como possível substituto de antioxidantes sintéticos. Apesar das culturas de células serem uma possibilidade para a obtenção destes compostos, o elevado grau de especialização e os custos que lhe estão associados tornam o método muito oneroso. Outra possibilidade consistiria na utilização da biologia molecular, desenvolvendo organismos geneticamente modificados (OGM) de modo a produzir uma maior quantidade destes produtos específicos. Contudo, as dúvidas e renitência ainda existentes, por parte dos consumidores e não só, relativamente à utilização de OGMs, levam a crer que esta via não seja desenvolvida proximamente. Assim, a agricultura tradicional e as subsequentes metodologias de extracção continuam a ser as preferencialmente utilizadas para a obtenção destes compostos (Hall, 2001).

5.1 Folhas de aveleira e de noqueira e a medicina tradicional

Desde sempre, a medicina baseada no uso de plantas desempenhou um importante papel na saúde pública. Actualmente, a fitoterapia continua a ser utilizada nos cuidados de saúde e prevenção da doença, especialmente nos países subdesenvolvidos ou em vias de desenvolvimento. Embora as motivações subjacentes sejam diferentes, também nos países desenvolvidos se tem assistido a uma procura crescente das virtudes curativas de certos vegetais. Na Europa, existe actualmente um aumento de interesse pelo uso de plantas com propriedades terapêuticas, embora a sua importância varie consideravelmente de país para país (Silano *et al.*, 2004).

As folhas de aveleira (*Corylus avellana* L.), se bem que, tanto quanto nos é dado saber, não sejam comercializadas actualmente, foram e continuam a ser utilizadas em medicina tradicional. O seu uso deve-se essencialmente às suas propriedades vasoconstritoras e anti-hemorrágicas, sendo por isso utilizadas como tónico venoso em situações de varizes, fragilidade capilar, edemas e ainda na sintomatologia hemorroidal. As preparações galénicas podem ter utilização tópica em varizes, úlceras, hemorróides e inflamações orofaríngeas (Cunha e Pereira, 2003). Alguma literatura refere, ainda, propriedades antidiarreicas, antifúngicas, cicatrizantes e adstringentes (Bruneton, 1993; Fraisse *et al.*, 1999; Cunha e Pereira, 2003).

Até à presente data, poucos são os estudos disponíveis na literatura sobre as folhas de aveleira, estando apenas referida a identificação dos compostos fenólicos maioritários: ácido 5-cafeoilquínico, miricetina 3-ramnósido e quercetina 3-ramnósido (Tissut e Egger, 1972; Fraisse *et al.*, 1999). Um dos objectivos deste trabalho consistiu na caracterização da folha de aveleira no que diz respeito à composição fenólica, uma vez que estes compostos podem estar relacionados com os efeitos terapêuticos descritos para esta planta.

A folha de noqueira (*Juglans regia* L.) tem sido largamente utilizada em medicina tradicional no tratamento de insuficiência venosa e sintomatologia hemorroidal, bem como pelas suas propriedades antidiarreicas, anti-helmínticas, depurativas e adstringentes (Van Hellefont, 1986; Bruneton, 1993; Wichtl e Anton, 1999). Foram igualmente descritas propriedades queratolíticas, anti-fúngicas, hipoglicemiantes, hipotensivas e sedativas (Valnet, 1992; Gîrzu *et al.*, 1998). Várias destas actividades poderão dever-se à acção dos taninos, descritos na literatura (Cunha e Pereira, 2003), mas também poderão ser devidas à acção de outros compostos fenólicos, nomeadamente flavonóides e ácidos fenólicos.

A folha de noqueira está incluída na 10ª Edição da Farmacopeia Francesa (1989), a qual sugeria que o controlo de qualidade químico se efectuasse mediante a detecção, por TLC, da quercetina 3-galactósido e da quercetina 3-ramnósido. No entanto, este teste revela-se insuficiente, tendo em conta que estes compostos são ubiqüitários na natureza.

6. PERFIL FENÓLICO NO CONTROLO DE QUALIDADE

Se bem que para alguns casos específicos existam marcadores taxonómicos, isto é, compostos químicos que caracteristicamente ocorrem em determinadas espécies ou géneros vegetais, tal não acontece para a generalidade das espécies. Os trabalhos realizados durante as últimas décadas têm demonstrado que, apesar da sua ubiquidade, como classe de compostos, apenas um número limitado de membros deste grupo se encontram presentes em cada espécie. Desta forma, é muitas vezes possível associar um perfil fenólico a determinados produtos de origem vegetal, constituindo um parâmetro útil na avaliação da autenticidade dos mesmos. Este perfil será tão mais útil quanto maior o número de compostos identificados. Para além de estabelecer um perfil qualitativo, a quantificação individual de cada composto é de grande valia, permitindo estabelecer quais os compostos maioritários e minoritários e inferir possíveis correlações entre eles. Nestes casos pode-se considerar que nenhum dos compostos *per si* será considerado um marcador químico, mas que o conjunto dos compostos, atendendo à sua identidade e quantidade, será, com pouca probabilidade, encontrado noutra espécie.

Têm sido realizados vários estudos com o referido objectivo, isto é, o de traçar perfis fenólicos de produtos naturais que possam contribuir para a avaliação da autenticidade dos mesmos. Refira-se, a título de exemplo, vários trabalhos realizados no Serviço de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, em que foram traçados perfis qualitativos e quantitativos para utilização no controlo de qualidade de diversas plantas medicinais (Andrade *et al.*, 1998a, Valentão *et al.*, 1999; Areias *et al.*, 2000a; Areias *et al.*, 2000b; Valentão *et al.*, 2003; Meirinhos *et al.*, 2005).

No entanto, apesar da variabilidade da composição química dos seres vivos ser geneticamente limitada, é natural que dentro de cada espécie ocorram variações. De facto, vários factores tais como a cultivar, o clima, as condições geológicas e as diferentes práticas agrícolas, podem influir na produção destes compostos (Macheix *et al.*, 1990; Yao *et al.*, 2004). Assim, torna-se relevante a determinação de perfis fenólicos, qualitativos e quantitativos, preferencialmente obtidos de um elevado número de amostras, pois pode auxiliar a estabelecer o que poderá ser considerado, ou não, como razoável variabilidade natural.

7. METODOLOGIAS ANALÍTICAS – BREVE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Desde meados da década de 70, a cromatografia por HPLC tornou-se o método analítico de escolha para a análise de flavonóides, tendo sido publicados centenas de trabalhos nas últimas duas décadas (Sivam, 2002). Encontram-se disponíveis na literatura várias revisões

sobre a análise de flavonóides por HPLC, as quais fazem referência a diferentes tipos de amostras, à utilização de diversos processos extractivos, pré-colunas e colunas, fases móveis e métodos de detecção (Merken e Beecher, 2000; Sivam, 2002; Andrade e Seabra, 2003; Stefova *et al.*, 2003). Desta forma far-se-á apenas uma breve alusão às diversas metodologias disponíveis, devendo-se consultar a bibliografia específica disponível para a obtenção de informação mais detalhada.

Sendo os compostos fenólicos uma tão ampla e importante classe de compostos naturais, é compreensível que, ao longo dos anos, tenham sido desenvolvidas e utilizadas várias técnicas para a sua identificação e quantificação. Uma das técnicas mais antigas é a cromatografia em camada fina (TLC), actualmente ainda em uso dada a sua versatilidade, rapidez e utilidade com finalidades identificativas, estando por exemplo preconizada a sua utilização em diversas Farmacopeias. A TLC pode ainda ser utilizada com finalidades preparativas quando não é objectivo obter grandes quantidades de compostos. Tal como a TLC, a cromatografia em coluna é frequentemente utilizada com finalidades preparativas.

Outros métodos de separação utilizados recentemente são referidos por Sivam (2002), nomeadamente a electroforese capilar (CZE) e a cromatografia micelar electrocinética (MEKC).

Como referido, a HPLC é considerada o método analítico de escolha para a análise de compostos fenólicos. Regra geral são utilizadas colunas de fase reversa e sistemas de eluição binários, compreendendo normalmente um solvente aquoso acidificado e um solvente orgânico (Sivam, 2002; Andrade e Seabra, 2003; Brandsteterová e Ziaková-Caniová, 2003; Stefova *et al.*, 2003). Dado que estes compostos absorvem no UV, os detectores UV/Vis e DAD são os mais frequentemente utilizados. Outros métodos de detecção incluem a detecção electroquímica, a fluorescência e a espectrometria de massa. Com o desenvolvimento da ionização por electrospray (ESI) tornou-se técnica e economicamente viável executar a análise destes compostos, com elevada sensibilidade, por cromatografia líquida acoplada a detectores de massa ESI/MS. Na última década multiplicaram-se as referências ao uso da espectrometria de massa na análise de flavonóides, estando igualmente disponíveis excelentes artigos de revisão (Stobiecki, 2000).

II – COMPOSTOS FENÓLICOS. PARTE EXPERIMENTAL

1. AMOSTRAGEM

Sendo ambas as espécies em estudo árvores de folha caduca, e tendo-se iniciado esta dissertação no final de 2001, isto é, após a época de queda das folhas, não foi possível a obtenção de amostras relativas a 2001. Deste modo, o estudo da composição fenólica das folhas iniciou-se em 2002 tendo-se prolongado até 2004, de forma a perfazer três anos consecutivos de estudo.

As amostras de folha de aveleira foram colhidas em duas localizações geográficas: Vila Real (41° 19'N, 7° 44'O, 470 m altura) e Felgueiras (41° 22'N, 8° 11'O, 320 m altura) durante três anos consecutivos (2002-2004). Em Vila Real foram recolhidas amostras de 19 cultivares, nomeadamente cvs. Butler, Campanica, Cosford, Couplat, Daviana, Ennis, Fertille de Coutard, Grossal, Gunslebert, Lansing, Longa d' Espanha, Merveille de Bollwiller, Morell, Negreta, Pauetet, Round du Piemont, Santa Maria de Jesus, Segorbe e Tonda di Giffoni. Em Felgueiras, no primeiro ano de estudos foram recolhidas amostras de 10 cultivares comuns às descritas para a localização Vila Real, nomeadamente: cvs. Butler, Campanica, Cosford, Couplat, Ennis, Fertille de Coutard, Merveille de Bollwiller, Morell, Pauetet e Tonda di Giffoni, tendo nos anos seguintes (2003, 2004) sido adicionadas ao estudo outras 3 cultivares, nomeadamente as cvs. Longa d' Espanha, Negreta e Segorbe. Por forma a facilitar a consulta, a Tabela 1.1 apresenta a listagem das amostras estudadas.

TABELA 1.1. Cultivares de aveleira recolhidas por localização geográfica

| CULTIVARES ESTUDADAS | | | |
|----------------------|------------|------------|---------------------------|
| FELGUEIRAS | | VILA REAL | |
| Butler | Morell | Butler | L. Espanha |
| Campanica | Negreta* | Campanica | M. Bollwiller |
| Cosford | Pauetet | Cosford | Morell |
| Couplat | Segorbe* | Couplat | Negreta |
| Ennis | T. Giffoni | Daviana | Pauetet |
| F. Coutard | | Ennis | R. Piemont |
| L. Espanha* | | F. Coutard | Sta. M ^a Jesus |
| M. Bollwiller | | Grossal | Segorbe |
| | | Gunslebert | T. Giffoni |
| | | Lansing | |

(*: cultivares estudadas apenas em 2003 e 2004).

As amostras de folha de nogueira foram colhidas em duas localizações geográficas: Bragança, no nordeste Transmontano (41° 49'N, 6° 46'O, 670 m altura) durante três anos consecutivos (2002, 2003 e 2004), e Coimbra, na região centro de Portugal (40° 03'N, 8°

37'O, 10 m altura) durante dois anos (2003 e 2004). De entre as cultivares em estudo, as cvs. Franquette, Lara, Mayette, Mellanaise e Parisienne eram comuns às duas localizações, ao passo que a cv. Marbot apenas existia em Bragança e as cvs. Arco, Hartley e Rego apenas existiam em Coimbra (Tabela 1.2).

TABELA 1.2. Cultivares de noqueira recolhidas por localização geográfica.

| CULTIVARES ESTUDADAS | | | |
|----------------------|------------|------------|------------|
| BRAGANÇA | | COIMBRA | |
| Franquette | Mayette | Arco | Mayette |
| Lara | Mellanaise | Franquette | Mellanaise |
| Marbot | Parisienne | Hartley | Parisienne |
| | | Lara | Rego |

Para ambas as matrizes, em 2002, procedeu-se à recolha mensal de amostras entre os meses de Maio e Setembro, nos meados de cada mês. Nos restantes anos, a recolha foi efectuada em meados do mês de Julho. As amostras de folhas frescas, colhidas manualmente do terço médio de ramos expostos à luz solar, foram secas em estufa de ar forçado (aproximadamente a 30 °C) e armazenadas em sacos de papel, no escuro. Imediatamente antes de se proceder à extracção dos compostos fenólicos, cada amostra foi moída e tamizada (910 µm).

2. REAGENTES E PADRÕES

As substâncias de referência utilizadas na identificação (ácido 5-O-cafeoilquínico, ácido *p*-cumárico, quercetina 3-galactósido, quercetina 3-glucósido, quercetina 3-arabinósido, quercetina 3-ramnósido, miricetina 3-ramnósido e campferol 3-glucósido) foram adquiridas à Sigma (St. Louis, MO, USA) ou à Extrasynthese (Genay, France). O ácido 3-O-cafeoilquínico foi obtido por transesterificação a partir do ácido 5-O-cafeoilquínico com base no trabalho de Clifford *et al.* (1989). A quercetina 3-xilósido foi obtida por isolamento a partir da planta *Hypericum pulchrum* (Seabra *et al.*, 1990).

O metanol e o ácido fórmico foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha) e o ácido trifluoroacético foi comprado à Sigma. A água foi tratada utilizando um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

3. COLUNAS DE EXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

As colunas ISOLUTE C₁₈ non-end-capped (NEC) (50 µm de tamanho de partícula; 60 A° de porosidade, 10 g de enchimento, 70 ml de volume de reservatório) foram adquiridas à International Sorbent Technology Ltd. (Mid Glamorgan, UK).

4. EXTRACÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Para fins qualitativos, procedeu-se de forma idêntica para as folhas de aveleira e de noqueira.

Cerca de 0,5 g de uma amostra homogénea, foram extraídos 3 vezes, com agitação durante 10 min à temperatura ambiente, utilizando 100 ml de diferentes solventes (metanol, etanol e água acidificada com pH = 2). Para a amostra de noqueira procedeu-se ainda à preparação de um extracto clorofórmico. Os extractos obtidos foram filtrados, levados à secura (a pressão reduzida e temperatura não superior a 40 °C), redissolvidos em 1,5 ml de metanol Lichrosolv e analisados por HPLC/DAD.

Para fins quantitativos, procedeu-se de forma diferente para as folhas de noqueira e de aveleira.

Para cada amostra de folhas de aveleira, aproximadamente 0,15 g foram rigorosamente pesadas e fortemente agitadas com metanol até completa extracção dos compostos fenólicos, isto é, até se obter uma reacção negativa ao teste da soda (NaOH 20%). O extracto metanólico foi filtrado, evaporado à secura, a pressão reduzida e a temperatura não superior a 40 °C, e redissolvido em 1,5 ml de metanol Lichrosolv.

Cerca de 0,2 g de cada amostra de folhas de noqueira foram rigorosamente pesadas e fortemente agitadas com água acidificada a pH 2 (com HCl) até completa extracção dos compostos fenólicos, verificada através de reacção negativa ao teste da soda (NaOH 20%). O extracto foi filtrado e passado por uma coluna ISOLUTE C₁₈ (NEC), previamente acondicionada com 60 ml de metanol seguidos de 140 ml de água (pH 2 com HCl). A fracção fenólica, retida na coluna, foi eluída com 75 ml de metanol. O extracto metanólico foi evaporado à secura, a pressão reduzida e a temperatura não superior a 40 °C, e redissolvido em 3 ml de metanol Lichrosolv.

5. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

5.1. Análise qualitativa por Ion Trap HPLC/DAD/ESI-MS/MS

Para a análise de ambas as matrizes utilizou-se o mesmo sistema cromatográfico, com as seguintes características:

- Cromatógrafo Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) equipado com uma bomba binária (modelo Agilent G1312 A);
- Injetor automático (modelo Agilent G1313A);
- Desgaseificador (modelo Agilent G1322A);

- Coluna LiChroCART, 250 x 4 mm, RP-18, 5 µm de tamanho de partícula (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Detector de díodos e detector de massa colocados em série (Agilent 1100 Series LC/MSD Trap), consistindo num Agilent G1315B photo-diode array, controlado pelo software Agilent v. A.08.03 e num Agilent G2445A Ion-Trap Mass Spectrometer, controlado pelo software v. 4.0.25.

Características do detector de massa e respectiva análise:

- Sistema de ionização por electrospray (ESI);
- Gás nebulizador: azoto; pressão 65 psi; fluxo ajustado a 11 l/min;
- Aquecimento do capilar: 350 °C; Voltagem: 4 kV;
- Gás de colisão (Ion Trap): Hélio; Voltagem: 0,3 - 2V;

Os cromatogramas foram registados a 280, 320 e 350 nm. Os espectros de massa foram adquiridos no modo de ionização negativo e registados desde m/z 60 até m/z 800. Os dados obtidos por MS/MS foram adquiridos no modo automático.

Utilizaram-se as seguintes condições analíticas:

NOGUEIRA:

- Fase móvel: ácido trifluoroacético (TFA) (solução aquosa, 0,1%) (solvente A) e metanol (solvente B);
- Gradiente: 0 min: 30% B; 30 min: 50 % B; 32 min: 70% B; 33 min: 80 % B; 35 min: 80% B;
- Fluxo: 1ml/min;
- Volume de injeção: 5 µl.

AVELEIRA:

- Fase móvel: TFA (solução aquosa, 0,1%) (solvente A) e metanol (solvente B);
- Gradiente: 0 min: 30% B; 30 min: 50 % B; 32 min: 70% B;
- Fluxo: 1ml/min;
- Volume de injeção: 10 µl.

5.2 Análise quantitativa por HPLC/DAD

Para a análise de ambas as matrizes utilizou-se o mesmo sistema cromatográfico, com as seguintes características:

- Cromatógrafo Gilson equipado com duas bombas (modelos 302 e 3025);
- Módulo manométrico Gilson (modelo 802C);
- Câmara misturadora Gilson (modelo 811);
- Injector Rheodyne (modelo 7125), com "loop" de 20 µl;
- Coluna Spherisorb ODS2, 250 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula (Waters, Milford);
- Detector de díodos Gilson

Utilizaram-se as seguintes condições analíticas:

NOGUEIRA:

- Fase móvel: ácido fórmico (solução aquosa, 0,5%) (solvente A) e metanol (solvente B);
- Gradiente: 0 min: 5% B; 3 min: 15 % B; 5 min: 20% B; 12 min: 25% B; 15 min: 30% B; 20 min: 40% B; 30 min: 45% B; 40 min: 50% B; 45 min: 70% B; 46 min: 100% B;
- Fluxo: 1ml/min;
- Volume de injeção: 20 µl.

AVELEIRA:

- Fase móvel: ácido fórmico (solução aquosa, 0,5%) (solvente A) e metanol (solvente B);
- Gradiente: 0 min: 15% B; 15 min: 30% B; 30 min: 40% B; 40 min: 52,5% B; 41 min: 100% B;
- Fluxo: 1ml/min;
- Volume de injeção: 20 µl.

Os dados obtidos foram processados através do software Unipoint® System (Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, França). Foi efectuado o registo dos cromatogramas a 320 e 350 nm. Os compostos fenólicos foram identificados por comparação dos tempos de retenção e espectros UV/Vis, no intervalo de comprimentos de onda de 200 a 400 nm, com os obtidos para as substâncias de referência. Quando necessário, procedeu-se à co-cromatografia da amostra com substância padrão.

5.3 Quantificação dos compostos fenólicos

Os compostos foram quantificados pelo método do padrão externo. Os ácidos fenólicos foram quantificados a 320 nm e os flavonóides a 350 nm.

Na indisponibilidade no mercado de alguns compostos usados como substâncias de referência, procedeu-se à sua quantificação utilizando os compostos disponíveis que mais se lhe assemelhassem. Deste modo, o ácido 3-O-cafeoilquínico foi quantificado como 5-O-

cafeoilquínico; os ácidos 3-*p*-cumaroilquínico, 4-*p*-cumaroilquínico e *p*-cumaroiltartárico foram quantificados como ácido *p*-cumárico; a mistura de derivados da miricetina, detectada na folha de aveleira, foi quantificada como miricetina 3-ramnósido; a quercetina 3-pentósido e a quercetina 3-xilósido foram quantificados como quercetina 3-arabinósido; o campferol 3-ramnósido foi quantificado como campferol 3-glucósido.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada recorrendo ao software estatístico R 2.1.1 para Linux, tendo-se utilizado as seguintes ferramentas: i) mva (classical multivariate analysis library) ; ii) MASS (main library of Venables and Ripley's); iii) Hmisc (Harrell miscellaneous); iv) brlr (Bias-reduced Logistic Regression); v) R-base packages (R-Project, 2005).

A análise incluiu a exploração de padrões e correlações plausíveis de dados entre o perfil fenólico e os factores estudados: localização geográfica, ano de produção e cultivares. Inicialmente foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson e de Spearman entre os diferentes compostos fenólicos, de forma a verificar interações entre os compostos quantificados (Box *et al.*, 1978; Neter *et al.*, 1996). Seguidamente, efectuou-se uma análise de variância através da realização de testes F ($\alpha = 95\%$) e de testes de Tuckey (Neter *et al.*, 1996). A técnica de análise de componentes principais (PCA) permitiu realizar a análise de reconhecimento de padrões e a obtenção do “Gabriel plot” correspondente (Hosmer e Lemeshow, 1989).

No caso da folha de aveleira, atendendo ao considerável número total de cultivares em estudo, procedeu-se a um estudo de regressão logística, com o objectivo de tentar correlacionar as diferentes cultivares com as respectivas composições fenólicas. Para tal, as variáveis preditivas foram seleccionadas através do método designado como “step-down procedure”, no qual a decisão de remover uma variável é baseada no teste “likelihood-ratio test” (Hosmer e Lemeshow, 1989). Com base nas variáveis seleccionadas procedeu-se em seguida a uma análise de PCA.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Aveleira

Os espectros UV/Vis, obtidos por HPLC/DAD, associados aos diferentes picos obtidos, revelaram que os dois grupos principais de compostos existentes no extracto de folha de aveleira seriam ácidos fenólicos (correspondendo aos picos 1 a 4 da Figura 1.3) e flavonóides (correspondendo aos picos 5 a 9 da Figura 1.3). A análise dos extractos por HPLC/DAD/ESI-MS/MS permitiu identificar um maior número de compostos.

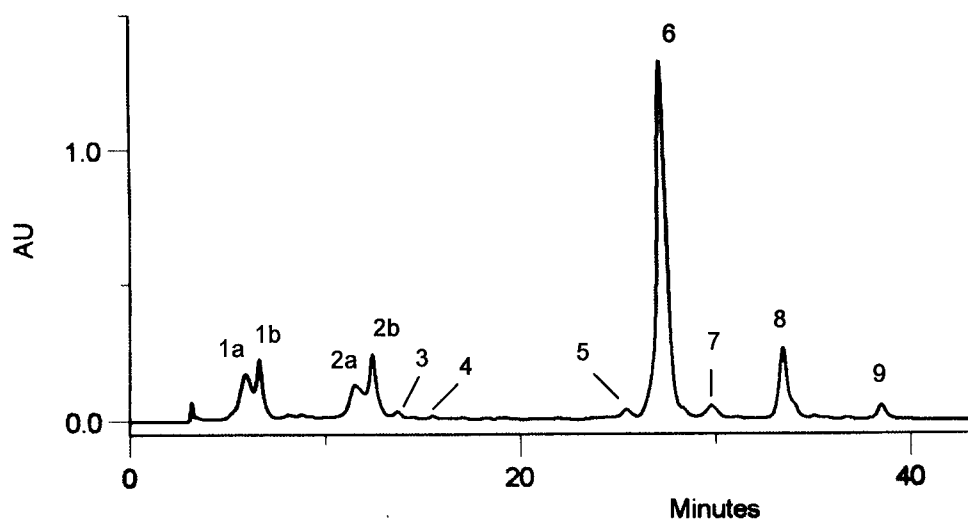


FIGURA 1.3. Cromatograma representativo do perfil fenólico da folha de aveleira. Visualização a 320 nm. **1a e 1b:** isómeros do ácido 3-cafeoilquínico; **2a e 2b:** isómeros do ácido 5-cafeoilquínico; **3:** ácido cafeoiltartárico; **4:** ácido *p*-cumaroiltartárico; **5:** miricetina 3-hexósido + derivado da miricetina; **6:** miricetina 3-ramnósido; **7:** quercetina 3-hexósido + derivado da miricetina; **8:** quercetina 3-ramnósido; **9:** campferol 3-ramnósido.

PICOS 1 E 2: a análise dos tempos de retenção e espectros UV (246, 290 sh, 325 nm) dos compostos sugeria a presença de derivados do ácido cinâmico. Qualquer dos compostos originou um ião pseudo-molecular $[M - H]^-$ com m/z 353,6 cuja fragmentação, também em ambos os casos, originou, como pico base, um ião m/z 191,5 ($[M - H]^- - 162$), que corresponde ao ácido quínico, pela perda do radical cafeoil por parte do ião pseudomolecular. Estes dados indicam estarmos em presença de ácidos cafeoilquínicos.

Conforme descrito por Clifford *et al.* (2003), a localização do resíduo de ácido cafeico pode ser feita pela análise da intensidade dos sinais na segunda fragmentação. No estudo MS/MS obteve-se um ião m/z 179,5 com uma abundância de 35% para o composto correspondente ao pico 1 e com uma abundância de 2% para o composto correspondente ao pico 2 o que, segundo os referidos autores, é característico dos **ácidos 3-cafeoilquínico e 5-cafeoilquínico**, respectivamente.

PICOS 3 E 4: o composto 3 originou um ião pseudomolecular $[M - H]^-$ com m/z 311,4 que, por MS/MS, originou dois iões com m/z 179,2 ($[M - 2H]^- - 132$) e 149,2 ($[M - H]^- - 162$) correspondendo, respectivamente, à perda de ácido tartárico e ácido cafeico. De acordo com estes dados, o composto 3 foi identificado como **ácido cafeoiltartárico**. O composto 4 originou um perfil de MS/MS idêntico, diferindo no facto que os iões gerados pelo composto 4 apresentaram m/z 16 u.m.a. mais baixos que os obtidos para o composto 3. Desta forma, a fragmentação do ião pseudomolecular do composto 4, com m/z 295,3 originou a formação

do ião com m/z 163,1, que corresponde a [ácido *p*-cumárico – H]. De acordo com estes dados o composto 4 foi identificado como **ácido *p*-cumaroiltartárico**.

PICO 5: os dados de HPLC/MS obtidos sugerem a co-eluição de dois compostos, aqui designados por 5a e 5b. O composto 5a é, provavelmente, um hexósido em posição 3 da miricetina, uma vez que o estudo MS/MS do seu ião pseudomolecular ($[M - H]^-$) com m/z 479,1 originou um m/z de 316,0 que é característico da miricetina (318 – 2H), quando se trabalha em modo de ionização negativo. Estes dados são confirmados pela análise do espectro UV-vis. O outro composto (5b) originou um ião pseudomolecular $[M - H]^-$ com m/z 625,2, originando três iões na fragmentação MS/MS: 478,9 ($[M - H]^- - \text{ramnose}$), 462,9 ($[M - H]^- - \text{glucose}$) e 317,0 [479 – 162 (hexose) ou 463 – 146 (ramnose)]. Estes dados sugerem a presença de miricetina (317) + hexose (162) + ramnose (146). A análise do espectro UV deste composto parece indicar que o hidroxilo na posição 3 não se encontra livre. Por outro lado, a fragmentação MS/MS mostra que os iões que resultam da perda de um açúcar são mais importantes do que o da aglicona (em oposição ao que se verifica com o ramnoglucósido, em que o pico base é o da aglicona) o que reforça a ideia de que os dois açúcares estão ligados a dois locais diferentes da genina.

Tendo em consideração a via biossintética e que o flavonóide maioritário em todas as amostras analisadas é a miricetina-3-ramnósido concluiu-se que, muito provavelmente, a ramnose é o açúcar localizado na posição 3 enquanto a hexose poderá estar na posição 7 ou no anel B (em posição 3' ou 4'). Com o objectivo de obter mais informações sobre este composto, realizou-se um estudo HPLC/DAD/ESI-MS/MS de dois isómeros que diferem na posição do açúcar: isoramnetina-7-glucósido e isoramnetina-4'-glucósido. Os dados obtidos relativos à ordem de eluição parecem sugerir que o composto 5b será possivelmente a **miricetina 3-ramnósido-7-hexósido**. De referir ainda, que numa pesquisa realizada na literatura (Harborne, 1989) com vista a encontrar possíveis derivados da miricetina com hexose e ramnose localizados em hidroxilos fenólicos distintos, encontrou-se a miricetina 3-ramnósido-7-glucósido descrito na espécie *Quercus rubra*, pertencente à família das Fagáceas, que é uma família próxima da família das Betuláceas à qual pertence a aveleira.

PICO 6: este composto originou a formação de um ião pseudomolecular com m/z 463,2, cuja fragmentação gerou um ião com m/z 316,1 ($[M - H]^- - \text{ramnose}$) que, como foi dito anteriormente, é característico da miricetina. A comparação do tempo de retenção, do espectro UV-Vis e dos dados obtidos por espectrometria de massa deste composto com os obtidos para o padrão de **miricetina 3-ramnósido** confirmou a identidade deste composto

PICO 7: neste pico verificou-se a co-eluição de dois compostos (designados 7a e 7b) com iões pseudomolecular $[M - H]^-$ com m/z 463,6 e 625,2, respectivamente. O composto 7a foi identificado como **quercetina 3-hexósido**, uma vez que o estudo MS/MS do seu ião

pseudomolecular gerou um m/z 300,8, característico da quercetina. O composto 7b, com ião pseudomolecular idêntico ao obtido para o composto 5b, apresentou resultados de MS/MS igualmente idênticos aos do composto 5b, o que levou a supor tratar-se de um isómero desse composto, provavelmente a miricetina 3-ramnósido-3'-hexósido ou miricetina 3-ramnósido-4'-hexósido. O composto 7b apesar de ser mais glicosilado, elui posteriormente à miricetina-3-ramnósido, o que poderá ser devido ao bloqueio do hidroxilo 4', uma vez que este é muito ácido.

PICO 8: este pico originou um ião pseudomolecular com m/z 447,3, cuja fragmentação originou um ião com m/z 300,9 ($[M - H]^-$ - ramnose) que, como já foi referido, é característico da quercetina. A comparação dos dados analíticos obtidos para este composto com os obtidos para uma substância de referência permitiram identificar este composto como **quercetina 3-ramnósido**.

PICO 9: este pico originou um ião pseudomolecular $[M - H]^-$ com m/z 431,2 cuja fragmentação originou um ião com m/z 285,0 ($[M - H]^-$ - ramnose), que em ionização no modo negativo é característico de uma tetrahidroxiflavona. Os dados de UV-Vis indicam tratar-se de um derivado do campferol e, por isso, o composto foi identificado como **campferol 3-ramnósido**.

Após identificação do maior número possível de compostos por HPLC/DAD-ESI/MS/MS, procedeu-se ao desenvolvimento de uma metodologia adequada à quantificação dos compostos identificados. Desta forma, foram experimentados diversos gradientes e processos extractivos, tendo-se escolhido os atrás descritos (ver pontos 4 e 5.2 da secção II: páginas 23-25).

O objectivo do desenvolvimento desta metodologia, nomeadamente a sua aplicabilidade a um eventual processo de controlo de qualidade, foi um factor decisivo para a escolha da fase móvel. Tendo em conta que o metanol e as soluções aquosas de ácidos são frequentemente utilizados em metodologias aplicadas à quantificação de compostos fenólicos (Stefova *et al.*, 2003) e que em laboratórios de controlo de qualidade o mesmo tipo de análise é aplicado frequentemente a várias matrizes, optou-se pela utilização dos referidos solventes como fase móvel. Desta forma o mesmo aparelho, operando com a mesma coluna e o mesmo conjunto de eluentes, poderá eventualmente ser utilizado em análises semelhantes, isto é, em situações em que os mesmo eluentes, ainda que com gradientes diferentes, sejam utilizados permitindo uma rentabilização de recursos. Após a escolha dos eluentes, procedeu-se à optimização do gradiente para a matriz em estudo. O gradiente descrito na secção II-5.2 (página 25) foi aquele que permitiu a melhor separação dos compostos num razoável período de tempo.

O processo extractivo aplicado a esta matriz foi escolhido com base em informações da literatura, mas também pela sua simplicidade, permitindo uma fácil implementação em processos de controlo de qualidade. Para além do metanol, testaram-se outros solventes, nomeadamente etanol e água acidificada a pH 2, e também a utilização de colunas de extracção em fase sólida.

Em termos gerais, as amostras analisadas apresentaram um perfil qualitativo idêntico (Figura 1.3), composto por cinco compostos fenólicos identificados: ácido 5-cafeoilquínico, miricetina 3-ramnósido, quercetina 3-ramnósido, quercetina 3-glucósido e campferol 3-ramnósido e ainda a presença de dois derivados da miricetina, eluindo simultaneamente, resultando na presença de um pico localizado caracteristicamente antes da miricetina 3-ramnósido. Foram registadas diferenças qualitativas entre as diferentes amostras relativamente à presença dos ácidos 3-cafeoilquínico, cafeoiltartárico e *p*-cumaroiltartárico, conforme será detalhado posteriormente. No entanto, estes dois últimos, existem em quantidades muito pequenas e por isso o facto de não terem sido detectados em algumas amostras poderá traduzir não uma característica da cultivar, mas sim uma consequência do método analítico.

Considerando que para a determinação do perfil químico de uma dada espécie não só é importante a identificação qualitativa dos seus constituintes, mas também o conhecimento das suas quantidades e relações entre si, procedeu-se à quantificação dos compostos identificados nos extractos metanólicos de folha de aveleira. Considerando que para esta matriz não se encontrou qualquer referência bibliográfica relativamente ao período de colheita tradicionalmente utilizado, procedeu-se à recolha de amostras mensais entre Maio e Setembro durante o primeiro ano de estudos (2002). Este procedimento foi feito com o objectivo de inferir qual o mês, ou meses, em que há teores mais elevados de compostos fenólicos. Todas as amostras foram obtidas no mesmo campo (situado em Vila Real), de árvores sujeitas às mesmas práticas agrícolas. Sendo incomportável o estudo mensal das 19 cultivares existentes no campo, seleccionaram-se 4 cultivares (Butler, Ennis, Fertille de Coutard e Tonda di Giffoni) segundo a sua representatividade agrícola e económica. Para a mesma cultivar, todas as amostras mensais foram recolhidas da mesma árvore.

A Tabela 1.3 mostra a composição fenólica das cultivares estudadas mensalmente. Pode verificar-se que, apesar de se observarem algumas diferenças a nível dos ácidos fenólicos minoritários, os quais não foram detectados em algumas das amostras estudadas, o perfil qualitativo mantém-se, de uma forma global, relativamente constante. Analisando os teores totais de compostos fenólicos para cada cultivar, verifica-se que de Maio a Julho todas elas apresentaram aumentos, sofrendo posteriormente uma diminuição dos mesmos (Tabela 1.3 e Figura 1.4).

TABELA 1.3. Composição fenólica (g/kg de amostra seca)^a das amostras de folha de aveleira recolhidas em Vila Real entre Maio e Setembro de 2002.

| | Composto Fenólico | | | | | | | | | | Total |
|-----------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------|-------|
| | 3Cqa | 5Cqa | Caft | pCt | Mder | M3ram | Q3hex | Q3ramn | K3ram | Total | |
| MAIO | | | | | | | | | | | |
| Butler | 0,21 ± 0,02 | 2,69 ± 0,18 | 0,01 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 0,53 ± 0,02 | 10,94 ± 0,76 | 0,32 ± 0,01 | 1,68 ± 0,12 | 0,21 ± 0,01 | 16,7 | |
| Ennis | 0,18 ± 0,01 | 2,61 ± 0,17 | 0,01 ± 0,00 | 0,06 ± 0,01 | 0,78 ± 0,05 | 9,38 ± 0,44 | 0,42 ± 0,01 | 1,44 ± 0,06 | 0,13 ± 0,00 | 15,0 | |
| F. Coutard | 0,10 ± 0,00 | 2,45 ± 0,01 | nd | 0,06 ± 0,00 | 0,36 ± 0,01 | 8,86 ± 0,02 | 0,38 ± 0,00 | 2,07 ± 0,01 | 0,25 ± 0,00 | 14,5 | |
| T. Giffoni | 0,81 ± 0,07 | 1,21 ± 0,10 | nd | 0,03 ± 0,00 | 0,29 ± 0,02 | 9,91 ± 0,83 | 0,11 ± 0,00 | 1,07 ± 0,09 | 0,13 ± 0,01 | 13,6 | |
| JUNHO | | | | | | | | | | | |
| Butler | 0,13 ± 0,01 | 2,49 ± 0,17 | 0,01 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 0,83 ± 0,06 | 15,47 ± 1,50 | 0,53 ± 0,01 | 3,03 ± 0,24 | 0,33 ± 0,03 | 22,9 | |
| Ennis | 0,13 ± 0,01 | 1,68 ± 0,01 | nd | 0,03 ± 0,00 | 0,69 ± 0,00 | 9,42 ± 0,10 | 0,39 ± 0,01 | 1,51 ± 0,01 | 0,12 ± 0,00 | 14,0 | |
| F. Coutard | 0,20 ± 0,00 | 1,54 ± 0,11 | 0,01 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,44 ± 0,01 | 9,82 ± 0,34 | 0,76 ± 0,00 | 2,18 ± 0,09 | 0,23 ± 0,00 | 15,2 | |
| T. Giffoni | 0,89 ± 0,00 | 1,23 ± 0,09 | nd | 0,03 ± 0,00 | 0,40 ± 0,00 | 12,02 ± 0,07 | 0,22 ± 0,00 | 1,42 ± 0,01 | 0,18 ± 0,00 | 16,4 | |
| JULHO | | | | | | | | | | | |
| Butler | nd | 2,34 ± 0,03 | 0,02 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,92 ± 0,05 | 18,24 ± 0,62 | 1,01 ± 0,08 | 3,56 ± 0,03 | 0,37 ± 0,01 | 26,5 | |
| Ennis | nd | 3,34 ± 0,07 | 0,01 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 1,36 ± 0,00 | 18,07 ± 0,47 | 1,15 ± 0,02 | 3,44 ± 0,01 | 0,30 ± 0,01 | 27,7 | |
| F. Coutard | nd | 1,93 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,44 ± 0,01 | 14,79 ± 0,05 | 1,14 ± 0,01 | 3,53 ± 0,02 | 0,35 ± 0,00 | 22,2 | |
| T. Giffoni | 1,16 ± 0,00 | 1,11 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | nd | 0,30 ± 0,01 | 11,71 ± 0,01 | 0,33 ± 0,01 | 1,74 ± 0,00 | 0,22 ± 0,01 | 16,6 | |
| AGOSTO | | | | | | | | | | | |
| Butler | nd | 0,48 ± 0,03 | nd | 0,01 ± 0,00 | 0,16 ± 0,00 | 6,04 ± 0,18 | 0,32 ± 0,01 | 1,52 ± 0,05 | 0,19 ± 0,00 | 8,7 | |
| Ennis | nd | 0,36 ± 0,02 | nd | 0,01 ± 0,00 | 0,23 ± 0,00 | 3,82 ± 0,14 | 0,37 ± 0,02 | 0,71 ± 0,04 | 0,10 ± 0,00 | 5,6 | |
| F. Coutard | nd | 0,23 ± 0,01 | nd | nd | 0,13 ± 0,01 | 4,01 ± 0,01 | 0,41 ± 0,00 | 1,08 ± 0,03 | 0,14 ± 0,01 | 6,0 | |
| T. Giffoni | 0,03 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | nd | nd | 0,04 ± 0,00 | 1,79 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 0,47 ± 0,01 | 0,07 ± 0,00 | 2,5 | |
| SETEMBRO | | | | | | | | | | | |
| Butler | nd | 0,93 ± 0,07 | 0,02 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,34 ± 0,02 | 7,30 ± 0,29 | 0,40 ± 0,03 | 1,20 ± 0,05 | 0,10 ± 0,00 | 10,3 | |
| Ennis | 0,07 ± 0,01 | 1,23 ± 0,10 | 0,02 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,71 ± 0,04 | 8,20 ± 0,62 | 1,81 ± 0,15 | 1,50 ± 0,12 | 0,12 ± 0,01 | 13,7 | |
| F. Coutard | nd | 0,59 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,39 ± 0,00 | 7,59 ± 0,14 | 1,72 ± 0,03 | 1,82 ± 0,04 | 0,22 ± 0,01 | 12,4 | |
| T. Giffoni | 0,51 ± 0,03 | 0,62 ± 0,03 | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,44 ± 0,00 | 9,96 ± 0,97 | 0,48 ± 0,03 | 1,29 ± 0,12 | 0,10 ± 0,00 | 13,4 | |

^a média ± desvio padrão de três determinações para cada amostra; nd: não detectado; 3Cqa: ác. 3-caffeoilquinico; 5Cqa: ác. 5-caffeoilquinico; Caft: ác. cafeoiltartárico; pCt: ác. p-cumaroiltartárico; Mder: soma de derivados da miricetina (miricetina 3-hexósido + derivado da miricetina); M3ram: miricetina 3-ramnósido; Q3hex: quercetina 3-hexósido + derivado da miricetina; Q3ramn: quercetina 3-ramnósido; K3ram: campferol 3-ramnósido.

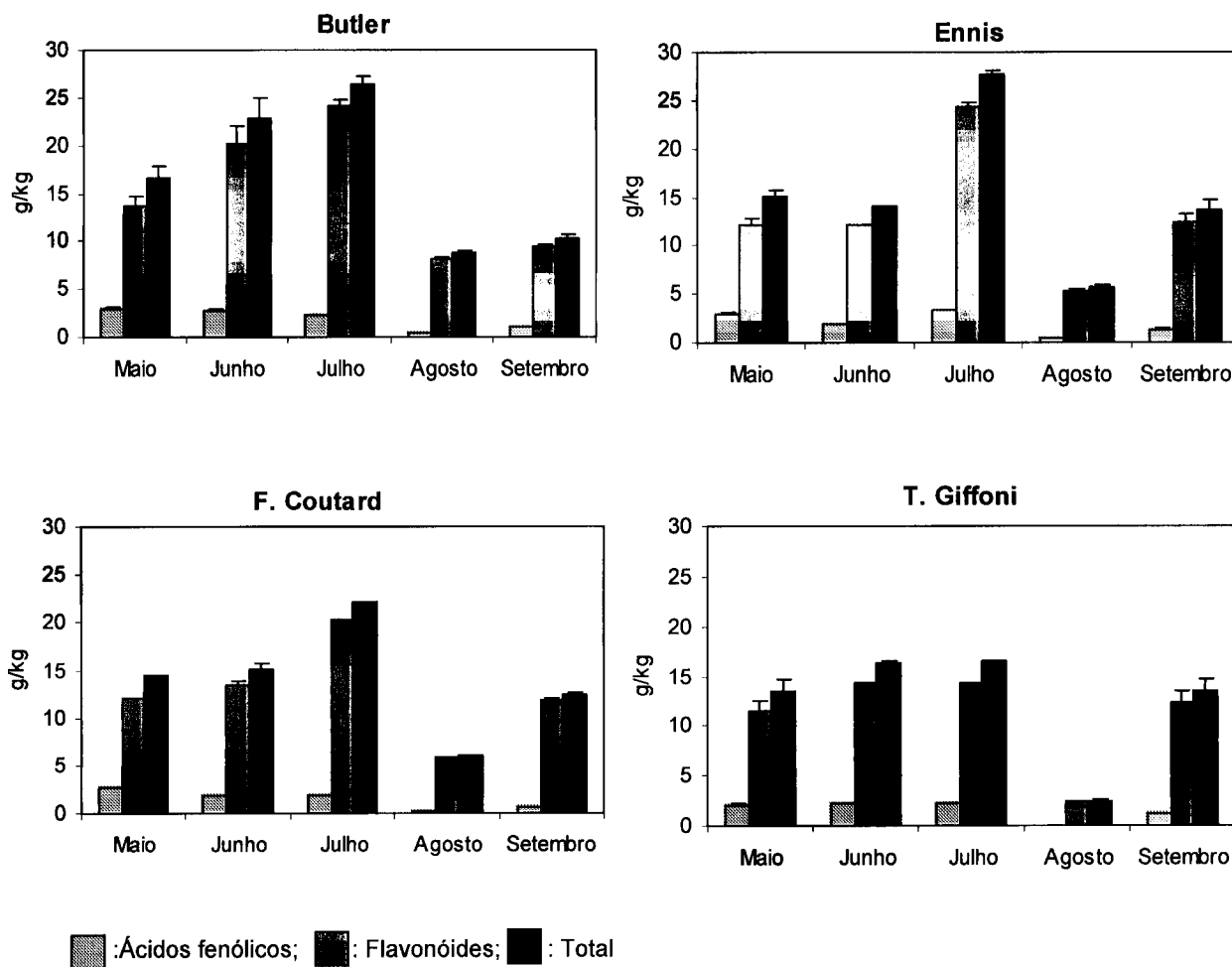


FIGURA 1.4. Evolução dos teores (g/kg) de ácidos fenólicos, flavonóides e compostos fenólicos totais, para cada cultivar estudada, entre Maio e Setembro de 2002. Os desvios padrão encontram-se no topo de cada coluna.

Pela observação dos gráficos apresentados na Figura 1.4 verifica-se que, apesar das quatro cultivares estudadas apresentarem consideráveis diferenças quantitativas entre si, apresentam um padrão similar de aumentos e decréscimos ao longo do período estudado. De uma forma geral, todas as cultivares apresentaram os teores mais elevados de ácidos fenólicos e flavonóides nas amostras colhidas em Julho, apresentando em Agosto um decréscimo acentuado no teor de todos os compostos estudados, ocorrendo em Setembro um aumento dos mesmos.

No entanto, refira-se que o aumento verificado entre os meses de Maio e Julho para a cultivar Tonda di Giffoni revelou-se menos significativo comparativamente com as restantes cultivares. Apesar de o referido aumento ter sido maior para a cultivar Ennis, as cultivares Ennis e Fertille de Coutard parecem apresentar um comportamento global idêntico, uma vez que ambas apresentam uma diminuição dos teores de ácidos fenólicos e valores idênticos de flavonóides nos meses de Maio e Junho, após o que se verifica um aumento dos teores de

ambos, atingindo-se os valores máximos em Julho. Em Agosto verifica-se, em ambas as cultivares, um decréscimo acentuado de todos os compostos estudados, após o que ocorre um aumento dos teores da globalidade dos compostos, especialmente acentuado no caso dos flavonóides, por forma a que em Setembro se obtêm valores próximos dos verificados em Maio e Junho.

Relativamente à cv. Butler, verifica-se um aumento gradual ao longo dos três primeiros meses estudados, verificando-se uma quebra acentuada de todos os compostos nas amostras referentes ao mês de Agosto. Contrariamente ao verificado nas restantes cultivares, em Setembro verificou-se apenas um ligeiro aumento dos teores de ácidos fenólicos e flavonóides relativamente aos verificados em Agosto, sendo os valores obtidos muito inferiores comparativamente aos verificados em Maio e Junho para a mesma cultivar. A cv. Tonda di Giffoni, apesar de apresentar uma leve tendência de aumento do teor de ácidos fenólicos e flavonóides, apresentou teores idênticos dos referidos compostos nos meses de Maio, Junho, Julho e Setembro, sendo no entanto de salientar a abrupta diminuição de teores ocorrida em Agosto, sendo esta a cultivar que apresentou os teores mais baixos de todos os compostos no referido mês.

Considerando os valores médios obtidos tendo em conta as quatro cultivares, os teores em ácidos fenólicos, flavonóides e total de compostos fenólicos parecem apontar para um aumento destes composto entre Maio e Julho, ocorrendo em Agosto uma diminuição significativa e novamente um aumento em Setembro (Figura 1.5).

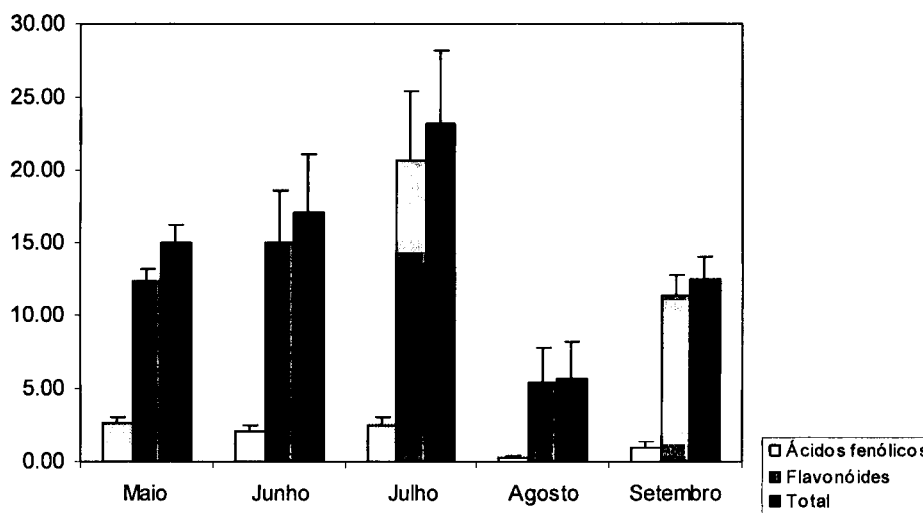


FIGURA 1.5. Evolução dos teores (g/kg) de ácidos fenólicos, flavonóides e compostos fenólicos totais, entre Maio e Setembro de 2002. Resultados médios das quatro cultivares de aveleira analisadas; os desvios padrão encontram-se no topo de cada coluna.

Riipi e colaboradores (2002) descrevem um comportamento semelhante na bétula (*Betula pendula*). Estes autores verificaram variações da concentração de flavonóides (derivados da

quercetina, campferol e miricetina) e ácidos fenólicos (3-cafeoilquínico, 5-cafeoilquínico e derivados do ácido *p*-cumárico) similares aos verificados na folha de aveleira. Os referidos autores pretenderam verificar a existência, ou não, de determinados fenómenos descritos por duas teorias:

- a primeira refere a existência de competição pelos recursos de carbono, sendo que, em situações favoráveis ao crescimento, existiria um favorecimento dos processos de crescimento em detrimento da produção de metabolitos secundários ricos em carbono;
- a segunda refere a competição pela L-fenilalanina, precursor comum da síntese de proteínas e de fenóis.

Os dados obtidos pelos autores parecem não evidenciar interações entre o crescimento foliar e a produção de compostos fenólicos, uma vez que se verificaram aumentos da concentração no início da Primavera (época em que as novas folhas começam a despontar e existe um intenso crescimento foliar), e diminuição no Verão (época de maior actividade fotossintética das folhas desenvolvidas), contrariando desta forma ambas as teorias. Os autores referem, no entanto, que os resultados obtidos parecem estar de acordo com a teoria de que as folhas novas precisam de uma maior protecção, uma vez que delas depende a obtenção de futuras folhas adultas e conseqüentemente os danos inferidos nas novas folhas irão repercutir-se futuramente na capacidade fotossintética da planta. Em consonância com os resultados verificados, os autores concluem que a acumulação de fenóis nas folhas de bétula parece ser um processo regulado e não uma resposta à disponibilidade de nutrientes. Com base nos resultados obtidos por Riipi *et al.* (2002) e considerando que a bétula e a aveleira pertencem ambas à família das Betuláceas, o facto de se verificar um comportamento similar em ambas as espécies poderá de facto não ser fruto do acaso. Apesar dos dados obtidos no trabalho apresentado nesta dissertação não permitirem tirar conclusões relativamente às teorias referidas por Riipi *et al.* (2002), serão certamente úteis no sentido de estimular o desenvolvimento de novos trabalhos que poderão vir, ou não, confirmar as hipóteses e teorias existentes.

De forma a estudar a influência da cultivar, ano e localização geográfica na composição em compostos fenólicos da folha de aveleira foram estudadas 93 amostras, compreendendo um total de 19 cultivares, 3 anos de colheita e 2 localizações geográficas. Com base nos resultados obtidos no primeiro ano de estudo, nos anos seguintes todas as amostras foram recolhidas em meados do mês de Julho. Na Tabela 1.4 apresentam-se os teores médios e correspondentes desvios padrão para cada um dos compostos fenólicos detectados nas cultivares estudadas, por ano de produção e localização geográfica. Apesar de algumas diferenças pontuais no que diz respeito aos três compostos minoritários (ácidos 3-cafeoilquínico, cafeoiltartárico e *p*-cumaroiltartárico), desde logo se constata um perfil qualitativo similar entre as amostras estudadas, independentemente do ano, cultivar ou localização geográfica em causa. A Figura 1.6 mostra o “fingerprint” fenólico construído

mediante os valores médios obtidos para cada composto identificado, considerando a totalidade das amostras estudadas. Nesta figura verifica-se uma considerável amplitude de valores possíveis, principalmente no que diz respeito ao composto maioritário (miricetina 3-ramnósido), uma vez que a barra de erro apresenta uma magnitude elevada. Os valores apresentados na Tabela 1.4 comprovam igualmente a variabilidade verificada relativamente ao composto maioritário e, conseqüentemente, a nível do teor total de compostos fenólicos, o qual variou entre 3,5 e 30,5 mg/kg, o que representa uma amplitude superior a oito vezes.

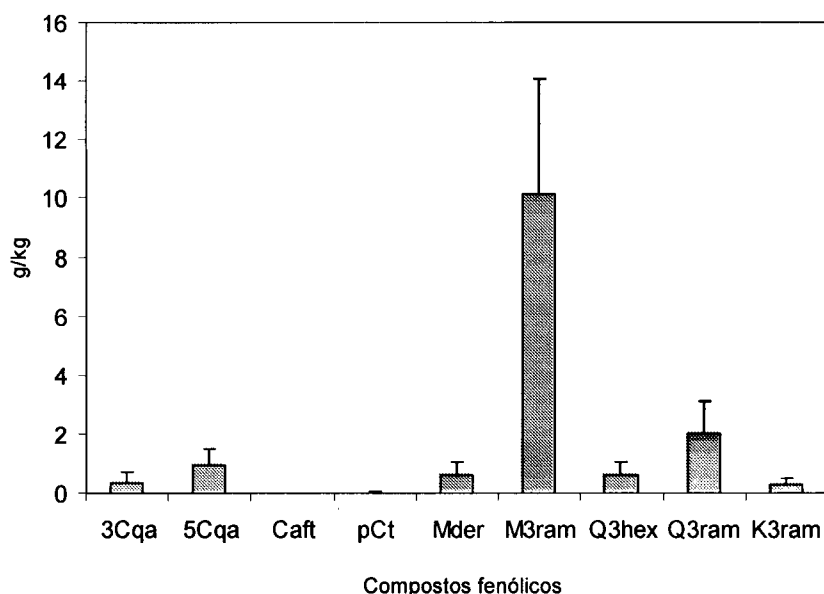


FIGURA 1.6. Perfil fenólico da folha de aveleira (média de todas as amostras estudadas); as barras de erro representam os desvios padrão para cada composto. 3Cqa: ác. 3-cafeoilquínico; 5Cqa: ác. 5-cafeoilquínico; Caft: ác. cafeoiltartárico; pCt: ác. *p*-cumaroiltartárico; Mder: miricetina 3-hexósido + derivado da miricetina; M3ram: miricetina 3-ramnósido; Q3hex: quercetina 3-hexósido + derivado da miricetina; Q3ramn: quercetina 3-ramnósido; K3ram: campferol 3-ramnósido.

Os mesmos valores permitem constatar que, apesar da variabilidade verificada para o perfil quantitativo, à semelhança com o descrito para o perfil qualitativo, podem ser referidas algumas características comuns entre as cultivares analisadas. De facto, em todas as amostras estudadas a miricetina 3-ramnósido foi o composto maioritário seguindo-se-lhe a quercetina 3-ramnósido. O ácido 5-cafeoilquínico foi o ácido fenólico existente em quantidade superior. Estes compostos foram anteriormente descritos por Fraisse *et al.* (1999), sendo os teores determinados neste trabalho idênticos aos referidos pelos autores.

TABELA 1.4. Composição fenólica (g/kg de folha de avela)^a das cultivares estudadas, por ano de produção e localização geográfica.

| Cultivar | Composto Fenólico | | | | | | | | | | Total |
|-------------------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------|-------|
| | 3Cqa | 5Cqa | Caft | pCt | Mder | M3ram | Q3hex | Q3ram | K3ram | | |
| Ano: 2002 | | | | | | | | | | | |
| Vila Real | | | | | | | | | | | |
| Butler | nd | 2,34 ± 0,03 | 0,02 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,92 ± 0,05 | 18,24 ± 0,62 | 1,01 ± 0,08 | 3,56 ± 0,03 | 0,37 ± 0,01 | 26,48 | |
| Campanica | nd | 1,69 ± 0,04 | 0,02 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 1,29 ± 0,01 | 14,01 ± 0,30 | 1,44 ± 0,03 | 3,68 ± 0,03 | 0,28 ± 0,01 | 22,42 | |
| Cosford | nd | 2,26 ± 0,08 | 0,02 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 1,09 ± 0,02 | 18,13 ± 0,12 | 1,27 ± 0,05 | 3,83 ± 0,07 | 0,21 ± 0,01 | 26,83 | |
| Couplat | nd | 0,51 ± 0,03 | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 1,00 ± 0,01 | 12,43 ± 0,23 | 0,65 ± 0,09 | 1,80 ± 0,02 | 0,15 ± 0,00 | 16,55 | |
| Daviana | nd | 1,68 ± 0,09 | 0,01 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 1,16 ± 0,01 | 15,72 ± 0,58 | 0,56 ± 0,04 | 2,62 ± 0,14 | 0,21 ± 0,00 | 21,97 | |
| Ennis | nd | 3,34 ± 0,07 | 0,01 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 1,36 ± 0,00 | 18,07 ± 0,47 | 1,15 ± 0,02 | 3,44 ± 0,01 | 0,30 ± 0,01 | 27,68 | |
| F. Coutard | nd | 1,93 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,44 ± 0,01 | 14,79 ± 0,05 | 1,14 ± 0,01 | 3,53 ± 0,02 | 0,35 ± 0,00 | 22,19 | |
| Grossal | nd | 1,21 ± 0,02 | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,53 ± 0,02 | 10,60 ± 0,00 | 0,58 ± 0,01 | 2,20 ± 0,00 | 0,27 ± 0,00 | 15,41 | |
| Gunslebert | 1,73 ± 0,06 | 2,30 ± 0,11 | 0,01 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 1,47 ± 0,09 | 16,20 ± 0,62 | 0,86 ± 0,05 | 2,89 ± 0,14 | 0,47 ± 0,02 | 25,95 | |
| Lansing | 0,07 ± 0,00 | 2,33 ± 0,01 | 0,01 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,90 ± 0,01 | 13,71 ± 0,08 | 0,54 ± 0,01 | 2,09 ± 0,03 | 0,32 ± 0,00 | 19,98 | |
| L. Espanha | nd | 1,06 ± 0,05 | nd | 0,02 ± 0,00 | 2,01 ± 0,09 | 19,09 ± 0,89 | 2,19 ± 0,15 | 3,73 ± 0,25 | 0,24 ± 0,02 | 28,34 | |
| M. Bollwiller | 1,68 ± 0,00 | 0,93 ± 0,03 | nd | 0,01 ± 0,00 | 0,49 ± 0,01 | 12,66 ± 0,00 | 1,14 ± 0,02 | 4,50 ± 0,06 | 0,25 ± 0,00 | 19,99 | |
| Morell | 0,76 ± 0,02 | 0,97 ± 0,11 | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,63 ± 0,04 | 9,18 ± 0,47 | 0,77 ± 0,09 | 1,56 ± 0,13 | 0,20 ± 0,01 | 14,09 | |
| Negreta | 1,22 ± 0,03 | 0,77 ± 0,02 | nd | 0,01 ± 0,00 | 0,67 ± 0,01 | 16,64 ± 0,43 | 0,82 ± 0,02 | 4,05 ± 0,13 | 0,70 ± 0,04 | 23,67 | |
| Pauetet | nd | 1,76 ± 0,04 | 0,01 ± 0,00 | nd | 2,25 ± 0,03 | 20,19 ± 0,32 | 1,12 ± 0,02 | 3,68 ± 0,13 | 1,02 ± 0,01 | 30,02 | |
| R. Piemont | nd | 0,87 ± 0,03 | nd | 0,02 ± 0,00 | 0,51 ± 0,03 | 16,29 ± 0,57 | 0,97 ± 0,05 | 3,88 ± 0,13 | 0,30 ± 0,01 | 22,85 | |
| Segorbe | 1,43 ± 0,01 | 1,13 ± 0,03 | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,48 ± 0,01 | 16,36 ± 0,06 | 0,23 ± 0,00 | 1,57 ± 0,04 | 0,19 ± 0,00 | 21,40 | |
| S. M ^a Jesus | nd | 1,34 ± 0,02 | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,47 ± 0,01 | 14,43 ± 0,25 | 0,84 ± 0,02 | 4,68 ± 0,13 | 0,39 ± 0,01 | 22,16 | |
| T. Giffoni | 1,16 ± 0,00 | 1,11 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | nd | 0,30 ± 0,01 | 11,71 ± 0,01 | 0,33 ± 0,01 | 1,74 ± 0,00 | 0,22 ± 0,01 | 16,59 | |
| Felgueiras | | | | | | | | | | | |
| Butler | 0,27 ± 0,00 | 1,62 ± 0,06 | 0,02 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,16 ± 0,01 | 10,16 ± 0,12 | 0,11 ± 0,00 | 1,32 ± 0,02 | 0,20 ± 0,00 | 13,89 | |
| Campanica | 0,17 ± 0,01 | 1,20 ± 0,09 | nd | 0,04 ± 0,00 | 1,25 ± 0,05 | 10,75 ± 0,46 | 0,29 ± 0,01 | 1,34 ± 0,11 | 0,42 ± 0,01 | 15,46 | |
| Cosford | 0,16 ± 0,02 | 0,95 ± 0,08 | nd | 0,02 ± 0,00 | 0,34 ± 0,03 | 9,55 ± 0,51 | 0,20 ± 0,01 | 2,08 ± 0,19 | 0,19 ± 0,01 | 13,49 | |
| Couplat | 0,16 ± 0,01 | 0,42 ± 0,02 | nd | 0,02 ± 0,00 | 0,63 ± 0,03 | 7,35 ± 0,32 | 0,44 ± 0,02 | 1,58 ± 0,03 | 0,13 ± 0,01 | 10,73 | |
| Ennis | 0,20 ± 0,01 | 1,32 ± 0,06 | 0,01 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,59 ± 0,03 | 8,21 ± 0,35 | 0,36 ± 0,03 | 1,07 ± 0,06 | 0,10 ± 0,00 | 11,88 | |
| Fcoutard | 0,16 ± 0,02 | 1,32 ± 0,13 | 0,01 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,31 ± 0,03 | 8,35 ± 0,75 | 0,29 ± 0,01 | 1,72 ± 0,17 | 0,22 ± 0,01 | 12,41 | |
| M. Bollwiller | 1,02 ± 0,02 | 0,67 ± 0,04 | 0,01 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,77 ± 0,03 | 10,89 ± 0,39 | 0,62 ± 0,02 | 2,15 ± 0,07 | 0,16 ± 0,00 | 16,34 | |
| Morell | 0,49 ± 0,02 | 0,70 ± 0,04 | nd | 0,02 ± 0,00 | 1,06 ± 0,06 | 6,72 ± 0,43 | 0,29 ± 0,01 | 1,12 ± 0,04 | 0,12 ± 0,01 | 10,53 | |
| Pauetet | 0,10 ± 0,01 | 0,70 ± 0,01 | nd | 0,04 ± 0,00 | 0,48 ± 0,01 | 9,09 ± 0,34 | 0,55 ± 0,07 | 1,62 ± 0,04 | 0,37 ± 0,01 | 12,96 | |
| Tgiffoni | 0,34 ± 0,03 | 0,52 ± 0,02 | nd | 0,01 ± 0,00 | 0,36 ± 0,03 | 7,80 ± 0,52 | 0,24 ± 0,02 | 1,10 ± 0,08 | 0,12 ± 0,01 | 10,48 | |

^a média ± desvio padrão de três determinações; nd: não detectado; designação dos compostos como descrito na Tabela 1.3.

continuação da Tabela 1.4.

| Cultivar | 3Cqa | 5Cqa | Caft | pCt | Mder | M3ram | Q3hex | Q3ram | K3ram | Total |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| Ano: 2003 | | | | | | | | | | |
| Vila Real | | | | | | | | | | |
| Butler | 0,11 ± 0,00 | 1,65 ± 0,01 | nd | 0,04 ± 0,00 | 0,52 ± 0,00 | 11,48 ± 0,30 | 0,41 ± 0,00 | 2,04 ± 0,05 | 0,25 ± 0,00 | 16,49 |
| Campanica | 0,17 ± 0,00 | 0,72 ± 0,04 | nd | 0,02 ± 0,00 | 0,74 ± 0,04 | 7,26 ± 0,50 | 0,86 ± 0,07 | 2,06 ± 0,13 | 0,20 ± 0,01 | 12,03 |
| Cosford | 0,15 ± 0,01 | 0,80 ± 0,03 | nd | 0,05 ± 0,01 | 0,41 ± 0,03 | 10,35 ± 0,07 | 0,47 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 1,81 ± 0,01 | 14,08 |
| Couplat | 0,14 ± 0,00 | 0,42 ± 0,02 | nd | 0,02 ± 0,00 | 0,82 ± 0,05 | 10,97 ± 0,75 | 1,38 ± 0,09 | 1,72 ± 0,09 | 0,29 ± 0,02 | 15,75 |
| Daviana | 0,08 ± 0,00 | 1,00 ± 0,08 | 0,01 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,92 ± 0,03 | 11,81 ± 0,65 | 0,53 ± 0,01 | 2,01 ± 0,09 | 0,16 ± 0,01 | 16,53 |
| Ennis | 0,10 ± 0,01 | 1,16 ± 0,04 | nd | 0,03 ± 0,00 | 0,68 ± 0,05 | 21,68 ± 0,76 | 1,30 ± 0,06 | 5,17 ± 0,17 | 0,41 ± 0,01 | 30,51 |
| F. Coutard | 0,27 ± 0,00 | 0,97 ± 0,07 | nd | 0,02 ± 0,00 | 0,21 ± 0,01 | 8,61 ± 0,50 | 0,29 ± 0,01 | 1,39 ± 0,08 | 0,18 ± 0,01 | 11,95 |
| Grossal | 0,06 ± 0,00 | 0,82 ± 0,03 | nd | 0,03 ± 0,00 | 0,39 ± 0,02 | 6,09 ± 0,24 | 0,37 ± 0,02 | 1,51 ± 0,06 | 0,23 ± 0,01 | 9,49 |
| Gunslebert | 0,88 ± 0,02 | 1,38 ± 0,11 | nd | 0,03 ± 0,00 | 0,83 ± 0,04 | 8,05 ± 0,53 | 0,28 ± 0,03 | 1,46 ± 0,11 | 0,21 ± 0,01 | 13,13 |
| Lansing | 0,16 ± 0,01 | 1,22 ± 0,11 | nd | 0,02 ± 0,00 | 0,49 ± 0,02 | 8,10 ± 0,72 | 0,41 ± 0,02 | 1,34 ± 0,12 | 0,24 ± 0,02 | 11,97 |
| L. Espanha | 0,09 ± 0,01 | 0,73 ± 0,06 | nd | 0,04 ± 0,00 | 1,84 ± 0,17 | 15,92 ± 1,57 | 1,20 ± 0,13 | 2,77 ± 0,21 | 0,27 ± 0,02 | 22,86 |
| M. Bollwiller | 1,05 ± 0,02 | 0,61 ± 0,05 | nd | 0,03 ± 0,00 | 0,61 ± 0,02 | 11,32 ± 0,72 | 0,91 ± 0,03 | 3,56 ± 0,28 | 0,22 ± 0,01 | 18,32 |
| Morell | 0,25 ± 0,00 | 0,61 ± 0,03 | nd | 0,02 ± 0,00 | 1,11 ± 0,12 | 8,39 ± 0,53 | 0,62 ± 0,03 | 1,63 ± 0,08 | 0,19 ± 0,04 | 12,83 |
| Negreta | 0,81 ± 0,03 | 0,54 ± 0,01 | nd | 0,02 ± 0,00 | 0,55 ± 0,01 | 11,39 ± 0,13 | 0,62 ± 0,01 | 2,35 ± 0,02 | 0,41 ± 0,00 | 16,68 |
| Pauetet | 0,07 ± 0,00 | 1,05 ± 0,01 | 0,01 ± 0,00 | nd | 1,57 ± 0,03 | 13,46 ± 0,35 | 0,76 ± 0,01 | 2,97 ± 0,05 | 0,73 ± 0,02 | 20,61 |
| R. Piemont | 0,11 ± 0,00 | 0,82 ± 0,06 | nd | 0,04 ± 0,00 | 0,36 ± 0,02 | 10,98 ± 0,72 | 0,52 ± 0,03 | 2,87 ± 0,17 | 0,29 ± 0,02 | 16,00 |
| Segorbe | 0,87 ± 0,04 | 0,85 ± 0,07 | nd | 0,02 ± 0,00 | 0,30 ± 0,00 | 12,86 ± 0,98 | 0,25 ± 0,01 | 1,25 ± 0,10 | 0,15 ± 0,01 | 16,55 |
| S.M ^a Jesus | 0,10 ± 0,01 | 1,19 ± 0,10 | nd | 0,03 ± 0,00 | 0,39 ± 0,02 | 9,58 ± 0,57 | 0,69 ± 0,07 | 2,27 ± 1,76 | 0,26 ± 0,02 | 14,53 |
| T. Giffoni | 0,73 ± 0,05 | 0,94 ± 0,06 | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,34 ± 0,02 | 9,42 ± 0,39 | 0,49 ± 0,02 | 1,54 ± 0,06 | 0,17 ± 0,00 | 13,63 |
| Felgueiras | | | | | | | | | | |
| Butler | 0,11 ± 0,01 | 1,13 ± 0,02 | 0,02 ± 0,02 | 0,02 ± 0,00 | 0,31 ± 0,02 | 8,12 ± 0,26 | 0,21 ± 0,01 | 1,53 ± 0,02 | 0,17 ± 0,01 | 11,62 |
| Campanica | 0,16 ± 0,01 | 0,83 ± 0,07 | nd | 0,05 ± 0,00 | 1,04 ± 0,07 | 9,25 ± 0,81 | 0,21 ± 0,00 | 1,40 ± 0,11 | 0,44 ± 0,03 | 13,39 |
| Cosford | 0,10 ± 0,00 | 0,15 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 2,45 ± 0,10 | 0,06 ± 0,00 | 0,56 ± 0,02 | 0,05 ± 0,00 | 3,46 |
| Couplat | 0,12 ± 0,01 | 0,70 ± 0,07 | 0,01 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,47 ± 0,09 | 6,61 ± 1,32 | 0,16 ± 0,02 | 1,17 ± 0,17 | 0,22 ± 0,01 | 9,49 |
| Ennis | 0,13 ± 0,00 | 0,92 ± 0,07 | 0,03 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,39 ± 0,01 | 6,55 ± 0,55 | 0,25 ± 0,02 | 0,99 ± 0,09 | 0,10 ± 0,01 | 9,40 |
| F. Coutard | 0,10 ± 0,02 | 0,65 ± 0,02 | 0,01 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 4,85 ± 0,27 | 0,13 ± 0,01 | 1,15 ± 0,07 | 0,17 ± 0,01 | 7,17 |
| L. Espanha | 0,04 ± 0,00 | 0,30 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,83 ± 0,08 | 7,19 ± 0,58 | 0,28 ± 0,02 | 1,00 ± 0,08 | 0,07 ± 0,00 | 9,81 |
| M. Bollwiller | 0,26 ± 0,01 | 0,18 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 2,87 ± 0,01 | 0,30 ± 0,00 | 0,91 ± 0,01 | 0,06 ± 0,00 | 4,49 |
| Morell | 0,32 ± 0,02 | 0,61 ± 0,02 | 0,01 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,98 ± 0,03 | 7,07 ± 0,31 | 0,39 ± 0,01 | 1,32 ± 0,06 | 0,16 ± 0,00 | 10,79 |
| Negreta | 0,40 ± 0,03 | 0,33 ± 0,03 | nd | 0,01 ± 0,00 | 0,32 ± 0,01 | 8,89 ± 1,12 | 0,38 ± 0,03 | 2,02 ± 0,14 | 0,36 ± 0,03 | 12,72 |
| Pauetet | 0,04 ± 0,00 | 0,59 ± 0,03 | nd | 0,01 ± 0,00 | 0,17 ± 0,02 | 8,78 ± 0,62 | 0,24 ± 0,01 | 1,64 ± 0,12 | 0,14 ± 0,01 | 11,61 |
| Segorbe | 1,22 ± 0,05 | 1,21 ± 0,05 | 0,01 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,62 ± 0,03 | 12,93 ± 0,67 | 0,34 ± 0,03 | 1,36 ± 0,06 | 0,15 ± 0,01 | 17,88 |
| T. Giffoni | 0,35 ± 0,02 | 0,59 ± 0,01 | 0,01 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,20 ± 0,01 | 6,65 ± 0,10 | 0,07 ± 0,00 | 0,55 ± 0,01 | 0,07 ± 0,00 | 8,54 |

continuação da Tabela 1.4.

| Cultivar | 3Cqa | 5Cqa | Caft | pCt | Mder | M3ram | Q3hex | Q3ram | K3ram | Total |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| Ano: 2004 | | | | | | | | | | |
| Vila Real | | | | | | | | | | |
| Butler | 0,13 ± 0,01 | 1,12 ± 0,09 | 0,02 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,21 ± 0,00 | 6,05 ± 0,62 | 0,22 ± 0,01 | 0,98 ± 0,00 | 0,13 ± 0,01 | 8,92 |
| Campanica | 0,09 ± 0,00 | 0,75 ± 0,09 | nd | 0,03 ± 0,00 | 0,57 ± 0,04 | 11,48 ± 0,64 | 2,24 ± 0,18 | 2,00 ± 0,12 | 0,20 ± 0,01 | 17,36 |
| Cosford | 0,29 ± 0,03 | 1,24 ± 0,09 | 0,04 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,57 ± 0,04 | 9,57 ± 0,61 | 0,75 ± 0,06 | 1,99 ± 0,22 | 0,11 ± 0,00 | 14,57 |
| Couplat | 0,14 ± 0,00 | 0,17 ± 0,01 | nd | nd | 0,15 ± 0,01 | 7,08 ± 0,64 | 0,72 ± 0,05 | 1,89 ± 0,06 | 0,20 ± 0,01 | 10,35 |
| Daviana | 0,10 ± 0,01 | 1,10 ± 0,08 | 0,01 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,96 ± 0,05 | 11,37 ± 0,74 | 0,76 ± 0,04 | 2,24 ± 0,13 | 0,17 ± 0,01 | 16,74 |
| Ennis | 0,16 ± 0,01 | 1,62 ± 0,02 | 0,02 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,73 ± 0,01 | 9,01 ± 0,07 | 0,78 ± 0,00 | 1,44 ± 0,02 | 0,14 ± 0,00 | 13,90 |
| F. Coutard | 0,05 ± 0,00 | 0,47 ± 0,00 | nd | 0,01 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 4,64 ± 0,08 | 0,23 ± 0,01 | 1,04 ± 0,02 | 0,17 ± 0,00 | 6,70 |
| Grossal | 0,04 ± 0,00 | 0,54 ± 0,03 | nd | 0,01 ± 0,00 | 0,40 ± 0,03 | 6,79 ± 0,23 | 1,01 ± 0,02 | 2,22 ± 0,09 | 0,36 ± 0,01 | 11,36 |
| Gunslebert | 0,72 ± 0,04 | 1,25 ± 0,07 | 0,02 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,35 ± 0,01 | 10,33 ± 0,74 | 1,11 ± 0,05 | 2,80 ± 0,20 | 0,34 ± 0,01 | 16,95 |
| Lansing | 0,15 ± 0,01 | 1,13 ± 0,09 | 0,01 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,46 ± 0,03 | 6,68 ± 0,64 | 0,40 ± 0,03 | 1,07 ± 0,10 | 0,20 ± 0,02 | 10,13 |
| L. Espanha | 0,09 ± 0,01 | 0,48 ± 0,04 | 0,01 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,25 ± 0,01 | 6,76 ± 0,29 | 0,80 ± 0,02 | 2,10 ± 0,10 | 0,03 ± 0,00 | 10,54 |
| M. Bollwiller | 0,88 ± 0,06 | 0,44 ± 0,03 | 0,01 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,33 ± 0,01 | 7,23 ± 0,30 | 0,48 ± 0,00 | 1,94 ± 0,09 | 0,14 ± 0,00 | 11,48 |
| Morell | 0,38 ± 0,03 | 0,57 ± 0,02 | nd | 0,02 ± 0,00 | 0,36 ± 0,02 | 8,04 ± 0,54 | 0,98 ± 0,05 | 2,05 ± 0,13 | 0,28 ± 0,01 | 12,66 |
| Negreta | 1,03 ± 0,03 | 0,83 ± 0,03 | nd | 0,02 ± 0,00 | 0,64 ± 0,02 | 9,74 ± 0,29 | 1,00 ± 0,02 | 2,53 ± 0,08 | 0,43 ± 0,01 | 16,23 |
| Pauetet | 0,09 ± 0,00 | 0,55 ± 0,04 | nd | 0,02 ± 0,00 | 0,39 ± 0,01 | 7,55 ± 0,52 | 0,59 ± 0,01 | 1,56 ± 0,11 | 0,38 ± 0,02 | 11,14 |
| R. Piemont | 0,09 ± 0,00 | 0,60 ± 0,06 | 0,05 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,41 ± 0,01 | 12,81 ± 1,45 | 0,86 ± 0,09 | 3,41 ± 0,38 | 0,33 ± 0,03 | 18,59 |
| Segorbe | 0,45 ± 0,01 | 0,47 ± 0,01 | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,20 ± 0,00 | 6,93 ± 0,18 | 0,39 ± 0,01 | 1,04 ± 0,03 | 0,14 ± 0,00 | 9,64 |
| S.Mª Jesus | 0,13 ± 0,00 | 0,97 ± 0,06 | nd | 0,02 ± 0,00 | 0,43 ± 0,02 | 10,80 ± 0,76 | 0,99 ± 0,04 | 3,52 ± 0,25 | 0,33 ± 0,02 | 17,21 |
| T. Giffoni | 0,42 ± 0,02 | 0,59 ± 0,01 | nd | 0,01 ± 0,00 | 0,29 ± 0,01 | 10,05 ± 0,49 | 0,83 ± 0,03 | 1,95 ± 0,10 | 0,23 ± 0,01 | 14,37 |
| Felgueiras | | | | | | | | | | |
| Butler | 0,12 ± 0,01 | 0,50 ± 0,02 | 0,01 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,18 ± 0,00 | 6,77 ± 0,52 | 0,12 ± 0,01 | 0,98 ± 0,03 | 0,14 ± 0,01 | 8,90 |
| Campanica | 0,13 ± 0,00 | 0,55 ± 0,02 | nd | 0,02 ± 0,00 | 0,19 ± 0,00 | 6,93 ± 0,43 | 0,81 ± 0,02 | 0,83 ± 0,04 | 0,26 ± 0,01 | 9,72 |
| Cosford | 0,11 ± 0,00 | 0,14 ± 0,01 | nd | 0,07 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 2,94 ± 0,18 | 0,05 ± 0,00 | 0,43 ± 0,02 | 0,04 ± 0,00 | 3,81 |
| Couplat | 0,14 ± 0,00 | 0,29 ± 0,01 | nd | 0,02 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 6,59 ± 0,58 | 0,13 ± 0,00 | 0,91 ± 0,08 | 0,11 ± 0,01 | 8,27 |
| Ennis | 0,11 ± 0,01 | 0,86 ± 0,02 | 0,02 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,48 ± 0,01 | 9,29 ± 0,15 | 0,36 ± 0,00 | 1,21 ± 0,02 | 0,13 ± 0,01 | 12,49 |
| F. Coutard | 0,07 ± 0,00 | 0,53 ± 0,02 | 0,01 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,09 ± 0,01 | 6,00 ± 0,65 | 0,10 ± 0,01 | 0,84 ± 0,10 | 0,12 ± 0,01 | 7,81 |
| Lespanha | 0,07 ± 0,01 | 0,12 ± 0,01 | nd | 0,06 ± 0,00 | 0,14 ± 0,01 | 4,72 ± 0,23 | 0,34 ± 0,03 | 0,45 ± 0,05 | 0,06 ± 0,00 | 5,98 |
| M. Bollwiller | 0,64 ± 0,04 | 0,34 ± 0,02 | nd | 0,02 ± 0,00 | 0,07 ± 0,01 | 6,80 ± 0,64 | 0,33 ± 0,02 | 3,49 ± 0,19 | 0,54 ± 0,07 | 12,22 |
| Morell | 0,43 ± 0,04 | 0,75 ± 0,03 | nd | 0,05 ± 0,01 | 1,35 ± 0,04 | 8,10 ± 0,41 | 0,61 ± 0,01 | 1,33 ± 0,04 | 0,17 ± 0,00 | 12,79 |
| Negreta | 0,45 ± 0,02 | 0,37 ± 0,02 | 0,01 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,55 ± 0,03 | 10,38 ± 0,79 | 0,64 ± 0,03 | 2,27 ± 0,18 | 0,38 ± 0,03 | 15,06 |
| Pauetet | 0,07 ± 0,00 | 0,43 ± 0,02 | nd | 0,02 ± 0,00 | 0,19 ± 0,01 | 6,16 ± 0,28 | 0,15 ± 0,00 | 0,90 ± 0,03 | 0,27 ± 0,01 | 8,20 |
| Segorbe | 0,81 ± 0,02 | 0,76 ± 0,02 | 0,01 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,34 ± 0,01 | 12,69 ± 0,42 | 0,23 ± 0,01 | 1,15 ± 0,04 | 0,13 ± 0,01 | 16,14 |
| T. Giffoni | 0,30 ± 0,01 | 0,55 ± 0,03 | 0,01 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,16 ± 0,00 | 7,93 ± 0,49 | 0,17 ± 0,01 | 1,06 ± 0,06 | 0,14 ± 0,01 | 10,34 |

Após análise sistemática das amostras das diferentes cultivares, por ano e localização geográfica, e tendo-se verificado diferenças quantitativas entre as diversas amostras estudadas, procedeu-se ao tratamento estatístico dos resultados obtidos. Este procedimento pretendeu identificar possíveis correlações existentes entre os diferentes compostos estudados e avaliar possíveis influências da cultivar, ano ou localização geográfica na composição fenólica das amostras.

Inicialmente foram realizados testes de correlação entre os diferentes compostos, tendo-se verificado correlações elevadas entre os seguintes compostos: quercetina 3-hexósido, quercetina 3-ramnósido, campferol 3-ramnósido, miricetina 3-ramnósido e derivados da miricetina (quantificados sob a designação "Mder"), uma vez que os coeficientes de Pearson e Spearman foram relativamente elevados, variando entre 0,52 e 0,76 e entre 0,54 e 0,78, respectivamente. A correlação observada entre estes compostos, todos eles flavonóides, manifesta-se independentemente do teor total de compostos fenólicos, isto é, a proporcionalidade entre eles mantêm-se, de forma a que quando um aumenta ou diminui, os restantes seguem a mesma tendência. A título de exemplo, a correlação verificada entre a quercetina 3-hexósido e a quercetina 3-ramnósido, pode ser observada na Figura 1.7. Nesta figura, as amostras que apresentam teores inferiores de quercetina 3-hexósido caracteristicamente apresentam também teores inferiores de quercetina 3-ramnósido.

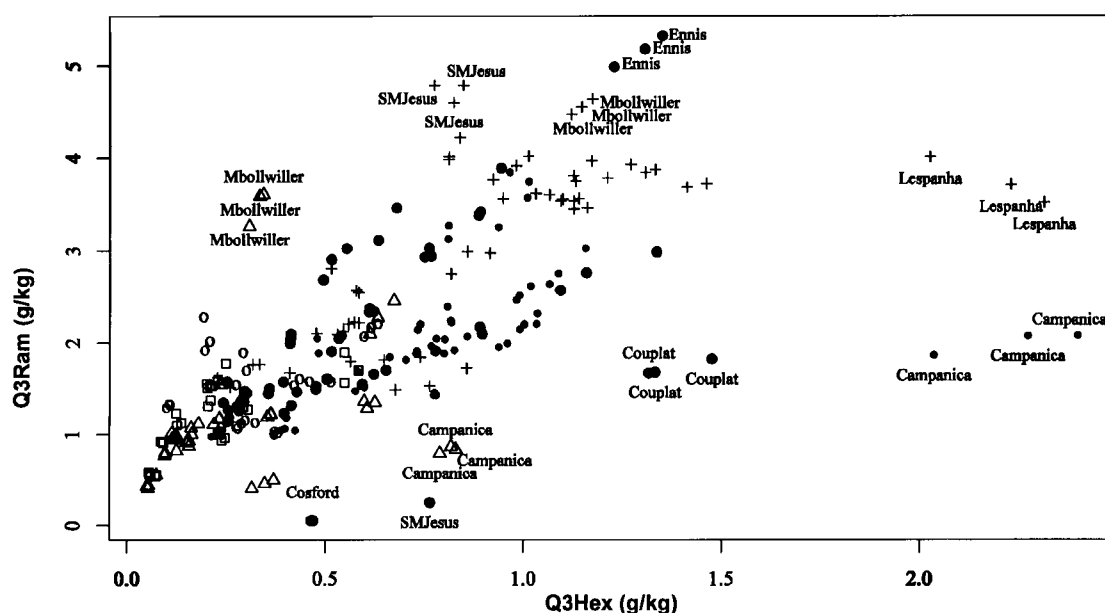


FIGURA 1.7. Análise de correlação entre a quercetina 3-ramnósido e a quercetina 3-hexósido. As amostras cujo nome da cultivar está assinalado foram consideradas como tendo um comportamento desviante relativamente à generalidade das amostras. Símbolos: +: Vila Real, ano 2002; ●: Vila Real, ano 2002; ■: Vila Real, ano 2004; ○: Felgueiras, ano 2002; □: Felgueiras, ano 2003; △: Felgueiras, ano 2004.

As correlações verificadas entre os referidos compostos parecem traduzir um comportamento característico da espécie estudada, o que vem de certa forma confirmar a existência de um perfil fenólico associado à folha de aveleira. Desta forma, este perfil poderá ser de facto uma boa opção para o controlo de qualidade das folhas de aveleira utilizadas em medicina tradicional, uma vez que, apesar de existir uma variabilidade do perfil quantitativo em termos do teor absoluto de cada composto, a razão entre os flavonóides seus constituintes mantém-se relativamente constante, independentemente da cultivar, ano ou localização geográfica em questão.

No entanto, as pequenas diferenças existentes entre os dois coeficientes (Pearson e Spearman) sugerem a existência de casos atípicos que devem ser explorados pela análise multivariada dos dados. Também pela análise da Figura 1.7 se torna evidente a existência desses casos, uma vez que algumas cultivares apresentam um comportamento desviante relativamente à generalidade das restantes cultivares e que, por isso, foram consideradas “outliers”, nomeadamente a cv. Longa d’ Espanha (Vila Real, 2002), a cv. Santa M^a de Jesus (Vila Real, 2002), a cv. Couplat (Vila Real, 2003), a cv. Cosford (Vila Real, 2003), a cv. Campanica (Vila Real e Felgueiras, 2004) e a cv. Merveille de Bollwiller (Felgueiras, 2004).

Pela análise dos resultados obtidos no estudo de correlações pode ainda constatar-se a existência de diferenças significativas entre os anos de colheita considerados, principalmente entre 2002 e 2003/2004 ($p < 0,01$), sendo estas diferenças mais relevantes quando considerada apenas a localização Vila Real.

Apesar de as amostras representadas na Figura 1.7, com teores inferiores de ambos os compostos, pertencerem a Felgueiras e, no geral, as amostras provenientes desta localização parecerem evidenciar teores dos referidos compostos inferiores aos apresentados pelas amostras provenientes de Vila Real, os resultados obtidos nos testes de análise de variância (F-test) não evidenciam a existência de diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as diferentes localizações geográficas, Felgueiras e Vila Real.

Durante o estudo estatístico realizado, verificou-se a existência de um grupo de amostras que, apesar de não apresentarem qualquer tipo de correlação entre si, apresentavam tendencialmente valores elevados de ácido 3-cafeoilquínico e diminutos de ácido 3-*p*-cumaroiltartárico. Um segundo grupo evidenciava o oposto. Ao primeiro grupo referido pertencem, por exemplo, as cultivares Gunslebert, Merveille de Bollwiller, Segorbe e Negreta, todas provenientes de Vila Real, ano 2002. No segundo grupo constam as cultivares Cosford e Longa d’ Espanha, ambas provenientes de Felgueiras (2004), a cultivar Butler (Vila Real, 2003) e a cultivar Merveille de Bollwiller (Felgueiras, 2003), entre outras. Observando os resultados apresentados na Tabela 1.4, considerando os grupos de amostras formados segundo o ano e a localidade estudada, verifica-se que algumas cultivares (Gunslebert, Merveille de Bollwiller, Morell, Negreta, Segorbe e Tonda di Giffoni) consistentemente apresentam valores mais elevados de ácido 3-cafeoilquínico quando comparadas com as

restantes cultivares dentro do mesmo grupo. A Figura 1.8 apresenta o teor em ácido 3-cafeoilquínico *versus* ácido *p*-cumaroiltartárico, evidenciando a dispersão de valores no que se refere ao primeiro composto referido. O nome das cultivares que mais se destacam em cada um dos referidos grupos encontra-se assinalado na figura. Para a construção do gráfico apresentado na Figura 1.8, foram excluídas as amostras para as quais o ácido 3-cafeoilquínico não foi detectado.

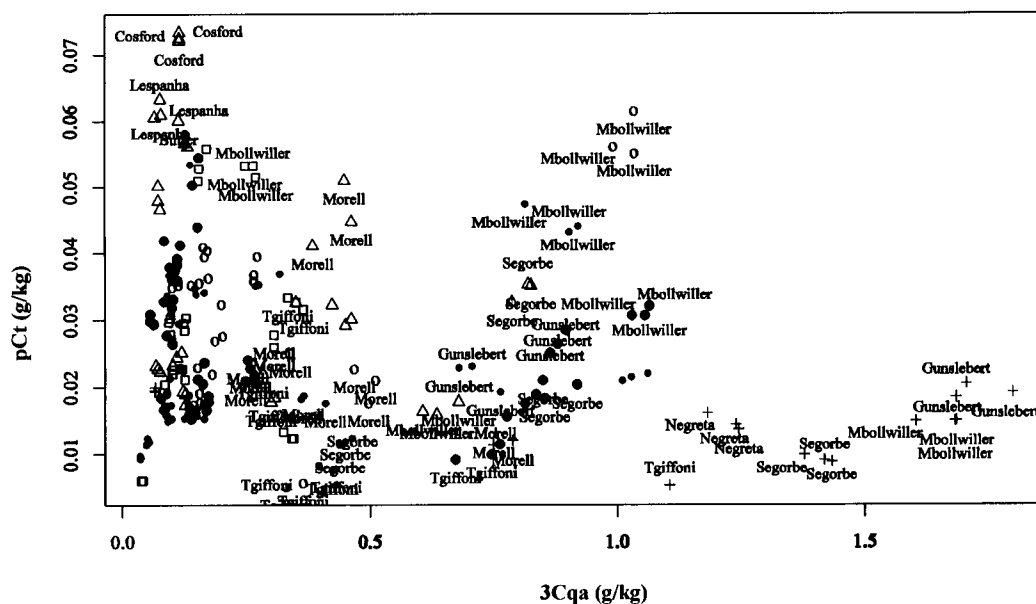


FIGURA 1.8. Relação entre o teor em ácido 3-cafeoilquínico (3Cqa) *versus* o teor em ácido *p*-cumaroiltartárico (pCt). Símbolos: +: Vila Real, ano 2002; •: Vila Real, ano 2002; •: Vila Real, ano 2004; ○: Felgueiras, ano 2002; □: Felgueiras, ano 2003; △: Felgueiras, ano 2004.

Pode-se verificar ainda na Figura 1.8 que, considerando apenas as amostras pertencentes a Vila Real, parecem existir diferenças significativas entre as amostras colhidas em 2002 e as colhidas em 2003/2004. Os testes de análise de variância permitiram confirmar que as amostras colhidas em 2002 apresentaram, de facto, teores significativamente mais elevados ($p < 0,001$) deste composto do que nos restantes anos estudados.

Uma vez que os resultados obtidos nos testes de correlação e análise de variância sugerem diferenças entre as amostras estudadas, apontando para a existência de algumas cultivares que poderão comportar-se de forma diferente das demais, e ainda para a existência de diferenças relativamente aos três anos estudados, aplicou-se à análise de componentes principais (PCA) aos dados obtidos.

Inicialmente foi construído um gráfico através da utilização de um modelo linear, o qual incluiu todos os compostos à excepção do ácido cafeoiltartárico, devido à ausência de valores relativamente a este composto para um elevado número de amostras (Tabela 1.4) e no qual se utilizaram os resultados obtidos ao longo dos três anos de estudo, para as

cultivares comuns às duas localizações geográficas (Butler, Campanica, Cosford, Couplat, Ennis, Fertile de Coutard, Merveille de Bollwiller, Morell, Pautet e Tonda di Giffoni). Os restantes dados, isto é, os resultados obtidos nos três anos relativos às cultivares existentes somente em Vila Real, foram considerados como um segundo bloco de dados e projectados no gráfico segundo o modelo linear inicialmente determinado, obtendo-se o gráfico final representado na Figura 1.9. Refira-se contudo, que algumas amostras foram excluídas devido à ausência de valores relativamente a alguns compostos, nomeadamente os ácido 3-cafeoilquínico e *p*-cumaroiltartárico. A técnica utilizada permite estabelecer o modelo de PCA apenas com os dados comuns e obter resultados comparáveis provenientes de conjuntos de dados que originalmente não eram directamente comparáveis (sem que com tal se afecte os valores de correlação entre variáveis iniciais e PC, estimados para o modelo).

No gráfico obtido (Figura 1.9) as duas componentes principais, PC₁ e PC₂, explicam 53,2% da variabilidade total. A PC₁ representa 36,9% da variação e expressa, principalmente, a variação do teor da maioria dos flavonóides determinados, nomeadamente: quercetina 3-hexósido, miricetina 3-ramnósido, soma de derivados da miricetina e quercetina 3-ramnósido. Estes parâmetros que afectam mais intensamente a PC₁ apresentam um valor bastante positivo na referida componente, sendo os que mais contribuem para a variabilidade das amostras. Refira-se ainda que os mesmos parâmetros estão bem relacionados entre si, o que vem de encontro aos resultados obtidos na análise de correlações frisando, deste modo, a importância destes compostos e suas proporções, no perfil da folha de aveleira. A PC₂ (16,3%) expressa sobretudo a relação inversa entre os teores em ácido 3-cafeoilquínico e os teores em ácidos *p*-cumaroiltartárico, 5-cafeoilquínico e campferol 3-ramnósido.

Por observação do gráfico constata-se que, apesar de um grupo de amostras pertencentes a Felgueiras, 2003 e 2004, se destacar das restantes amostras por apresentarem teores inferiores relativamente à generalidade dos flavonóides (e consequentemente, teor fenólico total inferior), e de um grupo de amostras provenientes de Vila Real, apesar de mais dispersas, se destacar pelo inverso (teores mais elevados da maioria dos compostos), a grande maioria dos resultados não evidencia diferenças significativas entre as duas localizações geográficas. Verifica-se que não existe a formação de dois grupos distintos relativos a cada uma das localizações, o que está de acordo com os resultados obtidos na análise de variância ($p > 0,05$).

A observação da Figura 1.9 permite sugerir que, considerando apenas as amostras provenientes de Vila Real, poderão existir diferenças significativas relativamente ao ano de colheita. Algumas cultivares colhidas em 2002 (M. Bollwiller, Negreta, Gunslebert e Segorbe) são significativamente diferentes das demais, sendo caracterizadas por teores elevados da maioria dos flavonóides e de ácido 3-cafeoilquínico e por teores inferiores de ácido *p*-cumaroiltartárico. Estas diferenças relativas ao ano de colheita são coerentes com os resultados da análise de variância anteriormente referidos ($p < 0,01$).

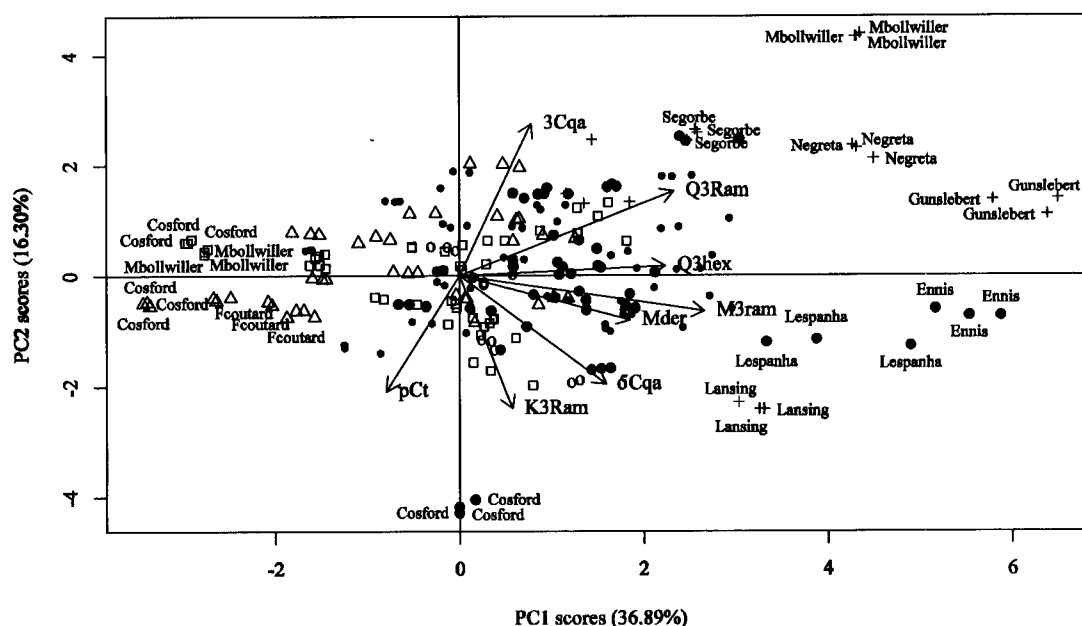


FIGURA 1.9. PCA dos dados referentes às cultivares e anos comuns entre Vila Real e Felgueiras, com a projecção dos dados referentes às cultivares não comuns. Símbolos: +: Vila Real 2002; ●: Vila Real 2003; ◐: Vila Real 2004; ○: Felgueiras 2002; □: Felgueiras 2003; △: Felgueiras 2004. Designação dos compostos como na Tabela 1.3 e na Figura 1.6.

A maioria das cultivares apresenta uma composição fenólica relativamente similar, uma vez que se encontram dispostas no centro do gráfico e próximo da intersecção dos eixos referentes às duas componentes principais. No entanto, algumas cultivares parecem apresentar uma composição fenólica significativamente diferente das demais, encontrando-se assinaladas com o respectivo nome no referido gráfico. Para além das cultivares pertencentes a Vila Real, 2002, acima referidas, ainda outras se evidenciaram da maioria das amostras, como por exemplo (i) as cvs. Ennis (Vila Real, 2003), Longa d'Espanha (Vila Real, 2003) e Lansing (Vila Real, 2002), caracterizadas por teores elevados da maioria dos compostos à excepção dos ácidos *p*-cumaroiltartárico e 3-cafeoilquínico; (ii) a cv. Cosford, caracterizada por teores superiores de ácido *p*-cumaroiltartárico e teores anormalmente elevados de campferol 3-ramnósido quando comparada com as restantes amostras e (iii) as cvs. Cosford (Felgueiras, 2003 e 2004), Merveille de Bollwiller (Felgueiras 2003) e Fertille de Coutard (Felgueiras, 2004) caracterizadas por apresentarem conteúdos reduzidos da maioria dos compostos fenólicos estudados, e consequentemente teor total em compostos fenólicos muito baixo comparativamente com a maioria das amostras estudadas. Também nos testes de análise de variância todas estas amostras mostraram ser significativamente diferentes das restantes ($p < 0,001$).

O gráfico da Figura 1.9 permite ainda verificar que, amostras com teores elevados de ácido *p*-cumaroiltartárico apresentam tendencialmente teores reduzidos de ácido 3-cafeoilquínico, e *vice-versa*, sendo que o primeiro se correlaciona melhor com o campferol

3-ramnósido enquanto que o segundo se correlaciona melhor com a quercetina 3-ramnósido. Embora este facto tivesse sido já referido, a análise de PCA permite verificar ainda a ortogonalidade entre o ácido 5-cafeoilquínico e os ácidos 3-cafeoilquínico e *p*-cumaroiltartárico, o que traduz uma relativa independência dos teores do primeiro face aos segundos. O ácido 5-cafeoilquínico relaciona-se de forma inversa com o ácido 3-cafeoilquínico e de forma idêntica com o ácido *p*-cumaroiltartárico, isto é, teores elevados de ácido 5-cafeoilquínico estão geralmente associados a teores reduzidos de 3-cafeoilquínico e superiores de *p*-cumaroiltartárico. Mais ainda, verifica-se que o ácido 5-cafeoilquínico parece ser um bom descritor da variância associada aos anos de colheita, principalmente no que se refere à distinção entre os anos 2002 e 2003/2004, uma vez que o teor deste composto decresce significativamente de 2002 para 2003/2004, sendo este facto mais relevante em Vila Real.

Uma vez que as amostras de Vila Real parecem ser mais afectadas pelo factor ano de colheita, realizou-se uma nova PCA apenas com as amostras provenientes desta localização geográfica. Pelo facto dos ácidos 3-cafeoilquínico e *p*-cumaroiltartárico apresentarem resultados considerados como “valores em falta” em diversas amostras, levando à exclusão automática dessas mesmas amostras, optou-se por excluir estes dois compostos da análise de forma a incluir todas as amostras na PCA. Apesar de estes ácidos se terem revelado importantes na anterior PCA, como se pode constatar na Figura 1.9, pode igualmente verificar-se que as diferenças entre os anos são explicadas sobretudo pelos compostos descritos pela PC₁, uma vez que esta representa uma percentagem de variação muito superior à representada pela PC₂ (36,9% versus 16,3%).

A Figura 1.10 mostra o gráfico resultante que explica 66,9% da variabilidade total, em que a PC₁ representa 49,9% e a PC₂ 17,0%. As amostras são discriminadas na PC₁ em função dos seus teores em miricetina, soma de derivados da miricetina, quercetina 3-ramnósido, quercetina 3-hexósido e ácido 5-cafeoilquínico, enquanto a PC₂ discrimina as amostras sobretudo com base nos seus teores em campferol 3-ramnósido. Este gráfico apresenta um padrão semelhante ao do gráfico anterior (Figura 1.9) uma vez que se verifica uma relação idêntica entre os diferentes compostos, com a pequena diferença do campferol 3-ramnósido adquirir uma maior importância na segunda componente e de o ácido 5-cafeoilquínico adquirir uma maior importância na primeira componente.

O gráfico da Figura 1.10 evidencia as diferenças em termos da composição fenólica das amostras provenientes de Vila Real relativamente ao ano de colheita. Apesar de 2002 apresentar uma maior dispersão de resultados, a maioria das amostras colhidas nesse ano apresenta um teor total em compostos fenólicos superior considerando a globalidade das restantes amostras (Tabela 1.4 e Figura 1.10). Os anos 2003 e 2004 apresentam uma menor dispersão de resultados comparativamente com 2002, sendo mais idênticos entre si. Apesar de, quando considerada a globalidade dos resultados, o ano 2004 não se diferenciar

claramente de 2003, parece existir uma tendência de diminuição dos teores de compostos fenólicos em 2004, uma vez que os valores mais baixos obtidos para esta localização geográfica referem-se a um grupo de amostras pertencentes a este ano (cvs. Butler, Couplat, Fertile de Coutard e Segorbe), as quais se encontram assinaladas no gráfico.

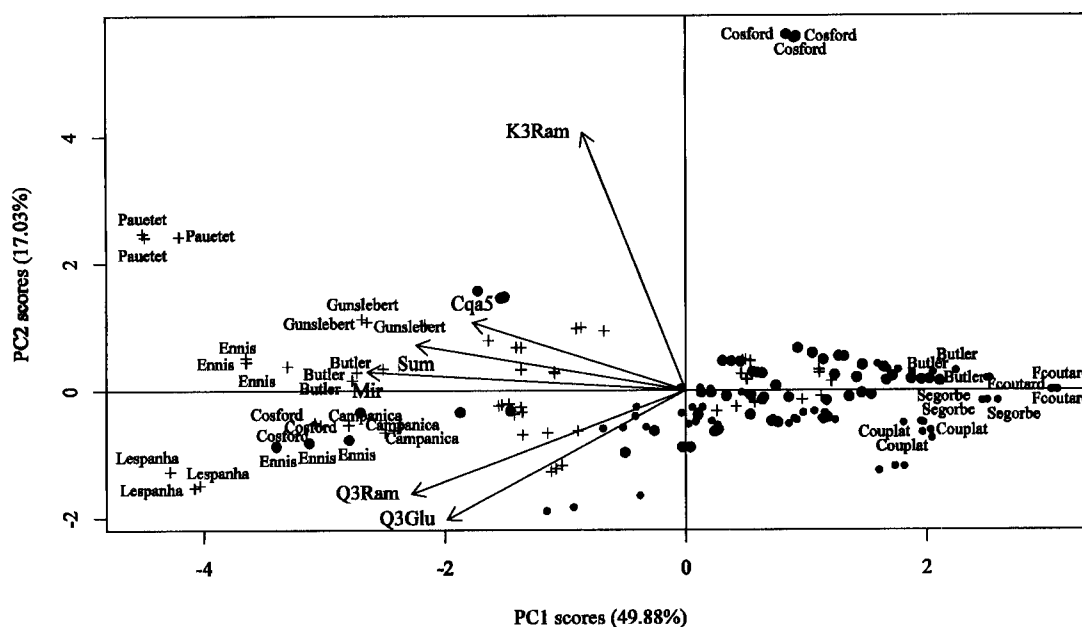


FIGURA 1.10. PCA dos dados referentes às cultivares provenientes de Vila Real (2002, 2003 e 2004). Símbolos: +: Vila Real 2002; •: Vila Real 2003; •: Vila Real 2004. Abreviaturas dos compostos como descrito na Tabela 1.3.

Estas flutuações relativamente ao teor de compostos fenólicos poderá, de alguma forma, estar relacionada com as diferenças climáticas, naturalmente existentes de ano para ano, uma vez que esta última análise de PCA incidiu apenas sobre os resultados obtidos, quando consideradas as mesmas cultivares, provenientes do mesmo campo e submetidas às mesmas práticas agrícolas. No entanto, mais uma vez se salienta a existência de um perfil qualitativo semelhante, isto é, apesar de algumas amostras apresentarem teores totais mais/menos elevados ao longo dos três anos de estudo, para a maioria das amostras estudadas verificou-se a manutenção de proporções idênticas entre os diferentes compostos fenólicos.

Uma vez que algumas cultivares, em ambas as PCA realizadas (Figura 1.9 e 1.10), parecem apresentar algum grau de discriminação relativamente à maioria das amostras, independentemente do ano e localização geográfica considerada (por exemplo as cvs. Gunslebert e Lansing caracteristicamente apresentam teores mais elevados de ácido 5-cafeoilquínico; as cvs. Gunslebert, M. Bollwiller, Negreta, Segorbe e T. Giffoni apresentam teores mais elevados de ácido 3-cafeoilquínico; as cvs. Negreta e Pautet apresentam

Neste gráfico, construído com base nos resultados do perfil fenólico normalizado das diferentes amostras, as duas componentes principais expressam 78,1% da variância total. A PC₁ representa 52,9% e expressa as diferenças sobretudo em termos de teor em Q3Ram e 3Cqa, mas também em M3ram e 5Cqa, e a PC₂ representa 25,3% e expressa a discriminação das cultivares em termos de teor em M3Ram e 3Cqa *versus* 5Cqa e Q3Ram.

Apesar de não se verificar a formação de grupos claramente distintos, podem observar-se 5 diferentes tendências de agrupamento:

- i) cultivares com teores de 3Cqa e Q3Ram tendencialmente superiores; estas cultivares encontram-se situadas no extremo direito do gráfico, compreendendo as cultivares Merveille de Bollwiller e Negreta, se bem que a primeira apresente uma maior dispersão de resultados e valores de ambos os compostos tendencialmente superiores aos apresentados pela segunda;
- ii) cultivares com teores de 3Cqa, Q3Ram e 5Cqa tendencialmente elevados; este agrupamento situa-se no quadrante superior direito e inclui as cvs. Grossal, L. Espanha, S. M^a Jesus, Campanica e Gunslebert, todas elas provenientes de Vila Real. Saliente-se ainda que a cv. Gunslebert apresentou uma elevada consistência de resultados ao longo dos três anos, pelo que todas as amostras estudadas se encontram neste agrupamento;
- iii) cultivares com teores em 5Cqa extremamente elevados quando comparados com as restantes cultivares; este agrupamento situa-se no topo do quadrante superior esquerdo e inclui as cvs. Lansing, Ennis e Butler, provenientes de ambas as localizações geográficas. Refira-se, no entanto, o facto das cultivares Ennis e Butler de Felgueiras, 2004, não se encontrarem neste agrupamento, tendo apresentado valores superiores de M3ram e inferiores de 5Cqa relativamente ao esperado;
- iv) cultivares com teores superiores em M3ram; este agrupamento situa-se no quadrante inferior esquerdo e inclui as cvs. Couplat, Cosford, L. Espanha, Pauetet, Segorbe e T. Giffoni, maioritariamente provenientes de Felgueiras, mas também de Vila Real;
- v) cultivares com teores aproximados da média para os compostos seleccionados; estas cultivares encontram-se na zona central do gráfico, caracterizando-se por apresentarem teores em fenóis similares à média global. Estas cultivares, contudo, apresentam algumas diferenças entre si. Por exemplo, as cvs. Campanica e Daviana apresentam teores geralmente mais elevados de M3ram e 5Cqa, enquanto a cv. Morell apresenta geralmente teores inferiores dos referidos compostos e superiores

de Q3ram e 3Cqa. Saliente-se ainda o facto da cv. Morell apresentar um perfil idêntico ao longo dos três anos estudados, encontrando-se neste agrupamento todas as amostras estudadas desta cultivar.

O estudo de regressão logística permitiu verificar que, apesar das cultivares não formarem grupos claramente distintos, existem algumas diferenças entre cultivares, podendo desta forma considerar-se a formação de alguns agrupamentos. Apesar de algumas cultivares (como por exemplo as cvs. Morell, Lansing, Ennis, Butler e Merveille de Bollwiller) apresentarem características idênticas relativamente às diferentes amostras estudadas para a mesma cultivar (ano e localização geográfica), outras houve que apresentaram uma grande dispersão de resultados, em especial as cvs. Cosford, Longa de Espanha e Santa Maria de Jesus. Estas últimas cultivares apresentaram uma variabilidade do perfil fenólico muito elevada, considerando as amostras estudadas e as variáveis preditivas seleccionadas.

7.2 Nogueira

A juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) é um composto característico da noqueira, estando descrita a sua presença em folhas frescas (Bruneton, 1993; Gîrzu *et al.*, 1998; Wichtl e Anton, 1999). Uma vez que, na preparação tradicional de infusões, são utilizadas folhas secas, as amostras estudadas ao longo deste trabalho foram previamente submetidas a secagem. A juglona não foi detectada em nenhum dos extractos estudados, provavelmente por terem sido preparados com folhas secas. No entanto, detectou-se a sua presença num extracto clorofórmico preparado com folhas de noqueira frescas, o que está de acordo com o trabalho realizado por Gîrzu *et al.* (1998). A existência de juglona nas folhas frescas de noqueira e a sua ausência após secagem das mesmas, segundo Wichtl e Anton (1999) justifica-se pela ocorrência de fenómenos de polimerização que a tornam insolúvel. Tendo em conta que as infusões são tradicionalmente preparadas com plantas secas e os resultados obtidos, o desenvolvimento de uma metodologia de controlo de qualidade baseada na utilização deste composto não parece ser adequada. Uma vez que foi já sugerida a aplicação da análise de flavonóides e ácidos fenólicos ao controlo de qualidade de plantas medicinais e variados géneros alimentícios (Andrade *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 1998b; Ramos *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2000) procedeu-se ao estudo destes compostos nas folhas de noqueira.

Com o objectivo de determinar as condições extractivas que permitissem obter um melhor perfil analítico, isto é, em que fosse possível obter o maior número de compostos, procedeu-se à realização de diferentes extractos, a partir da mesma amostra. Todas as soluções extractivas foram injectadas no gradiente anteriormente descrito (ver 5.2 da secção II, página 25), gradiente este que foi previamente otimizado para a matriz em questão.

Utilizaram-se, como solventes extractivos, metanol, etanol, clorofórmio e água acidificada a pH 2 com HCl. O clorofórmio foi o solvente que extraiu o menor número de compostos. Uma vez que os melhores resultados foram obtidos com metanol e com água acidificada, procedeu-se ainda à obtenção de dois extractos com os referidos solventes através da utilização de colunas de extracção em fase sólida ISOLUTE C₁₈ (NEC). Comparando os dois extractos, verificou-se que apesar de ambos originarem perfis qualitativos idênticos, para o mesmo número de extracções (3 x 100 ml), a água acidificada originava um extracto com maior concentração de compostos fenólicos. A extracção com água acidificada apresentou ainda as vantagens de eliminar as clorofilas por precipitação e de permitir a concentração do extracto num período de tempo inferior e, obviamente, de ser ambientalmente menos nefasta. Desta forma, para propósitos de quantificação, todas as amostras foram sujeitas a extracção com água acidificada e posterior utilização de colunas de extracção em fase sólida.

Sabendo que vários autores obtiveram bons resultados na identificação de compostos em alimentos e bebidas por HPLC/DAD/ESI-MS/MS (Caristi *et al.*, 2003; Llorach *et al.*, 2003), aplicou-se esta técnica de modo a obter informações sobre a estrutura dos compostos presentes na matriz em estudo, e desta forma identificar o maior número possível de compostos.

Tal como se verificou com as folhas de aveleira, também nesta matriz os dados obtidos por HPLC/DAD indicaram a presença de dois grupos principais de compostos existentes no extracto de folha de nogueira: ácidos fenólicos (correspondendo aos picos 1 a 3) e flavonóides (correspondendo aos picos 4 a 9). A Figura 1.12 mostra um cromatograma obtido por HPLC/DAD.

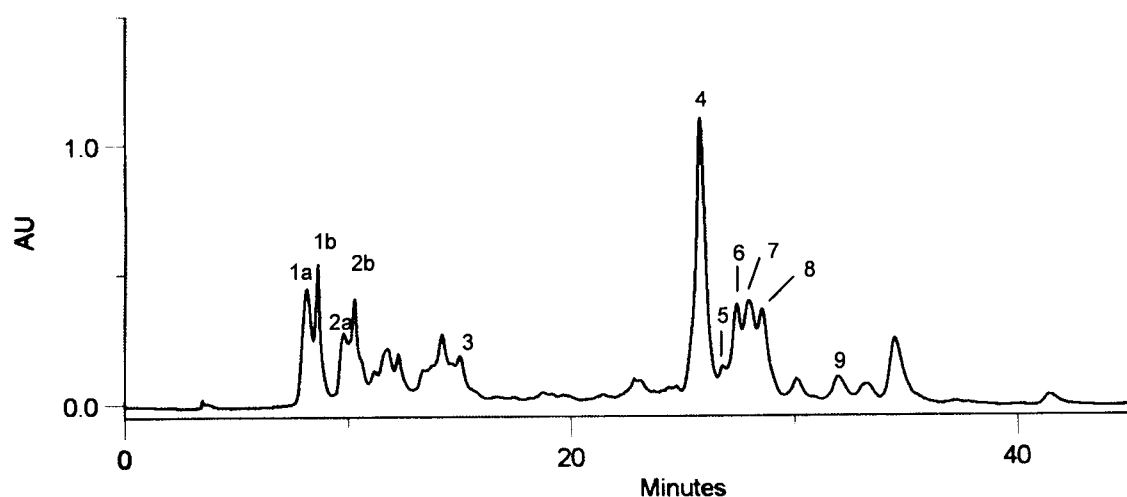


FIGURA 1.12. Cromatograma representativo do perfil fenólico da folha de nogueira. Visualização a 320 nm. **1a e 1b:** isómeros do ácido 3-cafeoilquínico; **2a e 2b:** isómeros do ácido 3-*p*-cumaroilquínico; **3:** ácido 4-*p*-cumaroilquínico; **4:** quercetina 3-galactósido; **5:** quercetina 3-pentósido; **6:** quercetina 3-arabinósido; **7:** quercetina 3-xilósido; **8:** quercetina 3-ramnósido; **9:** derivado de campferol 3-pentósido.

O grupo dos ácidos fenólicos, correspondendo aos picos 1, 2 e 3 (Figura 1.12), apresenta espectros característicos de ácidos cinâmicos, com dois máximos de absorção, a 250 e 320 nm. Os compostos pertencentes ao segundo grupo, correspondendo aos picos 4 a 9 (Figura 1.12), apresentaram espectros UV característicos de flavonóides (Stefova *et al.*, 2003). Os dados de HPLC-MS forneceram informações interessantes sobre estes compostos.

PICO 1: apresentou um ião pseudomolecular $[M - H]^-$ com m/z 353,6. A fragmentação deste ião gerou um ião maioritário com m/z 191,5 (que corresponde à perda do radical cafeoil por parte do ião pseudomolecular) e um ião secundário com m/z 179,5 com uma abundância de 35%. De acordo com o trabalho realizado por Clifford e colaboradores (2003) sobre o esquema de fragmentação dos ácidos clorogénicos em LC-MS, estes dados correspondem ao **ácido 3-O-cafeoilquínico**.

PICO 2: apresentou um ião pseudomolecular com m/z 337,5 o que indica a presença de ácido *p*-cumárico. A fragmentação deste ião gerou um outro ião com m/z 163,1 que corresponde à perda do radical ácido quínico e confirma a presença de ácido *p*-cumárico. A inexistência de outros picos significativos nesta fragmentação levou a concluir, de acordo com o trabalho atrás citado (Clifford *et al.*, 2003), tratar-se do **ácido 3-*p*-cumaroilquínico**.

PICO 3: apresentou um ião pseudomolecular com m/z 337,5 o que indica a presença de ácido *p*-cumárico na molécula. A fragmentação em MS/MS originou um espectro com um pico base a m/z 173,1. Ainda segundo os mesmos autores (Clifford, 2003) este esquema de fragmentação confirma a substância presente no pico 3 é o **ácido 4-*p*-cumaroilquínico**.

PICOS 4, 6, 7 E 8: apresentaram iões pseudomoleculares com m/z 463,4; 433,3; 433,3 e 447,4 respectivamente. A fragmentação de qualquer destes iões originou um ião com m/z 300,9, que é um valor típico para a quercetina, quando se trabalha em modo de ionização negativo. A injeção de padrões autênticos de **quercetina 3-galactósido**, **quercetina 3-arabinósido**, **quercetina 3-xilósido** e **quercetina 3-ramnósido** permitiu confirmar a sua existência no extracto de folha de noqueira, correspondendo aos picos 4, 6, 7 e 8, respectivamente.

PICO 5: apresenta um ião pseudomolecular a m/z 433,4, sendo que a sua fragmentação também origina o ião a m/z 300,9, sugerindo a presença de um derivado da quercetina. Tendo em conta a massa molecular, o composto ficou parcialmente identificado como sendo uma **pentosil-quercetina**.

PICO 9: este pico revelou conter três compostos com iões pseudomoleculares com m/z 417,4, 475,4 e 489,4. Para estes iões realizou-se um “*Extracted ion chromatogram*” (EIC) e

um estudo MS/MS, mas os resultados obtidos foram pouco esclarecedores. A fragmentação do primeiro ião referido, originou um pico base com m/z 284,9, característico do campferol, sugerindo a presença de um derivado **pentosil-campferol**; os dados de MS dos outros dois iões foram inconclusivos, embora pareçam sugerir que ambos são derivados da mesma aglicona.

Após identificação do maior número possível de compostos através do estudo aprofundado da composição fenólica por HPLC/DAD/ESI-MS/MS e do desenvolvimento de uma metodologia adequada ao controlo de qualidade desta planta medicinal, baseada na quantificação por HPLC/DAD dos compostos fenólicos identificados, procedeu-se ao estudo das amostras recolhidas. Tendo em conta que, em Portugal, as folhas de noqueira são tradicionalmente colhidas no final da Primavera / princípio do Verão (Costa, 1975), no primeiro ano de estudo (2002), foram recolhidas amostras mensais entre Maio e Setembro, de modo a detectar possíveis variações do teor dos compostos analisados. Foram ainda efectuadas recolhas que permitissem avaliar a influência da cultivar, do ano e da localização geográfica na composição de compostos fenólicos da folha de noqueira (ver capítulo 1, secção II-1, páginas 21 e 22).

Como referido, efectuou-se uma análise sistemática da variação da composição fenólica entre Maio e Setembro, tendo-se recolhido amostras mensais de diferentes cultivares, todas elas provenientes do mesmo campo e submetidas às mesmas práticas agrícolas.

A Tabela 1.5 apresenta a composição fenólica das cultivares estudadas mensalmente. Nesta tabela constata-se que, à excepção do ácido 4-*p*-cumaroilquínico, o qual não foi detectado em algumas das amostras estudadas, o perfil qualitativo manteve-se relativamente constante, sendo constituído por sete compostos fenólicos identificados: ácidos 3-*O*-cafeoilquínico, 3-*p*-cumaroilquínico e 4-*p*-cumaroilquínico, quercetina 3-galactósido, quercetina 3-arabinósido, quercetina 3-xilósido e quercetina 3-ramnósido, e dois compostos parcialmente identificados (quercetina 3-pentósido e campferol 3-pentósido). Contudo, ao longo dos meses estudados observaram-se diferenças quantitativas. Analisando os teores totais de compostos fenólicos para cada cultivar, verificou-se que todas elas apresentaram teores ligeiramente superiores em Maio e Julho (Tabela 1.5). Apesar das semelhanças verificadas na globalidade, o comportamento individual de cada cultivar revela a existência de ligeiras diferenças entre elas (Figura 1.13). As cvs. Mayette e Mellanaise apresentaram comportamentos muito idênticos entre si verificando-se, no entanto, aumentos do teor fenólico total mais acentuados na primeira: ambas apresentaram teores totais elevados em Maio, após o que ocorre uma redução acentuada em Junho, havendo uma subida de valores em Julho, ocorrendo novo decréscimo em Agosto (atingindo-se os valores mais baixos neste mês) e, por fim, novo incremento em Setembro.



TABELA 1.5. Composição fenólica (g/kg de folha de nogueira seca)^a das amostras recolhidas em Bragança entre Maio e Setembro de 2002.

| | Composto Fenólico | | | | | | | | | | Total |
|-----------------|-------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|-------|
| | 3Cqa | 3pCo | 4pCo | Q3Gal | Q3Pen | Q3Ara | Q3Xil | Q3Ram | K3Pent | | |
| MAIO | | | | | | | | | | | |
| Franquette | 6,00 ± 0,20 | 1,32 ± 0,10 | nd | 9,95 ± 0,13 | 0,79 ± 0,06 | 2,90 ± 0,15 | 4,31 ± 0,00 | 3,05 ± 0,19 | 1,66 ± 0,01 | 30,0 | |
| Lara | 6,32 ± 0,03 | 1,71 ± 0,01 | nd | 12,20 ± 0,43 | 0,88 ± 0,07 | 3,83 ± 0,23 | 6,12 ± 0,09 | 3,42 ± 0,01 | 2,66 ± 0,09 | 37,1 | |
| Marbot | 5,26 ± 0,16 | 2,09 ± 0,01 | nd | 10,80 ± 0,26 | 0,77 ± 0,01 | 2,66 ± 0,01 | 3,04 ± 0,06 | 2,58 ± 0,17 | 0,87 ± 0,01 | 28,2 | |
| Mayette | 5,12 ± 0,03 | 2,59 ± 0,00 | 0,34 ± 0,00 | 12,52 ± 0,06 | 0,88 ± 0,01 | 3,69 ± 0,06 | 4,83 ± 0,05 | 2,73 ± 0,10 | 1,60 ± 0,05 | 34,3 | |
| Mellanaise | 6,82 ± 0,26 | 1,80 ± 0,10 | 0,43 ± 0,02 | 10,84 ± 0,04 | 0,74 ± 0,04 | 3,47 ± 0,13 | 5,57 ± 0,13 | 3,68 ± 0,09 | 2,08 ± 0,09 | 35,4 | |
| Parisienne | 3,80 ± 0,42 | 1,90 ± 0,03 | nd | 14,92 ± 0,22 | 1,12 ± 0,06 | 4,47 ± 0,11 | 4,33 ± 0,36 | 2,13 ± 0,14 | 1,58 ± 0,19 | 34,2 | |
| JUNHO | | | | | | | | | | | |
| Franquette | 4,58 ± 0,01 | 0,98 ± 0,01 | 0,15 ± 0,01 | 10,91 ± 0,06 | 0,81 ± 0,02 | 2,83 ± 0,08 | 5,29 ± 0,05 | 2,85 ± 0,15 | 1,54 ± 0,03 | 29,8 | |
| Lara | 3,44 ± 0,01 | 0,90 ± 0,05 | nd | 10,74 ± 0,00 | 0,87 ± 0,01 | 3,25 ± 0,00 | 4,66 ± 0,01 | 2,96 ± 0,02 | 1,72 ± 0,01 | 28,5 | |
| Marbot | 2,79 ± 0,15 | 0,90 ± 0,06 | 0,41 ± 0,03 | 10,27 ± 0,21 | 0,78 ± 0,03 | 2,89 ± 0,08 | 3,20 ± 0,04 | 2,88 ± 0,08 | 1,00 ± 0,01 | 24,7 | |
| Mayette | 2,98 ± 0,06 | 1,37 ± 0,05 | 0,32 ± 0,00 | 7,97 ± 0,16 | 0,43 ± 0,03 | 1,96 ± 0,05 | 2,12 ± 0,05 | 2,06 ± 0,04 | 0,78 ± 0,03 | 19,7 | |
| Mellanaise | 3,97 ± 0,33 | 0,68 ± 0,04 | nd | 6,28 ± 0,02 | 0,39 ± 0,01 | 1,92 ± 0,04 | 2,20 ± 0,08 | 2,40 ± 0,05 | 0,92 ± 0,05 | 18,8 | |
| Parisienne | 2,91 ± 0,29 | 1,20 ± 0,11 | 0,23 ± 0,02 | 9,86 ± 0,16 | 0,87 ± 0,08 | 3,63 ± 0,08 | 4,63 ± 0,13 | 2,17 ± 0,10 | 1,33 ± 0,04 | 26,8 | |
| JULHO | | | | | | | | | | | |
| Franquette | 4,99 ± 0,12 | 0,95 ± 0,03 | nd | 12,08 ± 0,04 | 1,10 ± 0,00 | 3,44 ± 0,01 | 4,63 ± 0,25 | 2,88 ± 0,16 | 1,41 ± 0,05 | 31,5 | |
| Lara | 3,14 ± 0,08 | 0,85 ± 0,03 | 0,12 ± 0,01 | 12,31 ± 0,61 | 1,03 ± 0,11 | 3,58 ± 0,07 | 3,74 ± 0,14 | 3,20 ± 0,09 | 1,67 ± 0,11 | 29,7 | |
| Marbot | 3,59 ± 0,00 | 1,01 ± 0,00 | nd | 9,45 ± 0,00 | 0,75 ± 0,01 | 2,85 ± 0,03 | 4,02 ± 0,02 | 2,52 ± 0,00 | 1,13 ± 0,01 | 25,3 | |
| Mayette | 3,92 ± 0,51 | 1,56 ± 0,20 | 0,43 ± 0,07 | 12,10 ± 0,76 | 1,02 ± 0,09 | 3,77 ± 0,30 | 4,92 ± 0,28 | 2,99 ± 0,05 | 1,79 ± 0,14 | 32,5 | |
| Mellanaise | 5,38 ± 0,05 | 1,05 ± 0,01 | nd | 8,35 ± 0,03 | 0,63 ± 0,04 | 2,56 ± 0,04 | 3,90 ± 0,21 | 2,76 ± 0,04 | 1,40 ± 0,01 | 26,0 | |
| Parisienne | 2,39 ± 0,27 | 1,32 ± 0,07 | nd | 14,58 ± 0,51 | 1,50 ± 0,04 | 4,48 ± 0,17 | 4,04 ± 0,12 | 2,59 ± 0,15 | 1,58 ± 0,11 | 32,5 | |
| AGOSTO | | | | | | | | | | | |
| Franquette | 3,00 ± 0,07 | 0,64 ± 0,01 | nd | 11,96 ± 0,13 | 0,93 ± 0,05 | 3,46 ± 0,01 | 4,20 ± 0,03 | 2,74 ± 0,03 | 1,12 ± 0,03 | 28,0 | |
| Lara | 1,88 ± 0,00 | 0,63 ± 0,00 | nd | 10,56 ± 0,03 | 0,77 ± 0,01 | 2,72 ± 0,03 | 3,02 ± 0,01 | 2,27 ± 0,01 | 0,86 ± 0,01 | 22,7 | |
| Marbot | 2,60 ± 0,05 | 0,91 ± 0,02 | 0,25 ± 0,01 | 9,55 ± 0,01 | 0,74 ± 0,01 | 2,56 ± 0,00 | 1,96 ± 0,02 | 2,32 ± 0,01 | 0,53 ± 0,01 | 21,4 | |
| Mayette | 1,80 ± 0,02 | 0,77 ± 0,01 | 0,33 ± 0,00 | 7,81 ± 0,09 | 0,46 ± 0,01 | 2,06 ± 0,01 | 2,16 ± 0,01 | 1,74 ± 0,14 | 0,71 ± 0,01 | 17,8 | |
| Mellanaise | 2,14 ± 0,07 | 0,57 ± 0,02 | nd | 5,15 ± 0,01 | 0,42 ± 0,00 | 1,60 ± 0,01 | 1,92 ± 0,01 | 1,59 ± 0,02 | 0,63 ± 0,00 | 14,0 | |
| Parisienne | 1,60 ± 0,00 | 0,75 ± 0,00 | 0,10 ± 0,01 | 10,52 ± 0,04 | 0,87 ± 0,01 | 3,09 ± 0,01 | 1,86 ± 0,00 | 2,35 ± 0,02 | 0,55 ± 0,00 | 21,7 | |
| SETEMBRO | | | | | | | | | | | |
| Franquette | 3,28 ± 0,03 | 1,36 ± 0,00 | 0,35 ± 0,00 | 8,43 ± 0,01 | 0,65 ± 0,02 | 2,55 ± 0,01 | 2,40 ± 0,01 | 1,89 ± 0,02 | 0,83 ± 0,02 | 21,8 | |
| Lara | 0,89 ± 0,00 | 0,38 ± 0,01 | 0,12 ± 0,01 | 6,04 ± 0,04 | 0,35 ± 0,01 | 1,58 ± 0,04 | 1,61 ± 0,03 | 1,38 ± 0,04 | 0,51 ± 0,01 | 12,9 | |
| Marbot | 2,04 ± 0,01 | 0,83 ± 0,00 | 0,26 ± 0,00 | 6,79 ± 0,00 | 0,49 ± 0,01 | 2,03 ± 0,08 | 2,26 ± 0,02 | 1,83 ± 0,02 | 0,79 ± 0,02 | 17,3 | |
| Mayette | 3,93 ± 0,04 | 0,91 ± 0,00 | 0,26 ± 0,00 | 8,97 ± 0,12 | 0,72 ± 0,00 | 2,57 ± 0,05 | 3,97 ± 0,03 | 2,69 ± 0,02 | 0,88 ± 0,05 | 24,0 | |
| Mellanaise | 2,76 ± 0,00 | 0,69 ± 0,00 | 0,20 ± 0,00 | 6,66 ± 0,06 | 0,53 ± 0,01 | 2,00 ± 0,01 | 2,42 ± 0,10 | 2,04 ± 0,01 | 0,85 ± 0,04 | 18,2 | |
| Parisienne | 2,14 ± 0,11 | 0,97 ± 0,07 | 0,24 ± 0,02 | 7,94 ± 0,32 | 0,59 ± 0,01 | 2,51 ± 0,07 | 2,44 ± 0,05 | 1,48 ± 0,00 | 1,03 ± 0,04 | 19,3 | |

^a média ± desvio padrão de três determinações; nd: não detectado. ^b3Cqa: ácido 3-cafeoilquínico; 3pCo: ácido 3-p-cumaroilquínico; 4pCo: ácido 4-p-cumaroilquínico; Q3Gal: quercetina 3-galactósido; Q3Pen: quercetina 3-pentósido; Q3Ara: quercetina 3-arabinósido; Q3Xil: quercetina 3-xilósido; Q3Ram: quercetina 3-ramnósido; K3Pent: campferol 3-pentósido.

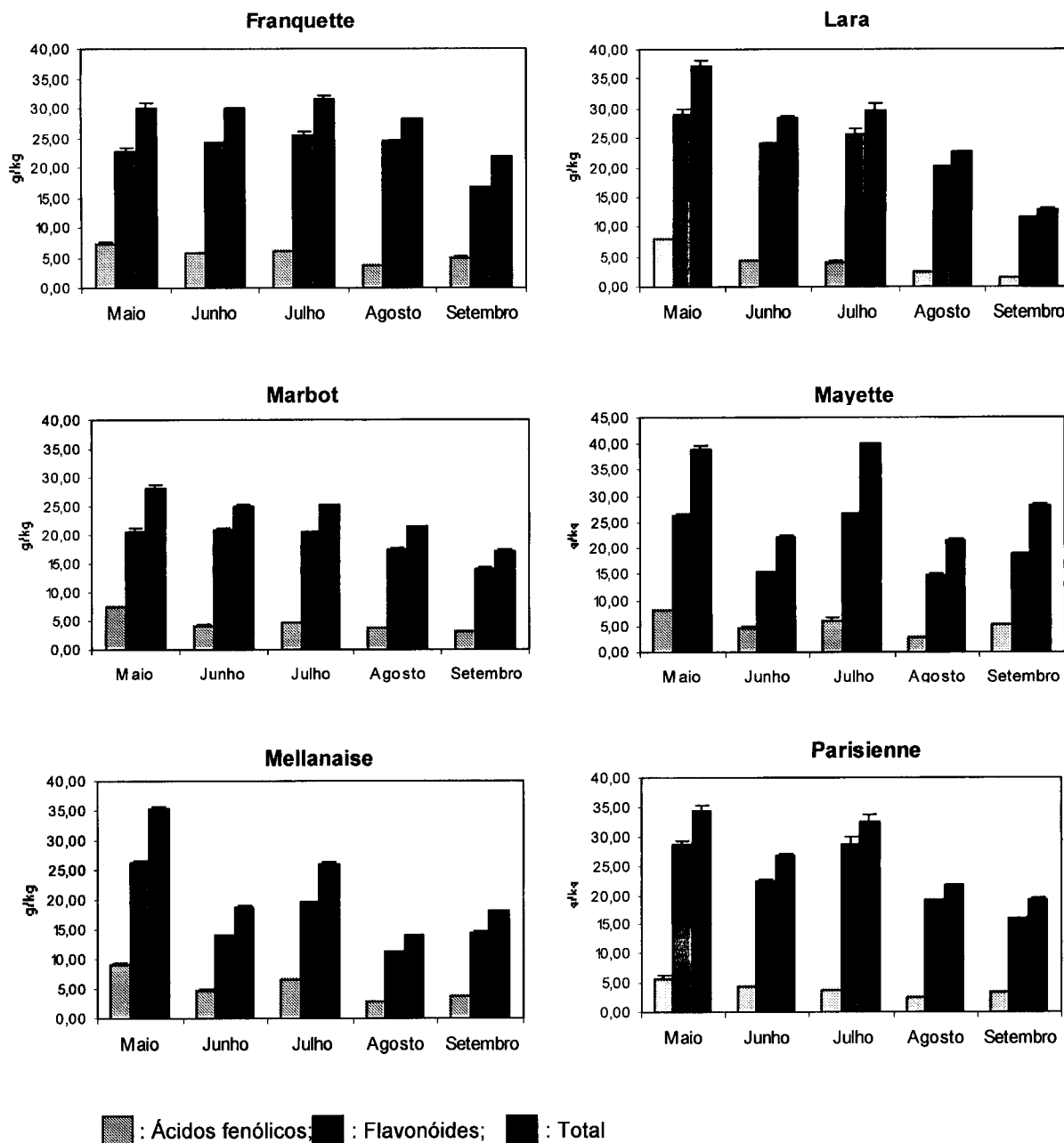


FIGURA 1.13. Evolução dos teores (g/kg) de ácidos fenólicos, flavonóides e compostos fenólicos totais, para as folhas de cada cultivar de noqueira estudada, entre Maio e Setembro de 2002.

Também as cvs. Lara, Marbot e Parisienne apresentaram um comportamento muito similar entre si, apesar de na segunda se verificarem variações quantitativas de menor amplitude ao longo dos meses; todas elas apresentaram teores fenólicos totais mais elevados em Maio, os quais decresceram em Junho, apresentando depois uma ligeira subida em Julho (permanecendo no entanto com valores totais muito próximos dos verificados em Junho). Após este período ocorreu um decréscimo até Setembro. A cv. Franquette

apresentou um comportamento ligeiramente diferente, pelo facto de ter sido a única cultivar que apresentou teores totais mais elevados no mês de Julho e não no mês de Maio como as demais cultivares. No entanto, à excepção do mês de Maio, o comportamento observado nos restantes meses é idêntico ao referido para as cvs. Lara, Marbot e Parisienne.

Considerando a globalidade dos resultados, isto é, os valores médios obtidos tendo em conta todas as cultivares, os teores em ácidos fenólicos, flavonóides e total de compostos fenólicos parecem apontar para uma redução entre Maio e Junho, um aumento em Julho e novamente uma diminuição até Setembro (Figura 1.14). O primeiro decréscimo poderá estar relacionado com o desenvolvimento rápido do fruto em Junho, altura em que a maioria dos nutrientes são canalizados para o crescimento do fruto (Charlot e Germain, 1988). A hipótese de que o teor em flavonóides possa estar relacionado com a exposição solar, uma vez que a função de filtros solares foi já referida para estes compostos, pode ser uma possível explicação para o aumento dos teores verificado em Julho, uma vez que este foi o mês para o qual se verificaram valores mais elevados de radiação solar.

Apesar das diferenças quantitativas ao longo dos meses estudados, o perfil qualitativo obtido não parece ser influenciado pelo mês de recolha das amostras.

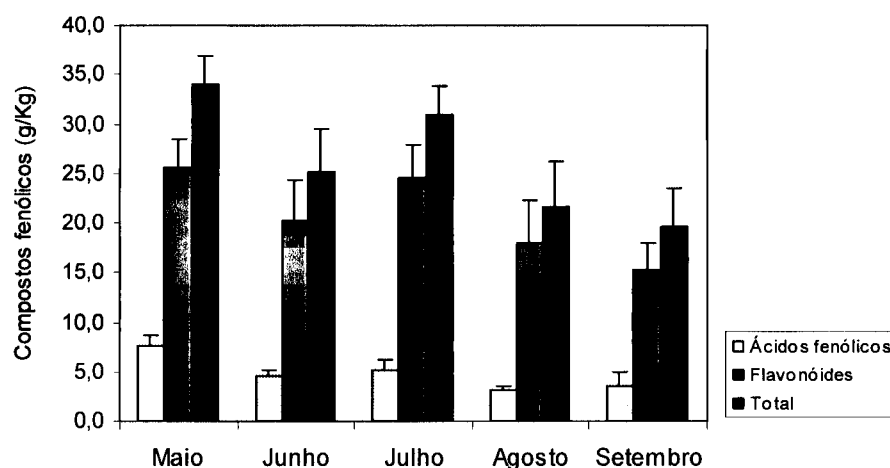


FIGURA 1.14. Evolução dos teores (g/kg) de ácidos fenólicos, flavonóides e compostos fenólicos totais, entre Maio e Setembro de 2002. Resultados médios de seis cultivares de nogueira analisadas; os desvios padrão encontram-se no topo de cada coluna.

Tendo em conta os diversos estudos realizados até ao momento sobre os potenciais efeitos benéficos dos ácidos fenólicos e flavonóides, especialmente no que respeita à sua actividade antioxidante (Cioffi *et al.*, 2002; Valentão *et al.*, 2002; Sakakibara *et al.*, 2003), os resultados obtidos sugerem que, para fins medicinais, as folhas de nogueira deverão ser preferencialmente colhidas em Maio ou Julho, alturas em que o teor de compostos fenólicos é mais elevado. No entanto, uma vez que em Maio muitas folhas novas ainda se encontram

em desenvolvimento, Julho será uma melhor opção, pois o impacto negativo em termos fotossintéticos será provavelmente menor.

Parece ser já facto incontroverso que numerosos factores, incluindo diferenças genéticas, localização geográfica, factores climáticos e práticas agrícolas, podem afectar a composição química das plantas (Macheix *et al.*, 1990; Areias *et al.*, 2000a; Yao *et al.*, 2004). Apesar deste conceito ser frequentemente utilizado para apoiar a rejeição do uso de plantas medicinais, são escassos os estudos detalhados sobre o tipo e a magnitude da influência destes factores, tornando-se desta forma muito difícil proceder à padronização das plantas medicinais. Numa tentativa de alterar esta situação no que respeita ao controlo de qualidade da folha de noqueira, foram analisadas amostras de diferentes cultivares, em diversos anos de produção e em duas localizações geográficas, num total de 34 amostras. De acordo com os resultados obtidos no ano de 2002, nos anos seguintes todas as amostras foram recolhidas no mês de Julho.

Em termos gerais, todas as amostras estudadas apresentaram um perfil qualitativo idêntico (Figura 1.12 e Tabela 1.6), formado pelos compostos fenólicos atrás referidos: ácidos 3-*O*-cafeoilquínico, 3-*p*-cumaroilquínico e 4-*p*-cumaroilquínico, quercetina-3-galactósido, quercetina-3-arabinósido, quercetina-3-xilósido e quercetina-3-ramnósido, e dois compostos parcialmente identificados (quercetina-3-pentósido e campferol-3-pentósido). No entanto, é de mencionar a ausência de ácido 4-*p*-cumaroilquínico em algumas amostras estudadas.

Na Tabela 1.6 apresentam-se as quantidades médias e correspondentes desvios padrão para cada um dos compostos fenólicos detectados nas cultivares estudadas, por ano de produção e localização geográfica. A Figura 1.15 mostra o "fingerprint" fenólico construído mediante os valores da Tabela 1.6.

Tanto quanto é possível saber, os ácidos 3-*p*-cumaroilquínico e 4-*p*-cumaroilquínico são descritos pela primeira vez nesta espécie. Wichtl e Anton (1999) descreveram outros ácidos fenólicos nas folhas de noqueira, nomeadamente os ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico, *p*-hidroxifenilacético, gálgico, salicílico, clorogénico e neoclorogénico. No entanto, à excepção do ácido 3-cafeoilquínico, estes compostos não foram detectados no presente trabalho. Como os referidos autores não indicaram as cultivares utilizadas no estudo, nem tão pouco a proveniência geográfica das amostras, não se pode inferir correlação alguma entre a ausência destes compostos e as cultivares ou as condições edafo-climáticas em estudo. A presença de quercetina 3-galactósido, quercetina 3-arabinósido, quercetina 3-ramnósido, campferol e campferol 3-arabinósido nas folhas de noqueira, foi igualmente descrita pelos mesmos autores se bem que apenas em termos qualitativos.

TABELA 1.6. Composição fenólica (g/kg de folha de nogueira seca)^a das cultivares estudadas, por ano de produção e localização geográfica.

| Cultivar | 3Cqa | 3pCo | 4pCo | Q3Gal | Q3Pen | Q3Ara | Q3Xil | Q3Ram | K3Pen | Total |
|------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| Ano: 2002 | | | | | | | | | | |
| Bragança | | | | | | | | | | |
| Franquette | 4,99 ± 0,12 | 0,95 ± 0,03 | nd | 12,08 ± 0,04 | 1,10 ± 0,00 | 3,44 ± 0,01 | 4,63 ± 0,25 | 2,88 ± 0,16 | 1,41 ± 0,05 | 31,5 |
| Lara | 3,14 ± 0,08 | 0,85 ± 0,03 | 0,12 ± 0,01 | 12,31 ± 0,61 | 1,03 ± 0,11 | 3,58 ± 0,07 | 3,74 ± 0,14 | 3,20 ± 0,09 | 1,67 ± 0,11 | 29,7 |
| Marbot | 3,59 ± 0,00 | 1,01 ± 0,00 | nd | 9,45 ± 0,00 | 0,75 ± 0,01 | 2,85 ± 0,03 | 4,02 ± 0,02 | 2,52 ± 0,00 | 1,13 ± 0,01 | 25,3 |
| Mayette | 3,92 ± 0,51 | 1,56 ± 0,20 | 0,43 ± 0,07 | 12,10 ± 0,76 | 1,02 ± 0,09 | 3,77 ± 0,30 | 4,92 ± 0,28 | 2,99 ± 0,05 | 1,79 ± 0,14 | 32,5 |
| Mellanaise | 5,38 ± 0,05 | 1,05 ± 0,01 | nd | 8,35 ± 0,03 | 0,63 ± 0,04 | 2,56 ± 0,04 | 3,90 ± 0,01 | 2,76 ± 0,04 | 1,40 ± 0,01 | 26,0 |
| Parisienne | 2,39 ± 0,27 | 1,32 ± 0,07 | nd | 14,58 ± 0,51 | 1,50 ± 0,04 | 4,48 ± 0,17 | 4,04 ± 0,12 | 2,59 ± 0,15 | 1,58 ± 0,11 | 32,5 |
| Ano: 2003 | | | | | | | | | | |
| Bragança | | | | | | | | | | |
| Franquette | 1,20 ± 0,06 | 0,87 ± 0,04 | 0,38 ± 0,01 | 4,42 ± 0,01 | 0,07 ± 0,00 | 0,75 ± 0,04 | 0,43 ± 0,04 | 2,23 ± 0,14 | 0,04 ± 0,00 | 10,4 |
| Lara | 0,49 ± 0,04 | 0,27 ± 0,02 | 0,17 ± 0,03 | 2,85 ± 0,03 | 0,04 ± 0,01 | 0,41 ± 0,04 | 0,46 ± 0,04 | 1,15 ± 0,21 | nd | 5,8 |
| Marbot | 1,27 ± 0,07 | 0,49 ± 0,03 | 0,19 ± 0,02 | 4,29 ± 0,02 | 0,13 ± 0,01 | 0,97 ± 0,04 | 0,35 ± 0,02 | 1,64 ± 0,14 | 0,15 ± 0,01 | 9,5 |
| Mayette | 1,01 ± 0,06 | 0,86 ± 0,08 | 0,37 ± 0,01 | 7,12 ± 0,01 | 0,11 ± 0,01 | 1,10 ± 0,08 | 0,38 ± 0,02 | 2,48 ± 0,15 | 0,08 ± 0,01 | 13,5 |
| Mellanaise | 0,71 ± 0,03 | 0,31 ± 0,03 | nd | 2,31 ± 0,00 | nd | 0,23 ± 0,01 | 0,24 ± 0,03 | 1,32 ± 0,02 | 0,07 ± 0,00 | 5,2 |
| Parisienne | 0,62 ± 0,01 | 0,43 ± 0,00 | 0,32 ± 0,00 | 4,11 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,62 ± 0,05 | 0,21 ± 0,01 | 1,36 ± 0,10 | 0,07 ± 0,00 | 7,7 |
| Coimbra | | | | | | | | | | |
| Arco | 2,52 ± 0,21 | 0,56 ± 0,07 | 0,16 ± 0,01 | 19,22 ± 1,30 | 1,37 ± 0,11 | 4,94 ± 0,38 | 4,38 ± 0,24 | 4,26 ± 0,36 | 0,63 ± 0,02 | 38,0 |
| Franquette | 3,64 ± 0,09 | 0,99 ± 0,02 | 0,12 ± 0,01 | 9,64 ± 0,22 | 0,68 ± 0,02 | 2,60 ± 0,09 | 3,91 ± 0,15 | 4,63 ± 0,01 | 1,18 ± 0,06 | 27,4 |
| Hartley | 1,54 ± 0,07 | 1,07 ± 0,06 | 0,39 ± 0,03 | 8,42 ± 0,43 | 0,44 ± 0,01 | 1,93 ± 0,14 | 1,08 ± 0,05 | 1,53 ± 0,13 | 0,26 ± 0,00 | 16,7 |
| Lara | 1,85 ± 0,08 | 0,72 ± 0,07 | 0,21 ± 0,00 | 10,31 ± 0,45 | 0,61 ± 0,02 | 2,90 ± 0,13 | 1,35 ± 0,10 | 3,56 ± 0,07 | 0,19 ± 0,00 | 21,7 |
| Mayette | 1,04 ± 0,11 | 0,86 ± 0,08 | 0,37 ± 0,01 | 7,51 ± 0,69 | 0,11 ± 0,01 | 1,15 ± 0,12 | 0,51 ± 0,03 | 2,73 ± 0,29 | 0,08 ± 0,01 | 14,4 |
| Mellanaise | 1,29 ± 0,09 | 0,47 ± 0,03 | 0,25 ± 0,01 | 5,58 ± 0,44 | 0,21 ± 0,01 | 1,44 ± 0,13 | 0,32 ± 0,01 | 2,75 ± 0,23 | 0,03 ± 0,00 | 12,4 |
| Parisienne | 1,07 ± 0,09 | 0,73 ± 0,06 | 0,24 ± 0,01 | 11,22 ± 0,72 | 0,42 ± 0,03 | 2,73 ± 0,17 | 0,50 ± 0,03 | 2,86 ± 0,14 | 0,14 ± 0,00 | 19,9 |
| Rego | 2,47 ± 0,19 | 0,46 ± 0,02 | 0,20 ± 0,02 | 12,84 ± 0,79 | 0,58 ± 0,00 | 3,13 ± 0,14 | 1,35 ± 0,29 | 3,80 ± 0,18 | 0,04 ± 0,00 | 24,9 |
| Ano: 2004 | | | | | | | | | | |
| Bragança | | | | | | | | | | |
| Franquette | 3,33 ± 0,17 | 0,69 ± 0,04 | 0,18 ± 0,01 | 6,37 ± 0,31 | 0,43 ± 0,05 | 1,91 ± 0,17 | 1,48 ± 0,06 | 3,36 ± 0,18 | 0,76 ± 0,01 | 18,5 |
| Lara | 1,44 ± 0,05 | 0,50 ± 0,02 | 0,21 ± 0,01 | 6,42 ± 0,19 | 0,28 ± 0,00 | 1,76 ± 0,07 | 0,78 ± 0,04 | 2,80 ± 0,06 | 0,15 ± 0,00 | 14,3 |
| Marbot | 3,06 ± 0,11 | 0,93 ± 0,03 | 0,23 ± 0,02 | 6,17 ± 0,10 | 0,42 ± 0,04 | 1,76 ± 0,04 | 0,91 ± 0,01 | 3,05 ± 0,23 | 0,53 ± 0,02 | 17,1 |
| Mayette | 2,44 ± 0,04 | 1,20 ± 0,03 | 0,21 ± 0,01 | 8,21 ± 0,13 | 0,69 ± 0,09 | 2,51 ± 0,06 | 3,26 ± 0,29 | 2,57 ± 0,11 | 1,23 ± 0,02 | 22,3 |
| Mellanaise | 2,51 ± 0,17 | 0,52 ± 0,03 | 0,17 ± 0,02 | 4,57 ± 0,26 | 0,26 ± 0,01 | 1,43 ± 0,06 | 0,62 ± 0,02 | 2,56 ± 0,06 | 0,38 ± 0,03 | 13,0 |
| Parisienne | 2,40 ± 0,22 | 0,85 ± 0,08 | 0,13 ± 0,01 | 8,33 ± 0,63 | 0,43 ± 0,03 | 2,44 ± 0,20 | 1,63 ± 0,15 | 2,46 ± 0,12 | 0,68 ± 0,02 | 19,4 |
| Coimbra | | | | | | | | | | |
| Arco | 1,26 ± 0,03 | 1,01 ± 0,01 | 0,29 ± 0,03 | 7,23 ± 0,16 | 0,45 ± 0,02 | 2,23 ± 0,12 | 2,05 ± 0,08 | 2,28 ± 0,11 | 0,63 ± 0,01 | 17,4 |
| Franquette | 1,16 ± 0,06 | 0,43 ± 0,01 | 0,11 ± 0,01 | 6,18 ± 0,28 | 0,30 ± 0,01 | 1,55 ± 0,08 | 0,85 ± 0,05 | 2,90 ± 0,09 | 0,50 ± 0,01 | 14,0 |
| Hartley | 1,35 ± 0,05 | 0,48 ± 0,01 | 0,14 ± 0,01 | 7,94 ± 0,31 | 0,49 ± 0,03 | 2,48 ± 0,12 | 1,72 ± 0,07 | 2,63 ± 0,02 | 0,29 ± 0,01 | 17,5 |
| Lara | 1,13 ± 0,09 | 0,39 ± 0,03 | 0,04 ± 0,00 | 6,65 ± 0,58 | 0,43 ± 0,03 | 1,89 ± 0,22 | 3,09 ± 0,30 | 2,46 ± 0,08 | 1,38 ± 0,09 | 17,5 |
| Mayette | 1,33 ± 0,09 | 0,96 ± 0,07 | 0,19 ± 0,01 | 8,77 ± 0,59 | 0,52 ± 0,03 | 2,46 ± 0,19 | 1,98 ± 0,19 | 2,53 ± 0,12 | 0,60 ± 0,03 | 19,3 |
| Mellanaise | 1,15 ± 0,11 | 0,41 ± 0,04 | 0,22 ± 0,03 | 6,28 ± 0,60 | 0,41 ± 0,04 | 1,96 ± 0,20 | 0,85 ± 0,10 | 2,86 ± 0,14 | 0,18 ± 0,01 | 14,3 |
| Parisienne | 1,12 ± 0,06 | 0,81 ± 0,04 | 0,17 ± 0,01 | 7,34 ± 0,36 | 0,47 ± 0,06 | 2,17 ± 0,13 | 1,99 ± 0,14 | 2,22 ± 0,20 | 0,79 ± 0,03 | 17,1 |
| Rego | 1,66 ± 0,08 | 0,42 ± 0,02 | 0,36 ± 0,01 | 9,41 ± 0,34 | 0,30 ± 0,00 | 2,01 ± 0,05 | 0,50 ± 0,01 | 3,20 ± 0,07 | nd | 17,9 |

^a média ± desvio padrão de três determinações; ^b identificação dos compostos como na Tabela 1.5; nd: não detectado.

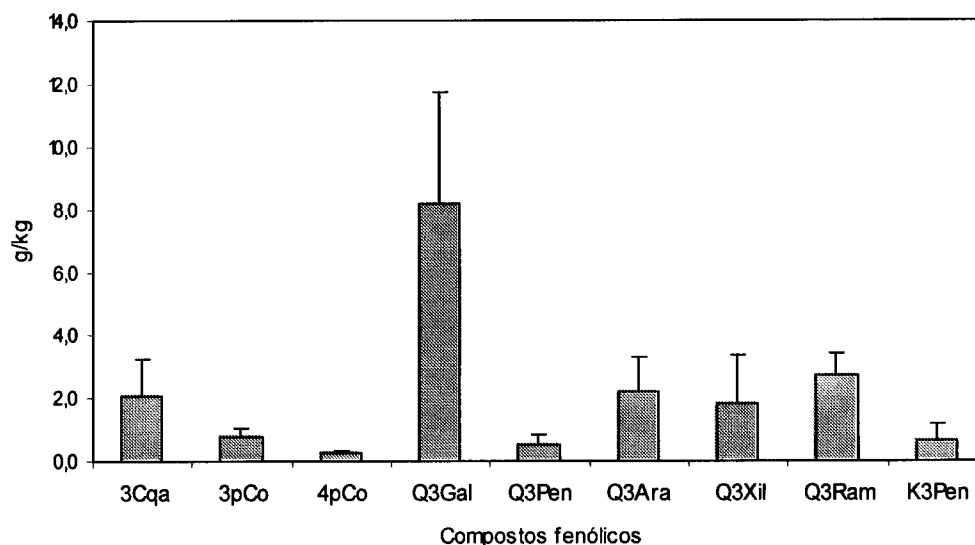


FIGURA 1.15. Perfil fenólico da folha de noqueira. Os resultados correspondem à média de todas as amostras estudadas; as barras de erro representam os desvios padrão para cada composto. 3Cqa: ácido 3-cafeoilquínico; 3pCo: ácido 3-*p*-cumaroilquínico; 4pCo: ácido 4-*p*-cumaroilquínico; Q3gal: quercetina 3-galactósido; Q3Pen: quercetina 3-pentósido; Q3Ara: quercetina 3-arabinósido; Q3Xil: quercetina 3-xilósido; Q3Ram: quercetina 3-ramnósido; K3Pen: campferol 3-pentósido.

Como se constata pela observação da Tabela 1.6 e da Figura 1.15, também os perfis quantitativos das amostras estudadas apresentam semelhanças, nomeadamente o facto de em todas as amostras a quercetina 3-galactósido ser o composto maioritário e o ácido 3-cafeoilquínico ser o ácido fenólico que existe em quantidade superior. No entanto verificam-se, igualmente, diferenças quantitativas entre as amostras analisadas, desde logo pela observação da grande variação existente relativamente ao teor total de compostos fenólicos nas amostras, o qual varia entre um valor mínimo de 5,2 g/kg e 38,0 g/kg, o que representa um aumento de sete vezes.

Atendendo às variações quantitativas encontradas, procedeu-se à análise estatística dos dados obtidos. Numa primeira abordagem, procedeu-se a uma análise de correlação tendo sido encontradas correlações elevadas entre todas as combinações dos seguintes compostos: quercetina 3-galactósido, quercetina 3-pentósido, quercetina 3-arabinósido e quercetina 3-xilósido, uma vez que os valores do coeficiente de correlação de Pearson variaram entre 0,8332 e 0,9186 e os valores do coeficiente de correlação de Spearman variaram entre 0,9186 e 0,9395. A título de exemplo, a Figura 1.16 mostra uma correlação positiva, verificada entre a quercetina 3-arabinósido e a quercetina 3-galactósido, evidenciando o facto de que as amostras com teores superiores em quercetina 3-arabinósido apresentam igualmente teores elevados de quercetina 3-galactósido.

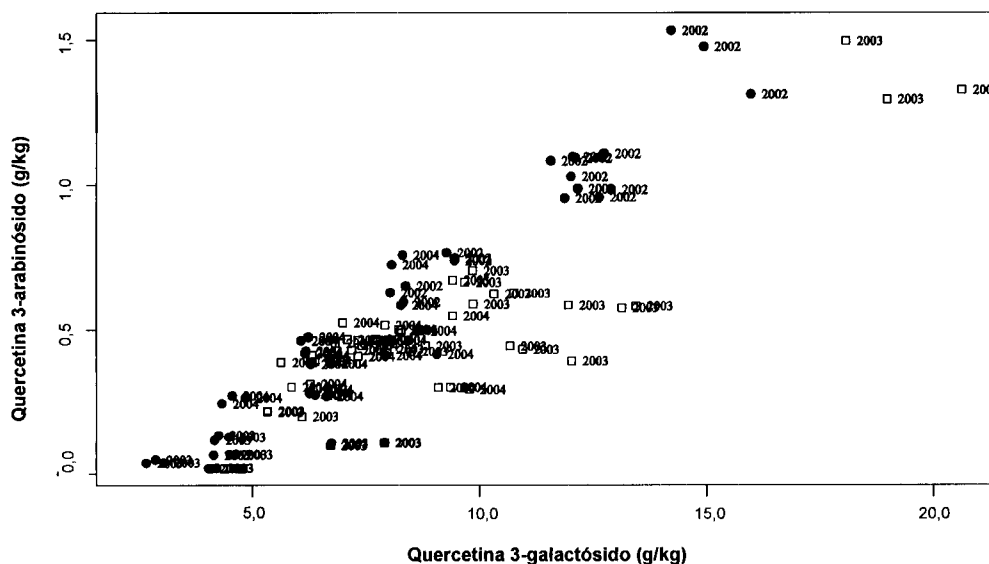


FIGURA 1.16. Análise de correlação entre a quercetina 3-arabinósido e a quercetina 3-galactósido. Símbolos: ●: amostras provenientes de Bragança; □: amostras provenientes de Coimbra.

Para a generalidade das cultivares estudadas, as correlações positivas mencionadas parecem ser independentes do ano e localização geográfica. A quercetina 3-galactósido apresentou uma grande variação entre os valores mínimos e máximos ao longo dos anos de 2002 a 2004, variando entre 2,3 e 19,2 g/kg; a quercetina 3-arabinósido variou entre 0,2 e 3,8 g/kg, a quercetina 3-xilósido entre 0,2 e 4,9 g/kg e a quercetina 3-pentósido entre 0,02 e 1,4 g/kg. Verificou-se ainda uma forte correlação entre estes quatro compostos e o teor total em fenóis, o que indica que a grande variabilidade verificada neste grupo de compostos influenciou fortemente o valor total de fenóis nas amostras analisadas. Este facto suporta a ideia de que o gráfico representado na Figura 1.15 representa, com um significativo nível de confiança, o “fingerprint” fenólico das folhas de noqueira dado que, apesar de o teor total de fenóis poder apresentar grandes variações, as proporções entre um número razoável dos compostos que constituem esse “fingerprint” mantêm-se razoavelmente constantes entre si. A análise da Figura 1.16 parece ainda evidenciar a inexistência de diferenças significativas entre as duas localizações geográficas.

A existência de diferenças significativas foi inicialmente avaliada pela realização de testes de análise de variância (F-test). Os resultados apresentados na Tabela 1.7 evidenciam diferenças entre os 3 anos, uma vez que existem diferenças significativas ($p > 0,001$) para todos os compostos fenólicos, com exceção do campferol 3-pentósido. Verificou-se igualmente a existência de diferenças significativas entre amostras de diferentes cultivares e entre amostras de diferentes localizações geográficas (Tabela 1.7), indicando a existência de pelo menos uma amostra significativamente diferente das restantes. Através da análise de variância constatou-se ainda a existência de amostras consideradas “outliers”, dado que os

resultados obtidos aplicando o teste de Tuckey sugeriram, com um nível de confiança de 95%, que a amostra Arco (Coimbra, 2003) era uma amostra atípica. O mesmo teste revelou ainda que a cultivar Parisienne (Bragança, 2002) se distingue das restantes cultivares provenientes de Bragança, qualquer que seja o ano considerado.

TABELA 1.7. Resultado das análises de variância por ano, cultivar e localização (loc.) geográfica.

| | Compostos Fenólicos ^a | | | | | | | | Total |
|-----------------|----------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------------|---------|
| | 3Cqa | 3pCo | Q3Gal | Q3Pen | Q3Ara | Q3Xil | Q3Ram | K3Pen | |
| Ano | p<0,001 | p<0,001 | p<0,001 | p<0,001 | p<0,001 | p<0,001 | p<0,001 | ns ^b | p<0,001 |
| Cultivar | p<0,05 | p<0,01 | p<0,001 | p<0,001 | ns | p<0,05 | ns | p<0,001 | ns |
| Loc. geográfica | ns | p<0,001 | p<0,05 | p<0,05 | ns | ns | ns | p<0,001 | p<0,001 |

^a designação dos compostos como na Figura 1.15. ^b não significativo.

Seguidamente, realizou-se uma análise de componentes principais de forma a reconhecer tendências ou padrões no que respeita ao perfil fenólico das amostras estudadas. Inicialmente, construiu-se um gráfico obtido de um modelo linear incluindo todos os compostos fenólicos, à excepção do ácido 4-*p*-cumaroilquínico, não detectado num número elevado de amostras (Tabela 1.6), utilizando apenas os dados referentes às cultivares comuns entre Bragança e Coimbra (Franquette, Lara, Mayette, Mellanaise and Parisienne) e aos anos comuns entre as duas localizações geográficas (2003 e 2004). Não sendo evidentes diferenças significativas entre localizações geográficas e entre cultivares, as amostras recolhidas em Bragança no ano 2002 e as cultivares de Coimbra não comuns com Bragança (Arco, Hartley e Rego) foram posteriormente incluídas na análise. A Figura 1.17 apresenta a imagem global das principais diferenças obtidas; dois componentes principais explicam 74,3% da variabilidade total, PC₁ (59,8%) e PC₂ (14,5%). PC₁ expressa o teor da maioria dos compostos fenólicos e PC₂ expressa a relação inversa entre os teores de quercetina 3-galactósido e 3-arabinósido *versus* os de quercetina 3-xilósido e campferol 3-pentósido.

De um modo geral, a Figura 1.17 não evidencia diferenças significativas entre as localizações geográficas e entre as cultivares. Embora algumas amostras obtidas em Bragança no ano 2003 sejam distintas de amostras obtidas em Coimbra, as amostras das duas localizações geográficas parecem ser, de uma forma geral, similares relativamente à sua composição fenólica. Na mesma figura pode ainda constatar-se que a cultivar Arco (Coimbra 2003) é claramente uma amostra atípica, apresentando teores em fenóis significativamente superiores às restantes amostras obtidas em 2003 e 2004, confirmando a observação anteriormente feita relativamente à análise de variância.

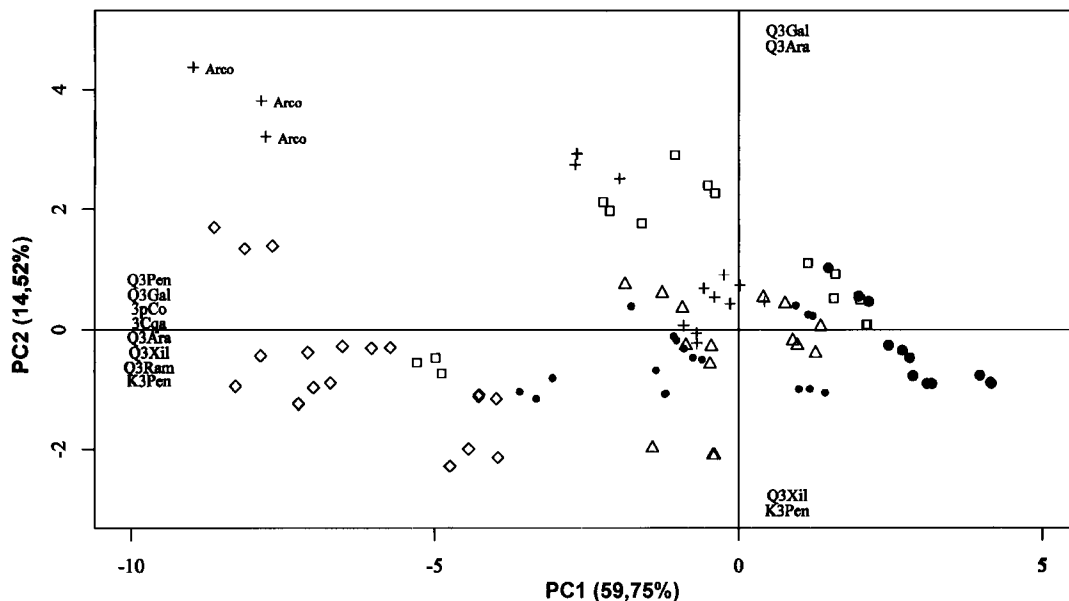


FIGURA 1.17. PCA obtido com os dados referentes às cultivares e anos comuns entre Bragança e Coimbra, com a projecção dos dados referentes a Bragança, ano de 2002, e dos dados das cultivares não comuns de Coimbra (Arco, Hartley e Rego). Símbolos: \diamond : Bragança 2002; \bullet : Bragança 2003; \circ : Bragança 2004; \square : Coimbra 2003; \triangle : Coimbra 2004; +: cultivares não comuns de Coimbra (Arco, Hartley e Rego). Designação dos compostos como na Figura 1.15.

Observando as amostras referentes a Bragança, ano 2002, facilmente se observa que estas amostras estão claramente separadas das demais, exibindo quantidades da maioria dos compostos significativamente superiores relativamente às restantes amostras analisadas. Desta forma, realizou-se outra PCA apenas com as amostras provenientes de Bragança, com o objectivo de discernir padrões entre os três anos de estudo. A Figura 1.18 mostra o gráfico obtido, no qual as duas PC representam 87,9% da variância total. Os 3 anos encontram-se separados na PC₁, a qual representa a grande maioria da informação contida nos dados (78,3%), reflectindo os teores superiores e inferiores verificados em 2002 e 2003, respectivamente. Os anos 2003 e 2004 separam-se principalmente devido às diferenças de teor do ácido 3-cafeoilquínico e quercetina 3-ramnósido (mais altos em 2003) e pelos teores do ácido 3-*p*-cumaroilquínico e quercetina 3-galactósido (mais altos em 2004).

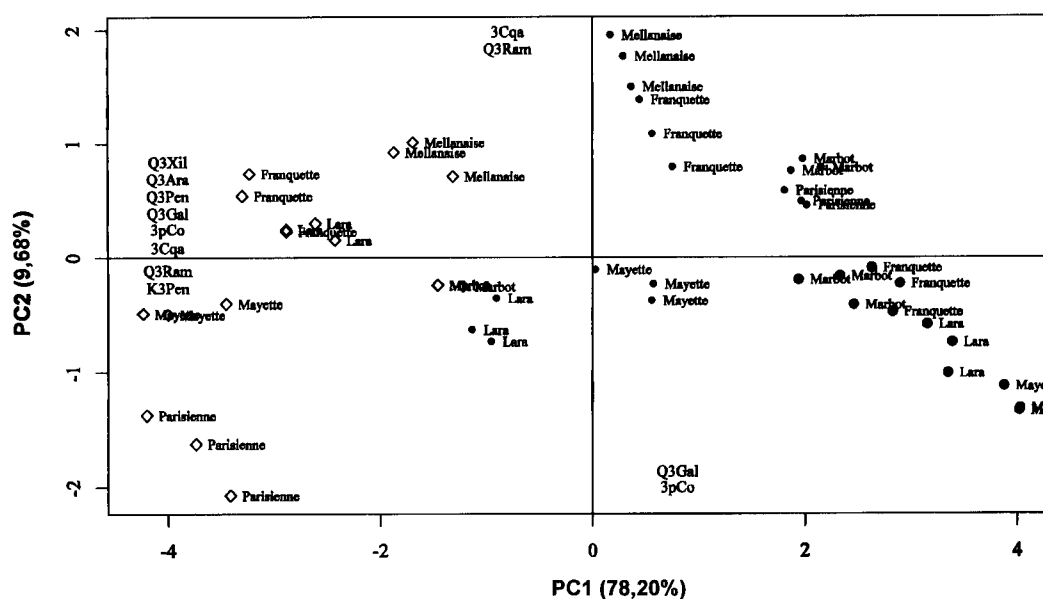


FIGURA 1.18. PCA obtido com os dados referentes às cultivares provenientes de Bragança (2002, 2003 e 2004). Símbolos: \diamond : Bragança 2002; \bullet : Bragança 2003; \circ : Bragança 2004. Designação dos compostos como na Figura 1.15.

As diferenças referidas podem possivelmente estar relacionadas com as diferenças climáticas ocorridas ao longo dos três anos estudados. Segundo dados do Instituto Nacional de Meteorologia, em Portugal, 2004 caracterizou-se por apresentar o valor mais baixo de pluviosidade desde 1931. Durante esse ano, as cidades de Bragança e Coimbra foram ambas consideradas como estando sujeitas a seca severa; mais ainda, Junho (o mês antecedente à recolha das amostras) foi considerado excepcionalmente seco e com altas temperaturas. Relativamente aos anos 2002 e 2003, entre Janeiro e Junho observaram-se diferenças relativamente à pluviosidade dos dois anos; em termos de temperaturas, o ano de 2003 caracterizou-se por um Verão extremamente quente, tendo sido o segundo Verão mais quente desde 1931. No entanto saliente-se que muito provavelmente este facto não terá afectado as amostras de 2003, uma vez que a vaga de calor se fez sentir entre 29 de Julho e 15 de Agosto, e as amostras foram recolhidas na terceira semana de Julho.

Apesar de ser difícil tirar conclusões relativamente à forma como o clima pode afectar o perfil fenológico das folhas de noqueira, os resultados obtidos parecem sugerir que o teor em fenóis das folhas de noqueira pode ser influenciado pelas condições climáticas, uma vez que foram observadas diferenças significativas nos seus teores ao longo dos três anos estudados, quando consideradas as mesmas cultivares, provenientes do mesmo campo e sujeitas às mesmas práticas agrícolas.

Com base nos dados obtidos e de forma a poder retirar conclusões mais detalhadas que expliquem as variações do perfil fenológico observadas, seria recomendável a execução de um

estudo aprofundado, no qual fossem recolhidos dados climáticos *in situ*, bem como um registo das condições do solo e de todas as práticas agrícolas efectuadas.

8. CONCLUSÕES

Numa resenha dos resultados obtidos e respectiva discussão, podem-se tirar as seguintes conclusões globais:

- Relativamente à folha de aveleira, foram identificados, pela técnica HPLC/DAD/ESI-MS/MS, um total de 8 compostos fenólicos: ácidos 5-cafeoilquínico, 3-cafeoilquínico, cafeoiltartárico e *p*-cumaroiltartárico, miricetina-3-ramnósido, quercetina 3-ramnósido, quercetina 3-glúcósido e campferol-3-ramnósido. Detectou-se ainda a presença de três compostos parcialmente identificados como derivados da miricetina. A grande maioria das amostras apresentou um perfil qualitativo idêntico, no qual o composto maioritário é a miricetina 3-ramnósido, seguindo-se-lhe a quercetina 3-ramnósido. O ácido fenólico maioritário foi o ácido 5-cafeoilquínico, o qual, salvo raras excepções, apresentou teores inferiores aos da quercetina 3-ramnósido. Três dos compostos identificados (ácidos 3-cafeoilquínico, cafeoiltartárico e *p*-cumaroiltartárico) existem em quantidades vestigiais, não tendo sido detectados em algumas amostras.
- Relativamente à folha de noqueira, foram identificados pela mesma técnica, um total de 9 compostos fenólicos: ácidos 3-*O*-cafeoilquínico, 3-*p*-cumaroilquínico e 4-*p*-cumaroilquínico, quercetina-3-galactósido, quercetina-3-arabinósido, quercetina-3-xilósido, quercetina-3-ramnósido, quercetina-3-pentósido e campferol-3-pentósido. A generalidade das amostras exibiu um perfil qualitativo similar, caracterizado por teores elevados de quercetina 3-galactósido, comparativamente aos restantes compostos. À excepção do ácido 4-*p*-cumaroilquínico, não detectado em algumas amostras, todos os outros compostos foram identificados e quantificados em todas as amostras estudadas.
- Quer para a folha de aveleira, quer para a de noqueira, concluiu-se que, apesar de existirem diferenças quantitativas ao longo dos meses estudados, o perfil qualitativo obtido não parece ser influenciado pelo mês de colheita das amostras.
- No caso da folha de aveleira, foram estudadas mensalmente 4 cultivares, as quais, ao longo dos meses estudados, apresentaram um padrão de variação quantitativa similar. Verificou-se existir um aumento do teor fenólico total entre os meses de Maio a Julho, ocorrendo depois um decréscimo acentuado de Julho a Agosto e um novo aumento de

Agosto a Setembro. Todas as cultivares apresentaram valores máximos em Julho e valores mínimos em Agosto.

- No caso da folha de noqueira, todas as cultivares (seis) foram estudadas mensalmente em termos da sua composição fenólica. No período temporal considerado (Maio - Setembro), apesar de existirem algumas diferenças pontuais, as cultivares estudadas apresentaram um padrão de variação quantitativa globalmente idêntico entre si. Para todas elas verificou-se que Maio e Julho foram os meses em que as folhas apresentaram teores superiores de fenóis totais e Agosto e Setembro os meses em que estes teores foram mínimos.
- Foram referidas algumas teorias sugeridas por vários autores, as quais poderão justificar os referidos padrões de variação quantitativa ao longo dos meses, salientando-se, no entanto, que os conhecimentos actuais apenas permitem avançar com hipóteses.
- Salvaguardando o facto de que mais estudos, nomeadamente farmacológicos e clínicos, serão necessários para confirmar a actividade terapêutica destas espécies, sendo as folhas de ambas as espécies utilizadas em medicina tradicional e considerando os potenciais efeitos benéficos descritos na literatura científica actual para os compostos estudados, é razoável inferir que as propriedades medicinais que lhes são atribuídas possam estar relacionadas com os elevados teores de fenóis. Desta forma, os resultados deste estudo indicam que, as folhas de aveleira que se destinem a ser utilizadas com finalidades medicinais deverão ser colhidas preferencialmente em Julho e as de noqueira preferencialmente em Maio ou Julho, de forma a que os seus teores fenólicos sejam tendencialmente mais elevados.
- Relativamente à aveleira, os resultados da análise estatística demonstraram a existência de correlações entre todos os flavonóides identificados, reforçando desta forma a existência de um perfil fenólico associado característico. Observaram-se, no entanto, algumas diferenças menores. Verificou-se que o factor “ano de colheita” exerceu alguma influência no teor fenólico total, uma vez que o ano 2002 apresentou valores significativamente mais elevados quando comparados com 2003 e 2004. Também a cultivar parece exercer alguma influência no perfil quantitativo das amostras. Através da análise de regressão logística foi possível verificar que, apesar de não se formarem grupos de cultivares completamente distintos, algumas cultivares apresentaram semelhanças entre si, diferenciando-se das demais. Verificou-se, também que algumas cultivares apresentaram comportamentos muito característicos ao longo dos três anos de estudo, ao passo que outras, pelo contrário, apresentaram

uma grande variabilidade. Verificou-se ainda que o factor “localização geográfica” parece não influenciar de forma significativa a composição fenólica da folha de aveleira.

- No que concerne à folha de noqueira, verificaram-se fortes correlações entre alguns dos compostos identificados. O factor “ano de colheita” pareceu influenciar de forma mais marcada o perfil quantitativo, comparativamente ao verificado na folha de aveleira, uma vez que a composição fenólica foi significativamente afectada por este parâmetro. Apesar de algumas amostras provenientes de diferentes localizações geográficas apresentarem diferenças significativas, se atendermos à globalidade dos resultados, este parâmetro parece não influir de forma marcada na composição fenólica da folha de noqueira. Da mesma forma, apesar de algumas cultivares apresentarem diferenças significativas no que diz respeito aos teores de alguns dos compostos estudados, nenhuma cultivar apresentou um comportamento característico ao longo dos três anos de estudo distinguindo-se das restantes.
- Com base nos dados obtidos e de forma a poder tirar conclusões mais detalhadas que explicassem as variações do perfil fenólico determinadas, seria recomendável a execução de um estudo aprofundado, no qual fossem recolhidos dados climáticos *in situ*, bem como um registo das condições do solo e de todas as práticas agrícolas efectuadas.

PARTE 2

SEMENTES DE AVELEIRA E DE NOGUEIRA

CAPÍTULO 2

INTRODUÇÃO GERAL

I – INTRODUÇÃO

1. FRUTOS SECOS

Os frutos secos, na sua generalidade, apresentam uma composição similar do ponto de vista nutricional sendo, caracteristicamente, alimentos com elevado teor de lípidos. No entanto, apesar do seu elevado teor em gordura, verifica-se uma predominância de ácidos gordos insaturados em detrimento dos saturados. Na generalidade, os teores de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) são superiores aos de polinsaturados (PUFA), embora, em alguns casos, nomeadamente na noz, se verifique o contrário. Em qualquer dos casos, a razão insaturados/saturados é sempre extremamente favorável quando comparada com a generalidade dos alimentos com teores elevados de gordura. A maioria dos frutos secos possui um teor proteico razoável, com a particularidade de apresentarem interessantes teores de arginina, aminoácido que intervêm na formação de óxido nítrico, para além de outras funções. Os frutos secos são ainda ricos em determinados compostos amplamente conhecidos pelas funções que desempenham a nível do organismo humano, nomeadamente ácido fólico, vitamina E, fitosteróis e minerais (cálcio, magnésio, cobre, potássio, selénio e zinco) (Sabaté *et al.*, 2000).

Nas últimas décadas tem-se assistido a um interesse crescente neste tipo de alimentos, principalmente devido aos resultados de estudos epidemiológicos prospectivos, os quais sugerem que o consumo frequente de frutos secos pode ter efeitos benéficos para a saúde humana. O primeiro estudo realizado, denominado "The Adventist Health Study" decorreu numa comunidade religiosa da Califórnia, envolvendo a participação de mais de 31 mil pessoas durante um período de seis anos (Fraser *et al.*, 1992; Sabaté, 1999). Esta comunidade apresentava a particularidade de ser muito cuidadosa com a dieta e a saúde, sendo que a maioria dos seus membros não consumia tabaco nem álcool, e fazia uma dieta equilibrada, na qual se incluía o consumo frequente de frutos secos. Os resultados obtidos sugeriram que o consumo de frutos secos estava inversamente relacionado com o risco de sofrer de enfarte agudo do miocárdio ou de morrer devido a doenças cardiovasculares. Em estudos subsequentes conduzidos na mesma população, verificou-se que as pessoas que comiam frutos secos 5 ou mais vezes por semana apresentavam uma redução de 12% no risco de desenvolver DCV (Fraser *et al.*, 1995). Estes dados pareciam indicar não somente uma protecção contra DCV devido ao consumo de frutos secos, como também um acréscimo de longevidade para aqueles que desenvolviam DCV, uma vez que estas doenças tinham tendência a manifestar-se mais tardiamente. Para além deste estudo, outros foram realizados, tendo-se obtido resultados semelhantes, nomeadamente o "Iowa Women's Health Study" (Kushi *et al.*, 1996), no qual cerca de 34 mil mulheres, com idades compreendidas

entre 55 e 69 anos, foram seguidas durante um período de 7 anos, o “Nurses’ Health Study” (Hu *et al.*, 1998), envolvendo cerca de 86 mil enfermeiras durante um período de 14 anos e o “Physicians Health Study” (Albert *et al.*, 2002), envolvendo cerca de 22 mil médicos do sexo masculino durante um período de 12 anos.

Os resultados obtidos com os estudos epidemiológicos estimularam a realização de diversos estudos clínicos. Foram, então, realizados vários estudos envolvendo o consumo de diversos frutos secos, a maioria dos quais executados de forma controlada e duplamente cega. De entre a generalidade dos frutos secos, aquele que foi alvo de maior quantidade de estudos clínicos foi, indubitavelmente, a noz (Sabaté *et al.*, 1993; Chisholm *et al.*, 1998; Zambon, *et al.*, 2000; Almario *et al.*, 2001; Iwamoto *et al.*, 2002; Morgan *et al.*, 2002). Na maior parte dos referidos estudos foram comparadas duas dietas idênticas, sendo uma delas suplementada com nozes. A Tabela 2.1 apresenta resumidamente as características mais importantes e os resultados de cada estudo. Como se constata na tabela, e segundo a opinião de vários autores (Kris-Etherton, *et al.*, 1999; Sabaté *et al.*, 2000; Feldman, 2002), estes estudos parecem indicar que o consumo de nozes tem um efeito positivo no perfil lipídico sanguíneo. Todos os estudos demonstraram a redução dos níveis de colesterol total e colesterol-LDL, embora os resultados não tenham sido unânimes relativamente aos resultados obtidos para o colesterol-HDL e triacilgliceróis (Tabela 2.1). Ao contrário do que acontece com a noz, foram escassos os estudos realizados com a avelã.

Devido ao seu elevado teor em gordura, o consumo de frutos secos foi sendo associado ao aumento de peso corporal e, por este motivo, frequentemente banido das dietas. No entanto, os estudos mais recentes parecem demonstrar que esta ideia não é correcta. De facto, para além de se verificar, em estudos epidemiológicos, que as pessoas habitualmente consumidoras de frutos secos apresentam índices de massa corporal tendencialmente mais baixos (Fraser *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1998), também em estudos clínicos se verificou a ausência de aumento de peso (Sabaté *et al.*, 1993; Iwamoto *et al.*, 2002; García-Lorda *et al.*, 2003; Sabaté, 2003). Pelo contrário, em alguns estudos verificou-se uma tendência para perda de peso (Abbey *et al.*, 1994; Chisholm *et al.*, 1998; Zambón *et al.*, 2000), que em alguns casos foi mesmo significativa (Sabaté, 2003). Foram sugeridas várias hipóteses que pudessem explicar este facto, nomeadamente a incompleta absorção dos lípidos presentes nos frutos secos, o efeito de saciedade, e a adaptação do metabolismo de forma a que mais energia seja consumida evitando a acumulação de gordura (Sabaté, 2003).

TABELA 2.1. Características e resultados de estudos clínicos relativos à incorporação de avelãs e de nozes na dieta.

| GRUPO DE ESTUDO | DIETA EM ESTUDO | RESULTADO | REFERÊNCIA |
|---|---|--|----------------------------------|
| Dois grupos num total de 18 voluntários, masculinos, saudáveis e sem hábito de consumo de frutos secos. | Estudo controlado, cego, aleatório, cruzado 5 dias: dieta de referência 4 semanas: dieta referência ("Step 1 diet") 4 semanas: dieta idêntica à anterior com adição de nozes. | Melhoria do perfil lipídico: diminuição dos níveis de colesterol total (12,4%), LDL (16,3%) e HDL (4,9%). Manutenção dos valores da pressão sanguínea. | Sabaté <i>et al.</i> , 1993 |
| 16 homens normolipídémicos, 32-50 anos. | 3 dietas sequenciais: 1: dieta base (36% da energia fornecida pela gordura (EFG)) 2: 36% EFG = 18% dieta base + 18% amêndoas 3: 36% EFG = 18% dieta base + 18% nozes | Comparativamente à dieta de referência verificou-se uma redução do colesterol total (5%) e LDL (9%). | Abbey <i>et al.</i> , 1994 |
| 21 indivíduos, sexo masculino, hipercolesterolemicos | Estudo aleatório, cruzado 4 semanas: dieta pobre em gordura (30% calorias totais); 4 semanas: dieta com nozes (78g/dia, fornecendo 38% do total das calorias). | Em ambas as dietas, comparativamente com os níveis iniciais: diminuição dos níveis de colesterol total e LDL e de apolipoproteína B e aumento de HDL. Comparando as duas dietas apenas o decréscimo de apoB foi significativo. | Chisholm <i>et al.</i> , 1998 |
| 18 estudantes do sexo masculino e 12 do sexo feminino (18-19 anos) | Durante 30 dias: dieta habitual + suplemento de 1g avelã/dia/kg peso corporal. | Diminuição significativa dos níveis de malondialdeído, colesterol total e colesterol-LDL; aumento do potencial antioxidante sérico; aumento do colesterol-HDL e triacilgliceróis. | Durak <i>et al.</i> , 1999 |
| 49 indivíduos de ambos os sexos, 56 anos idade média (28-72 anos), com hipercolesterolemia poligénica. | Estudo aleatório, cruzado 6 semanas: dieta mediterrânica 6 semanas: dieta com energia total e teor em gordura similares à anterior, mas em que as nozes substituem cerca de 35% da energia obtida com MUFA. | Comparativamente à dieta de referência: diminuição dos níveis de colesterol total (-4,1%), de LDL (-5,9%) e lipoproteína a (-6,2%); não se verificaram diferenças relativas a triacilgliceróis e HDL. LDL enriquecidas em PUFAs, mas sem alterações de resistência à oxidação. Manutenção do peso ao longo do estudo. | Zambon <i>et al.</i> , 2000 |
| 40 indivíduos saudáveis, 20 do sexo masculino e 20 do sexo feminino. | Estudo controlado, cego, cruzado 5 dias: dieta de referência 4 semanas: dieta de referência ("Dietary Allowance for Japanese, 5 th Ed") 4 semanas: dieta idêntica à anterior, mas em que 12,5% da energia total é fornecida pela ingestão de nozes (43-57 g/dia). | Em comparação com a dieta habitual apenas as mulheres apresentaram reduções significativas de colesterol total (4,9%) e LDL (11%); os homens apresentaram uma redução não significativa do colesterol total (3,8%). Não houve alterações significativas da pressão sistólica e diastólica, nem de triacilgliceróis e HDL. | Iwamoto <i>et al.</i> , 2000 |

continuação da Tabela 2.1.

| GRUPO DE ESTUDO | DIETA EM ESTUDO | RESULTADO | REFERÊNCIA |
|---|--|---|-------------------------------|
| 40 indivíduos saudáveis, 20 do sexo masculino e 4 do sexo feminino. | <p>Estudo aleatório, cruzado 5 dias: dieta de referência 4 semanas: dieta de referência ("Dietary Allowance for Japanese, 5Ed") 4 semanas: dieta idêntica à anterior, mas em que 12,5% da energia total é fornecida por nozes (44-58 g/dia).</p> | <p>Comparativamente à dieta de referência observou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de colesterol total, apolipoproteína C e razão LDL/HDL. Não houve alteração da resistência à oxidação das LDL.</p> | Iwamoto <i>et al.</i> , 2002 |
| 5 homens e 13 mulheres em idade pós-menopausa, diagnosticados com dislipidémia. | <p>4 dietas sequenciais, com registo diário dos alimentos consumidos : 4 semanas: dieta usual 6 semanas: dieta usual + suplemento de nozes (48g/dia) 6 semanas: dieta baixa em gordura (20% energia) 6 semanas: dieta pobre em gordura + suplemento de nozes</p> | <p>Verificou-se uma redução significativa dos níveis de colesterol total e LDL na dieta pobre em gordura adicionada de nozes. Manutenção do peso ao longo do estudo. Não houve variação significativa de HDL e triacilgliceróis.</p> | Almarino <i>et al.</i> , 2001 |
| 10 homens com hipercolesterolemia. | <p>Estudo aleatório, cruzado 6 semanas: dieta mediterrânica 6 semanas: dieta com energia total e teor em gordura similares à anterior, mas em que as nozes substituem cerca de 35% da energia obtida com MUFA.</p> | <p>Comparativamente à dieta controlo houve uma redução do colesterol-LDL e total; não houve alterações das proporções relativas de proteínas, triacilgliceróis e ésteres de colesterol nas partículas de LDL, mas houve um enriquecimento em PUFA. Verificou-se um aumento da captação de LDL por parte dos receptores em células Hep G2.</p> | Muñoz <i>et al.</i> , 2001 |
| 25 homens e 17 mulheres com colesterol elevado, mas sem evidência de doença cardiovascular. | <p>3 períodos sequenciais: 6 semanas: dieta baixa em gordura (step 1 cholesterol diet) 6 semanas: dieta baixa em gordura (step 1 cholesterol diet) 6 semanas: dieta baixa em gordura e rica em nozes (64g/dia)</p> | <p>Não se verificou aumento de peso com a dieta rica em nozes, apesar do aumento calórico desta dieta. Após a dieta rica em nozes verificou-se uma diminuição significativa dos níveis de triacilgliceróis, colesterol total e LDL e um aumento dos níveis de colesterol-HDL.</p> | Morgan <i>et al.</i> , 2002 |
| 55 homens e mulheres com diabetes tipo 2. | <p>Experiência controlada; desenho paralelo. Os indivíduos foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos; a escolha dos alimentos era feita pelos indivíduos; 1: dieta pobre em gordura 2: dieta pobre em gordura com consumo preferencial de PUFA 3: dieta pobre em gordura modificada (com inclusão de 30g nozes/dia) Monitorização no início, após 3 e 6 meses. Objectivos: energia proveniente de < 10% de SFA, 7-10% PUFA; ingestão mínima de 2,22g de α-linolénico e 0,65g de EPA+DHA; razão n-6/n-3 < 10.</p> | <p>Apesar de a energia total e a ingestão de macronutrientes ser idêntica nos 3 grupos, o grupo que incluiu nozes na dieta (grupo 3) foi o único a conseguir alcançar os objectivos definidos.</p> | Gillen <i>et al.</i> , 2005 |

2. AVELEIRA

2.1. Conceitos gerais

A aveleira (*Corylus avellana* L.), membro da família das Betuláceas, género *Corylus*, é uma das espécies mais antigas do reino vegetal. No período compreendido entre 8000 e 5500 anos a.C., a vegetação nativa de grande parte do nordeste Europeu era dominada pelo género *Corylus*. Actualmente, este género compreende cerca de 10 espécies, todas elas originárias do Hemisfério Norte, sendo *Corylus avellana*, igualmente conhecida como avelã europeia, ou somente como avelã, a espécie com maior interesse comercial. Esta espécie é originária da Europa e Ásia Menor, encontrando-se distribuída por toda a Europa até à zona sul dos Montes Urais. Outras espécies de interesse pertencentes ao mesmo género são *C. maxima* L., existente principalmente nos Estados Unidos da América, e *C. colurna* L., existente maioritariamente na Turquia (Lagerstedt, 1975).

A aveleira é essencialmente cultivada para obtenção da sua semente edível (vulgarmente referida como fruto, ou fruto seco), embora outras partes da árvore sejam utilizadas com diversas finalidades.

É uma árvore ou arbusto de folhagem caduca, geralmente com 4 a 5 m, podendo mesmo atingir os 10 m de altura (Figura 2.1). É uma planta monóica, apresentando na mesma planta flores unissexuais, masculinas e femininas, típicas e independentes. Encontra-se bem adaptada à polinização anemófila, se bem que em algumas cultivares, como Segorbe, Negreta, Fertille de Coutard e Ronde du Piemont, uma elevada percentagem dos grão de pólen formados não sejam viáveis. Apesar de ser uma planta monóica, os casos de auto-fecundação são raros (ex: Santa Maria de Jesus) devido a auto-incompatibilidades, sendo necessária a existência de polinização cruzada. Vários estudos confirmaram, igualmente, a existência de inter-incompatibilidades polínicas nesta espécie. Desta forma, as cultivares, produtoras e polinizadoras, devem ser escolhidas de forma criteriosa de modo a serem compatíveis. Também se deve atender aos períodos de floração das diferentes cultivares, de forma a que haja coincidência entre os períodos viáveis das as flores masculinas e femininas (Projecto AGRO 162, *in press*).

A propagação da aveleira pode ser feita por meio da semente, ou por multiplicação vegetativa. A primeira é utilizada sobretudo para a obtenção de novas variedades, pois permite obter grande variabilidade genética. A segunda ocorre por reprodução assexuada, possuindo a aveleira boa capacidade para a produção de novas plantas a partir das plantas-mãe. Podem ser utilizados vários métodos de propagação vegetativa, como a

micropropagação que, embora mais onerosa, pode ser utilizada para a propagação de novas cultivares (Projecto AGRO 162, *in press*).



FIGURA 2.1. Campo de aveleiras cultivadas em Portugal.

O fruto da aveleira é uma glande com pericarpo duro e coriáceo que protege a semente. A semente é a parte comestível do fruto, sendo recoberta por uma película acastanhada, o perisperma, de aspecto mais ou menos rugoso. Em Portugal, entre meados de Agosto e inícios de Outubro, as avelãs começam a cair e estão prontas a ser colhidas; este período dura 2-3 semanas e é dependente das condições climáticas do ano e, fundamentalmente, da cultivar.

De acordo com as características do fruto (tamanho, aspecto do miolo e da casca, forma e rendimento em miolo) e, conseqüentemente, com o fim a que se destina a produção, podem considerar-se três grandes grupos: cultivares de mesa, cultivares de indústria e cultivares de dupla aptidão. As características importantes na avelã de mesa são o seu tamanho elevado e aspecto atraente. A avelã utilizada na indústria deverá, preferencialmente, ter um miolo de diâmetro pequeno, de forma esférica e uniforme e ter uma película fina e fácil de remover.

A equipa do projecto AGRO 162 ("O incremento da produtividade da aveleira em Portugal"), sugere nas conclusões do seu trabalho (actualmente a serem editadas como livro), que em Portugal, deveriam ser sobretudo produzidas variedades de mesa, dado que a produção de avelã para a indústria se encontra monopolizada pelos grandes produtores mundiais deste fruto seco, nomeadamente a Turquia, não somente pelas quantidades produzidas e comercializadas, como também pelos preços praticados.

2.2. Importância económica da aveleira

O impacto económico que advém da produção da avelã diz respeito não somente aos países que a produzem e exportam, como também às indústrias que a utilizam como

matéria-prima na manufactura de outros produtos de valor acrescentado. Para além das indústrias de processamento (de torrefacção e de produção de pasta de avelã) existe um vasto leque de indústrias alimentares que utilizam a avelã como ingrediente na confecção de variados produtos. Este fruto seco é utilizado, conferindo sabor e textura, em produtos tão diversos como bolos, cereais, barras energéticas, gelados e outras sobremesas, cremes para barrar pão e sobretudo em chocolates.

De acordo com os dados fornecidos pela FAO, em 2004 foram mundialmente produzidas cerca de 8,5 milhões de toneladas de frutos secos, das quais cerca de 700 mil toneladas corresponderam a avelãs. A Turquia lidera a produção mundial com cerca de 70%, seguida pela Itália (12%), USA (6%) e Espanha (2%) (FAO, 2005). À excepção do ano de 2004, tem-se assistido na última década a um aumento progressivo da área de produção de avelã, com obtenção de produtividades algo variáveis entre 635 e 835 mil toneladas (Figura 2.2).

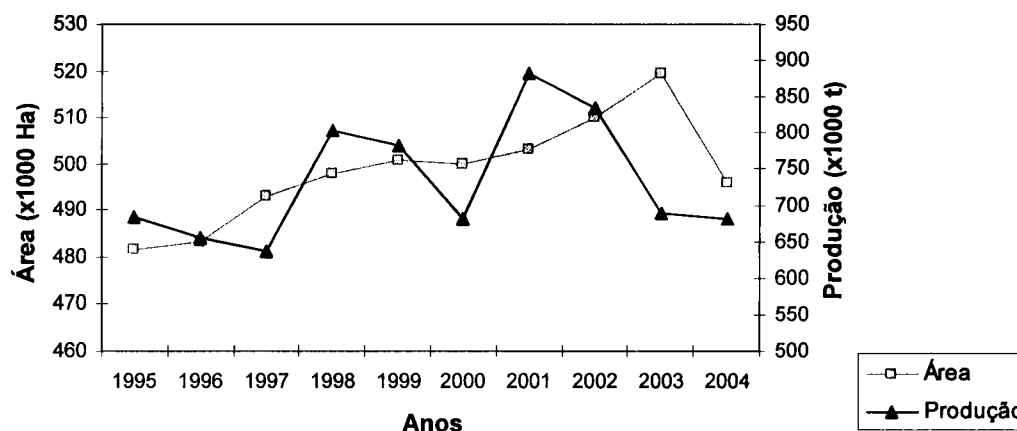


FIGURA 2.2. Evolução da área de cultivo e produção mundial de avelã (FAO, 2005).

Analisando a evolução nacional da produtividade de avelã, constata-se a existência de duas fases diferentes; a primeira no final da década de 80 e início da década de 90, em que houve um aumento quer da área de cultivo quer da produção de avelã, à qual se seguiu uma fase de progressivo decréscimo, não só de produção mas posteriormente também da área de cultivo de avelã (Figura 2.3). A ocorrência da primeira fase, relaciona-se com o aumento do investimento na produção de avelã, resultante de vários campos estabelecidos com apoio económico proveniente de fundos comunitários; a segunda justifica-se por um progressivo abandono desta cultura devido a um conjunto de factores, entre os quais a crescente competitividade do mercado internacional, os baixos preços pagos aos produtores e os elevados custos de produção e em alguns casos as baixas produções devidas a erros técnicos e práticas inapropriadas. Actualmente, a área e a produção encontra-se relativamente estabilizadas, com valores de 600 ha e 600 t, respectivamente. Trás -os-

Montes, Beira Litoral e Beira Interior são as regiões com maior produção de avelã em Portugal (INE, 2003).

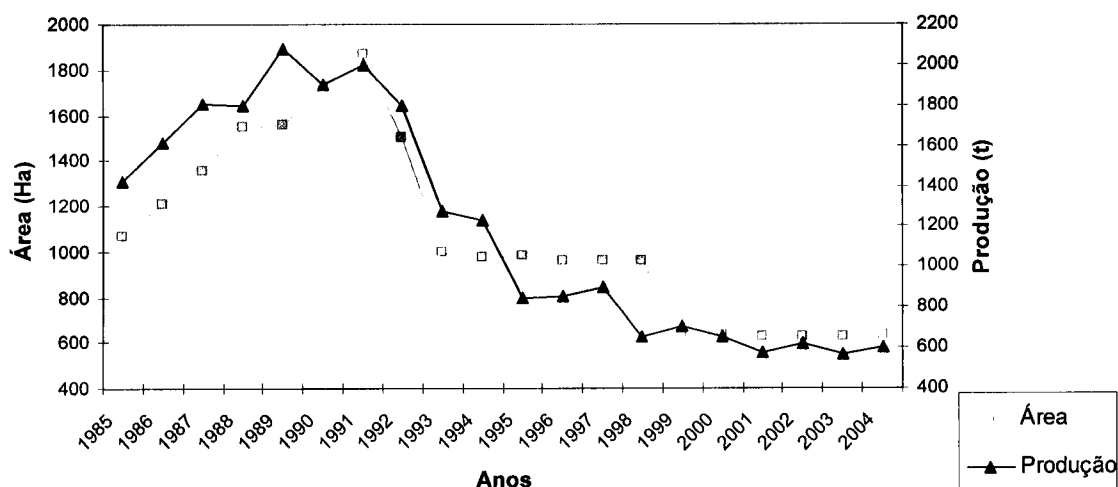


FIGURA 2.3. Evolução da área de cultivo e produção nacional de avelã (FAO, 2005).

A análise dos dados referentes à importação e exportação de avelã, permite inferir que Portugal é deficitário na produção de avelã, uma vez que é ainda necessário recorrer à importação deste produto. Maioritariamente, é importada avelã sem casca, provavelmente com destino à indústria de processamento e indústrias alimentares (Tabela 2.2).

TABELA 2.2. Dados referentes à importação e exportação de avelã em Portugal (INE, 2003).

| ANO | PRODUTO | IMPORTAÇÃO | | EXPORTAÇÃO | |
|------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | | Quantidade (t) | Valor (1 000 €) | Quantidade (t) | Valor (1 000 €) |
| 2002 | Avelã sem casca | 127 | 365 | 4 | 20 |
| 2003 | Avelã com casca | 14 | 33 | 2 | 11 |
| 2003 | Avelã sem casca | 151 | 502 | 8 | 54 |

3. NOGUEIRA

3.1 Conceitos gerais

A noqueira (*Juglans regia* L.) pertence à família das Juglandáceas, que abrange cerca de 60 espécies das quais 21 pertencem ao género *Juglans*. A espécie *J. regia* é uma espécie originária de uma vasta região, desde o leste Europeu até à Ásia Menor. Apesar de ser nativa em grande parte da Europa, pensa-se ter sido pouco utilizada até à data em que os

Gregos começaram a cultivar plantas vindas da Pérsia e, mais tarde, o seu uso foi divulgado no sul da Europa pelos Romanos. Outra espécie com interesse do género *Juglans*, é a espécie *J. nigra* L., conhecida como "black walnut", nativa da zona leste da América (Forde, 1975).

A noqueira é fundamentalmente cultivada nas zonas temperadas para obtenção da sua semente edível, a noz, embora se encontrem descritas variadas utilizações de outras partes da árvore. Entre estas utilizações citam-se a aromatização de licores (Alamprese e Pompei, 2005), a utilização em cosméticos (Tsamouris *et al.*, 2002), tintas (Cardon e Chatenet, 1990), mobiliário, e em medicina tradicional (Bruneton, 1993). A noqueira destaca-se ainda pela sua muito apreciada madeira, simultaneamente dura, homogénea e fácil de trabalhar. A espécie *J. nigra* é geralmente aproveitada para a produção de madeira, pois as árvores são maiores e também porque, regra geral, originam sementes difíceis de partir devido à dureza da sua casca e de qualidade inferior às obtidas pela espécie *J. regia* L..

A noqueira é uma árvore com tronco grosso e de copa ampla e arredondada, atingindo cerca de 20 a 30 m de altura quando cultivada, podendo atingir alturas superiores no estado selvagem (Figura 2.4). É uma árvore caducifólia, com folhas alternadas, compostas, com 5 a 9 folíolos ovalados ou lanceolados. É uma planta monóica, heterogâmica e, regra geral, auto-fecundável. Floresce em Maio/Junho e as sementes edíveis amadurecem no final do Verão. São árvores bem adaptadas ao clima Mediterrânico, com Verões quentes e secos, necessitando de irrigação em climas demasiado áridos. São intolerantes à salinidade e à inundação dos solos, preferindo terrenos profundos e de boa drenagem. A propagação da noqueira é habitualmente feita por meio da semente, sendo também comum fazer o enxerto das diferentes variedades (Forde, 1975).



FIGURA 2.4. Campo de noqueiras cultivadas em Portugal.

3.2 Importância económica da noqueira

De acordo com os dados fornecidos pela FAO, em 2004 a China foi o país com maior produção de nozes (28%), seguindo-se os USA (20%), Irão, Turquia e Estados membros da antiga URSS (aproximadamente 10% cada) (FAO, 2005). A produção foi inferior a 2,5% em cada um dos restantes 32 países produtores de nozes, correspondendo no seu conjunto aos restantes 22,6% da produção mundial de noz. Como se constata na Figura 2.5, nos últimos 10 anos a produção mundial de noz tem vindo a crescer substancialmente.

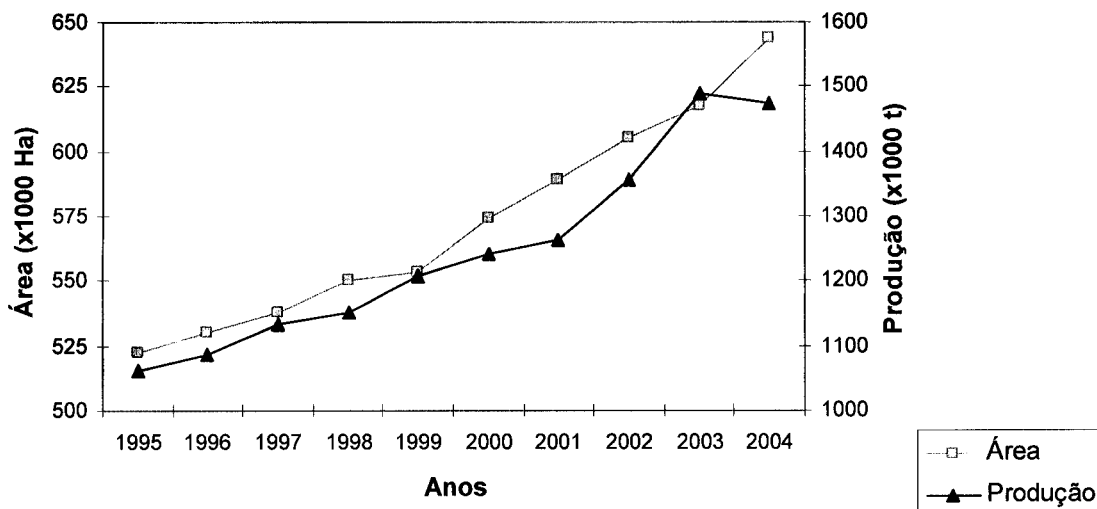


FIGURA 2.5 . Evolução da área e produção mundial de noz (FAO, 2005).

Em 2004, a contribuição de Portugal para a produção mundial de noz foi de 0,3% (FAO, 2005), sendo a noz cultivada principalmente em Trás-os-Montes, Beira-Litoral, Alentejo e Ribatejo (INE, 2003). Considerando os últimos 10 anos, a produção de noz em Portugal tem acompanhado a tendência mundial de aumento de área de cultivo e da produção de noz (Figura 2.6).

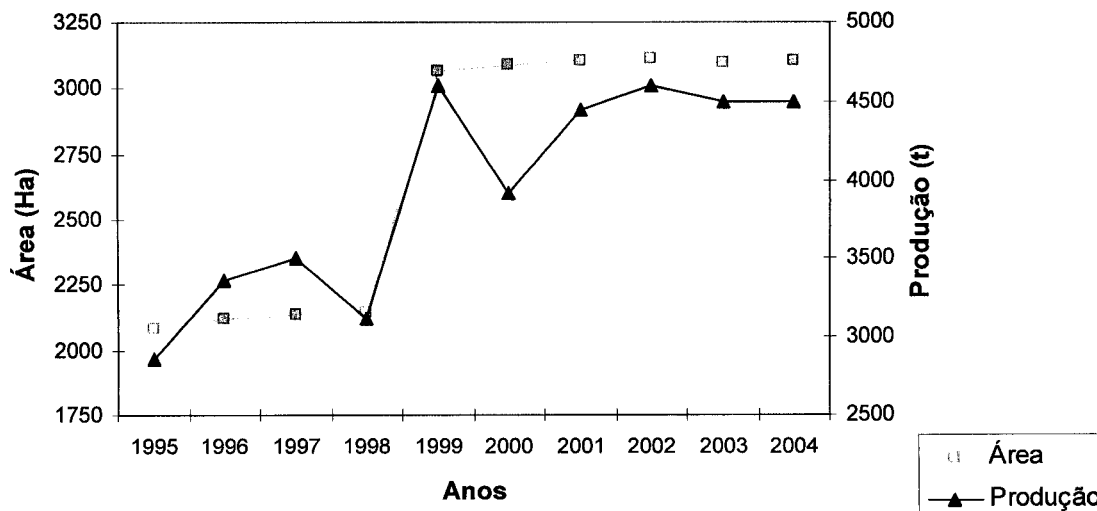


FIGURA 2.6. Evolução da área e produção nacional de noz (FAO, 2005).

Relativamente ao mercado de importações, considerando os dados relativos a 2002 e 2003, parece existir uma tendência para o aumento da quantidade de noz importada, principalmente no que se refere a noz com casca (Tabela 2.3).

TABELA 2.3. Dados referentes à importação e exportação de noz em Portugal (INE, 2003).

| ANO | PRODUTO | IMPORTAÇÃO | | EXPORTAÇÃO | |
|------|---------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| | | Quantidade (t) | Valor (1 000 €) | Quantidade (t) | Valor (1 000 €) |
| 2002 | Noz com casca | 764 | 1845 | 26 | 110 |
| 2002 | Noz sem casca | 583 | 2752 | 10 | 99 |
| 2003 | Noz com casca | 1214 | 2175 | 21 | 62 |
| 2003 | Noz sem casca | 689 | 2864 | 158 | 134 |

II - ESTUDO DA FRACÇÃO LIPÍDICA

Apesar de ser um termo referido frequentemente, é difícil encontrar uma definição abrangente que traduza com exactidão o significado de "lípidos". Na literatura pode-se encontrar essa definição como sendo um grupo de compostos naturais que apresentam, em comum, uma elevada solubilidade em solventes orgânicos (Gordon, 2003; Christie, 2005). Esta definição inclui um leque diversificado de compostos que nada têm de comum relativamente à sua estrutura química ou função, com o revés de que existem substâncias com elevadas solubilidades em solventes aquosos que são actualmente consideradas como lípidos. Por este motivo, Christie (2005) propõe que neste grupo de compostos apenas se considere os ácidos gordos e seus derivados e as substâncias com eles relacionadas, quer biossinteticamente, quer funcionalmente. Este autor refere ainda uma possível subdivisão deste amplo grupo de compostos, em lípidos simples e complexos. O primeiro grupo inclui aqueles que, por hidrólise, geram apenas um máximo de dois tipos de compostos diferentes, e o segundo grupo inclui os lípidos que geram três ou mais produtos primários, por hidrólise. A título de exemplo, são considerados lípidos simples os ácidos gordos, os mono, di e triacilgliceróis, os esteróis, as ceras, os tocoferóis e os tocotrienóis, e lípidos complexos os fosfolípidos, os glicoglicerolípidos e os glicoesfingolípidos.

Os lípidos apresentam quatro funções fisiológicas principais:

- Componentes estruturais das membranas;
- Fornecedores de energia e reservas energéticas (sendo acumulados na forma de triacilgliceróis);

- Funções vitamínicas ou hormonais, desempenhadas por alguns lípidos;
- Intervenção na solubilização e absorção de diversos compostos lipossolúveis.

Para além destas funções, os lípidos presentes na dieta influenciam a textura e palatabilidade dos alimentos.

Nas últimas décadas tem-se assistido a um interesse crescente no estudo da composição lipídica dos alimentos, sobretudo no que respeita aos óleos vegetais. Além disso, são cada vez mais considerados como possíveis fontes de composto nutracêuticos. Tendo em conta o elevado teor em lípidos das matrizes em estudo (avelãs e nozes) procedeu-se ao estudo da composição dos seguintes grupos de compostos:

- Ácidos gordos
- Triacilgliceróis
- Fitosteróis
- Tocoferóis e tocotrienóis

Os resultados obtidos para cada grupo de compostos referido são apresentados nos capítulos que se seguem.

CAPÍTULO 3

PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS

I – ÁCIDOS GORDOS. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

1. INTRODUÇÃO

Os ácidos gordos (AG) são compostos sintetizados na natureza pela condensação de unidades de malonilcoenzima A por um complexo de várias enzimas (Christie, 2005). Estes compostos desempenham importantes papéis nos seres vivos, tendo duas funções principais no organismo: fornecerem energia, funcionando também como reserva energética por acumulação na forma de triacilgliceróis, e serem componentes estruturais das membranas. Exceptuando os casos do cérebro, sangue e pele, cujas células não estão capacitadas a utilizar estes compostos como fonte energética, a oxidação dos AG livres é de extrema importância para a maioria dos tecidos, permitindo a obtenção de quantidades apreciáveis de ATP.

Para além de serem uma fonte energética e de estarem envolvidos no isolamento e protecção mecânica das células, os AG desempenham ainda outros papéis fisiológicos de vital importância, de entre os quais se destaca a sua função como precursores biossintéticos de outros compostos mais complexos e as suas relevantes funções a nível do sistema imunitário. Actualmente pensa-se ainda que estes compostos poderão estar envolvidos na regulação da expressão de genes e na mediação de respostas celulares ao meio externo, funcionando como mensageiros secundários (Wolfrum *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2004).

Apesar de poderem existir na forma livre, na sua maioria encontram-se ligados a outros compostos, tais como álcoois, proteínas, aminossacarídeos ou outras moléculas, existindo no nosso organismo predominantemente na forma de triacilgliceróis e de fosfolípidos (Brondz, 2002).

2. ESTRUTURA QUÍMICA

As moléculas de AG são constituídas por uma cadeia hidrocarbonada com um grupo ácido carboxílico numa das extremidades. Os AG podem ser saturados (SFA, quando a cadeia hidrocarbonada não tem ligações duplas), monoinsaturados (MUFA, com uma ligação dupla) ou polinsaturados (PUFA, com duas ou mais ligações duplas). Devido ao elevado número de possibilidades no que respeita ao número total de átomos de carbono, grau de insaturação, geometria e posição das ligações duplas, ocorrência de substituintes e respectivas posições na cadeia carbonada, existe uma grande diversidade de AG na natureza. No entanto, os mais frequentes são os de cadeia linear e com número par de carbonos totais. Quando os AG apresentam ligações duplas, estas apresentam usualmente a configuração *cis* (também designada por *Z*) e quando existe mais do que uma insaturação, regra geral encontram-se separadas por um grupo metileno (isto é, não conjugadas). Os AG com ligações duplas com configuração *trans* (ou *E*) podem ser ocasionalmente encontrados

na natureza, mas surgem, sobretudo, em resultado do processamento dos alimentos.

Dependendo do tamanho da cadeia carbonada, os AG podem ser considerados como de cadeia média (C12 e C14), longa (C16 a C22) ou muito longa (> C22) (Dobson, 2002). Quer nas plantas quer nos animais, os SFA mais frequentes contêm 14, 16 ou 18 átomos de carbono, embora vários outros com cadeias de dimensões muito variadas (2 a 36 átomos de carbono) possam ser encontrados na natureza (Christie, 2005). Os SFA de cadeia média, longa e muito longa apresentam pontos de fusão relativamente altos e, por esta razão, os lípidos que apresentam elevados teores destes compostos, regra geral, apresentam-se no estado sólido à temperatura ambiente. Também por este motivo estes AG estão associados a uma maior rigidez das membranas.

Os MUFA mais abundantes na natureza, quer nas plantas quer nos animais, contêm 16 ou 18 átomos de carbono e uma ligação dupla com a configuração *cis*. A presença da insaturação impõe uma ligeira curvatura na cadeia carbonada, dificultando o empacotamento entre cadeias de vários AG. Desta forma, os MUFA de cadeia média apresentam-se tendencialmente no estado líquido à temperatura ambiente. Este efeito acentua-se nos PUFA, devido às várias ligações duplas com configuração *cis*, de forma que estes compostos apresentam pontos de fusão tendencialmente mais baixos. Por este motivo se explica a sua elevada predominância a nível das membranas celulares. Pelo contrário, os AG que contêm ligações duplas com a configuração *trans* apresentam pontos de fusão mais elevados.

Os AG podem ser designados de acordo com as recomendações da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). No caso dos SFA utiliza-se a nomenclatura do hidrocarboneto saturado com o mesmo número de carbonos aplicando-se a terminação “óico”. A nomenclatura sistemática dos AG mono e polinsaturados deriva da dos SFA com igual número de carbonos, aplicando-se a terminação “enóico”. No caso dos PUFA, a indicação do número total de duplas ligações é feita através da utilização de prefixos gregos (di, tri, etc). Para além deste tipo de nomenclatura é muito frequente a utilização de nomes triviais, bem como de designações abreviadas. Esta última consiste numa abreviatura numérica, a qual designa o número total de carbonos na cadeia alifática, seguido do número de ligações duplas e a indicação da sua posição. A posição das insaturações pode ser indicada de duas formas: através do símbolo delta (Δ) e o número do carbono onde ocorre a primeira dupla ligação, ou por “n-” (ou “ ω ” nas denominações mais antigas) e a distância entre a última dupla e o último carbono da cadeia carbonada; em ambos os casos, assume-se que as restantes ligações duplas se encontram separadas por um grupo metileno, caso contrário deverá ser explicitado. Das duas formas possíveis de indicar a posição das ligações duplas, a segunda é a mais utilizada, principalmente em estudos nutricionais e bioquímicos. A título de exemplo, o ácido linoleico pode ser designado por $C_{18:2}\Delta^9$ ou $C_{18:2n6}$, o que corresponde a um AG cuja cadeia carbonada tem um total de 18 átomos de carbono, com duas insaturações as quais se situam uma no carbono 9 e outra no carbono 12.

A designação segundo as normas da IUPAC, os nomes triviais e abreviaturas dos AG de origem vegetal e animal mais frequentes na natureza, bem como de outros menos comuns, podem ser consultada na Tabela 3.1.

TABELA 3.1. Nomes sistemáticos, triviais e abreviaturas de diversos AG existentes na natureza.

| AG DE ORIGEM ANIMAL E VEGETAL MAIS COMUNS NA NATUREZA | | | |
|---|--|-------------------------------|----------------------|
| SÉRIE | IUPAC | NOME COMUM | ABREVIATURA |
| SFA | ác. butanóico | ác. butírico | C _{4:0} |
| | ác. hexanóico | ác. caprónico | C _{6:0} |
| | ác. octanóico | ác. caprílico | C _{8:0} |
| | ác. decanóico | ác. cáprico | C _{10:0} |
| | ác. dodecanóico | ác. láurico | C _{12:0} |
| | ác. tetradecanóico | ác. mirístico | C _{14:0} |
| | ác. hexadecanóico | ác. palmítico | C _{16:0} |
| | ác. octadecanóico | ác. esteárico | C _{18:0} |
| | ác. eicosanóico | ác. araquídico | C _{20:0} |
| | ác. docosanóico | ác. behénico | C _{22:0} |
| ác. tetracosanóico | ác. lignocérico | C _{24:0} | |
| MUFA | ác. <i>cis</i> -9-hexadecenóico | ác. palmitoleico | C _{16:1n7} |
| | ác. <i>cis</i> -9-octadecenóico | ác. oleico | C _{18:1n9} |
| | ác. <i>cis</i> -11-octadecenóico | ác. <i>cis</i> -vacénico | C _{18:1n7} |
| | ác. <i>cis</i> -13-docosenóico | ác. erúcico | C _{22:1n9} |
| | ác. <i>cis</i> -15-tetracosenóico | ác. nervónico | C _{24:1n9} |
| PUFA | ác. <i>cis</i> -9,12-octadecadienóico | ác. linoleico | C _{18:2n6} |
| | ác. <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienóico | ác. α -linolénico | C _{18:3n3} |
| | ác. <i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenóico | ác. araquidónico | C _{20:4n6} |
| | ác. <i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenóico | EPA | C _{20:5n3} |
| | ác. <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico | DHA | C _{22:6n3} |
| AG MENOS FREQUENTES NA NATUREZA | | | |
| SFA | ác. pentadecanóico | - | C _{15:0} |
| | ác. heptadecanóico | ác. margárico | C _{17:0} |
| | ác. heneicosanóico | - | C _{21:0} |
| | ác. tricosanóico | - | C _{23:0} |
| MUFA | ác. <i>cis</i> -10-heptadecenóico | ác. margaroleico | C _{17:1n7} |
| | ác. <i>cis</i> -6-octadecenóico | ác. petroselinico | C _{18:1n12} |
| | ác. <i>trans</i> -9-octadecenóico | ác. elaidico | C _{18:1n9t} |
| | ác. <i>cis</i> -11-eicosanóico | ác. gadoleico | C _{20:1n9} |
| PUFA | ác. <i>cis</i> -6,9,12-octadecatrienóico | ác. γ -linolénico | C _{18:3n6} |
| | ác. <i>cis</i> -11,14-eicosadienóico | - | C _{20:2n6} |
| | ác. <i>cis</i> -8,11,14-eicosatrienóico | ác. homo γ -linolénico | C _{20:3n3} |
| | ác. <i>cis</i> -11,14,17-eicosatrienóico | - | C _{20:3n6} |
| | ác. <i>cis</i> -13,16-docosadienóico | - | C _{22:2n6} |

3. ACTIVIDADE BIOLÓGICA

Regra geral os SFA estão associados a efeitos nocivos para a saúde, nomeadamente a aumentos do colesterol-LDL e, conseqüentemente, a maior probabilidade de desenvolver DCV (Dobson, 2002; Pérez-Jiménez *et al.*, 2002). No entanto, considera-se actualmente que

nem todos os SFA são igualmente perniciosos, sendo mínimos os efeitos provocados pelo ácido esteárico relativamente ao colesterol-LDL, contrariamente ao que acontece com os ácidos láurico, mirístico e palmítico (Dobson, 2002).

Já no que diz respeito aos MUFA, a maioria dos estudos realizados associa o seu consumo com a prevenção da ocorrência de arteriosclerose e uma diminuição do risco de DCV (Kris-Etherton *et al.*, 1999; Pérez-Jiménez *et al.*, 1999; López-Miranda *et al.*, 2000; Pérez-Jiménez *et al.*, 2002; Strychar *et al.*, 2003; Fuentes *et al.*, 2004). Apesar destes efeitos se relacionarem sobretudo com alterações do perfil lipídico do sangue, outras alterações igualmente benéficas parecem existir, tais como propriedades antitrombóticas (através da melhoria da função endotelial) e alterações na concentração plasmática de glucose e de insulina (Strychar *et al.*, 2003).

Apesar da maioria dos AG necessários ao organismo ser adquirida através da dieta alimentar, o organismo tem sistemas enzimáticos que lhe permitem biossintetizar vários dos AG necessários ao funcionamento regular do corpo humano. No entanto, os ácidos linoleico e α -linolénico são duas excepções, sendo por isso referidos como AG essenciais, uma vez que têm obrigatoriamente que ser adquiridos através da alimentação. O consumo insuficiente de AG essenciais pode originar um síndrome de deficiência caracterizado por disfunção imunológica, maior susceptibilidade a infecções, dermatite, atraso de crescimento, perda de cabelo, trombocitopenia, diarreia e dificuldade de cicatrização de feridas.

O interesse nos AG da série $n-3$, também conhecidos como omega-3 ($\omega-3$), surgiu durante as décadas de 70 e 80, despoletado por resultados obtidos num estudo conduzido em esquimós, população caracterizada pelo elevado consumo de peixe, e para a qual se observou uma baixa taxa de mortalidade devida a doenças cardiovasculares (DCV) (Seppänen-Laakso *et al.*, 2002). Em diversos estudos realizados posteriormente, verificaram-se níveis mais baixos de mortalidade relacionada com DCV em pessoas que comiam peixe pelo menos duas vezes por semana comparativamente a pessoas que não incluíam peixe na dieta (Seppänen-Laakso *et al.*, 2002). Para além de estarem implicados na redução de DCV, várias propriedades benéficas foram já referidas para os AG $n-3$, tais como propriedades hipolipidémicas, anti-hipertensivas, anti-inflamatórias, antitrombóticas e antiarrítmicas (Dobson, 2002; Seppänen-Laakso *et al.*, 2002). Desta forma, estes AG poderão ser potencialmente benéficos em diversas patologias, tais como artrite, doenças auto-imunes, diabetes tipo II, hipertensão e cancro (Dobson, 2002; Seppänen-Laakso *et al.*, 2002). Os AG $n-3$ são ainda considerados essenciais no desempenho das funções visual e cerebral (Lauritzen *et al.*, 2001; Dobson, 2002). O organismo humano, contrariamente ao que acontece nas plantas, não dispõe nem da capacidade de introduzir duplas ligações nas posições $n-3$ e $n-6$, nem de interconverter estes dois tipos de AG. Desta forma, os ácidos linoleico e α -linolénico, AG essenciais mais abundantes nas plantas, são considerados,

respectivamente, como os “compostos pai” das séries $n-3$ e $n-6$ nos seres vertebrados (Lauritzen *et al.*, 2001). No organismo humano, estes AG sofrem uma série de alongamentos e dessaturações servindo de precursores para a obtenção de AG mais longos e mais insaturados, como por exemplo os ácidos araquidónico (AA, $C_{20:4n6}$), eicosapentaenóico (EPA, $C_{20:5n3}$) e docosahexaenóico (DHA, $C_{22:6n3}$) (Figura 3.1). Actualmente sabe-se que os ácidos α -linolénico e linoleico competem entre si relativamente a uma das enzimas intervenientes no processo (Δ^6 -dessaturase), considerando-se este passo como uma etapa limitante no processo metabólico destes AG (Lauritzen *et al.*, 2001). Estudos em diversos animais mostraram que o primeiro é um forte supressor do metabolismo do segundo, sendo necessárias quantidades dez vezes superiores de ácido linoleico para obter uma supressão de idêntica magnitude no metabolismo dos AG da série $n-3$ (Lauritzen *et al.*, 2001).

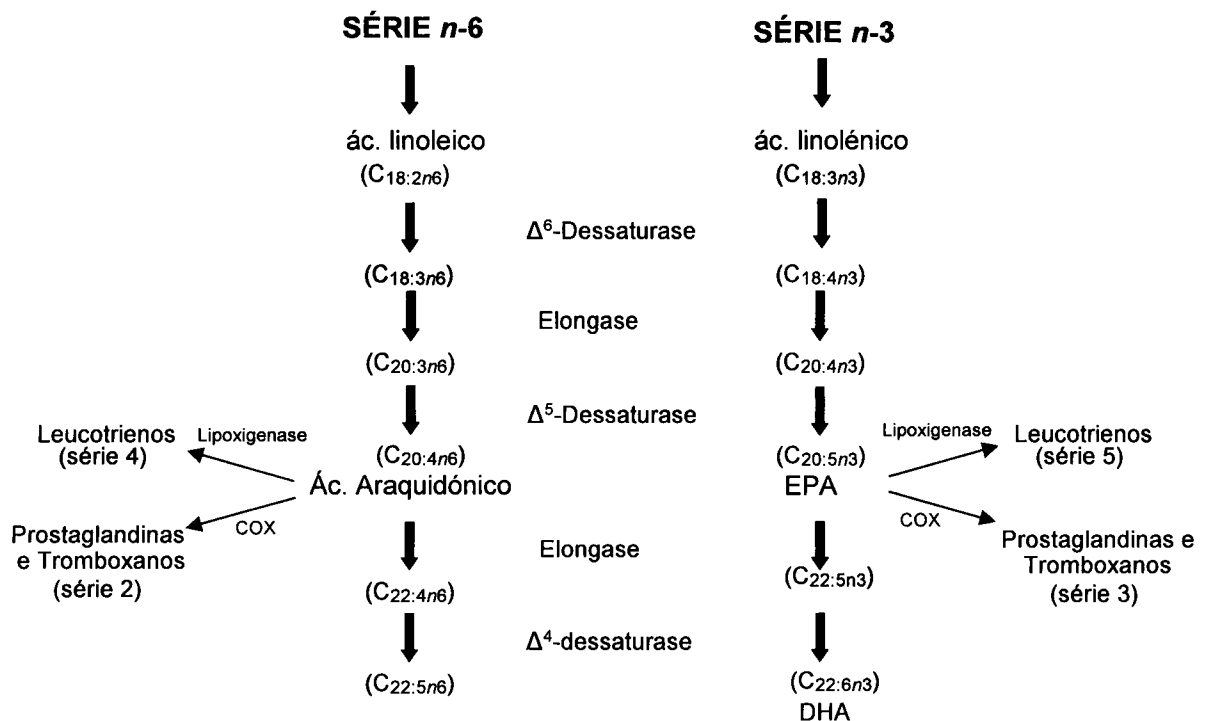


FIGURA 3.1. Vias metabólicas dos ácidos linoleico (série $n-6$) e linolénico (série $n-3$) (adaptado de Volker e Garg, 2000 e de Lauritzen *et al.*, 2001).

Os PUFA de cadeia longa, especialmente o AA, EPA e o DHA, encontram-se frequentemente nos fosfolípidos constituintes das membranas celulares. No entanto, enquanto os dois primeiros se encontram distribuídos em quantidades consideráveis pela grande maioria dos tecidos, o último é mais específico na sua distribuição corporal, encontrando-se em elevadas concentrações especialmente no cérebro, retina e testículos (Lauritzen *et al.*, 2001). Para além de obter os seus PUFA da corrente sanguínea, o cérebro tem ainda a capacidade de converter, metabolicamente, o ácido α -linolénico em DHA (Lauritzen *et al.*, 2001). O EPA e o AA presentes nos fosfolípidos membranares são ambos

precursores de eicosanóides (prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienos e tromboxanos), os quais exibem uma grande variedade de funções fisiológicas, intervindo por exemplo a nível da regulação da coagulação e pressão sanguínea, função imunitária, inflamação, dor e febre (Volker e Garg, 2000; Dobson, 2002). No entanto, os eicosanóides provenientes de cada um dos referidos AG, isto é, provenientes da série $n-3$ ou $n-6$, são diferentes, possuindo igualmente diferentes funções (Figura 3.1). Contrariamente aos eicosanóides obtidos a partir do EPA, os obtidos a partir do AA são tendencialmente pró-trombóticos, pró-inflamatórios e vasoconstritores (Dobson, 2002). Desta forma, a libertação de AA ou EPA das membranas celulares, pela acção de enzimas específicas, permite a formação de substâncias biologicamente activas através da acção enzimática da ciclo-oxigenase e lipoxigenase, substâncias estas que funcionam quase como hormonas, sendo no entanto destruídas num curto espaço de tempo por enzimas locais e, conseqüentemente, actuando apenas a nível local. Este processo permite que o organismo seja capaz de gerar respostas rápidas e localizadas.

Segundo alguns autores, o excesso de AG $n-6$ na dieta poderá conduzir à predominância de AA nas membranas celulares, originando uma maior produção de eicosanóides provenientes do AA comparativamente àqueles sintetizados a partir do EPA, o que poderá estar relacionado com algumas doenças imunitárias, cardiovasculares e até mesmo cancro, devido à sobreprodução crónica de substâncias pró-inflamatórias (Okuyama, *et al.*, 1997, Volker e Garg, 2000).

Para além dos AG referidos, existem outros que se pensa igualmente apresentarem benefícios para a saúde, tais como o ácido γ -linolénico ($C_{18:3n6}$), vacénico ($C_{18:1n7}$) e linoleico conjugado (CLA, designação colectiva para vários isómeros do ácido octadecadienóico conjugado) (Awad *et al.*, 1995; Dobson, 2002).

Por último, refira-se que o papel desempenhado pelos AG *trans*, é ainda controverso. Apesar de existirem evidências de que o seu consumo poderá propiciar o desenvolvimento de DCV pelo aumento dos triacilgliceróis sanguíneos e do colesterol-LDL, e diminuição do colesterol-HDL (Dashti *et al.*, 2002; Dobson, 2002; Clifton *et al.*, 2004), outros autores defendem que para níveis reduzidos de ingestão, estes compostos não causam qualquer ameaça imediata para a saúde, sendo necessários mais estudos para que definitivamente se possa associar os AG *trans* a efeitos prejudiciais para a saúde humana (Kritchevsky, 1997).

4. FONTES E CONSUMO

Para o organismo humano, a principal fonte de ácido linoleico é o consumo de óleos vegetais tais como o óleo de girassol, de soja e de milho. Outros óleos, como por exemplo o óleo de linhaça (“flaxseed oil” ou “linseed oil”), se bem que tradicionalmente pouco utilizados

no nosso país, são ricos em ácido α -linolénico. Alguns peixes, devido ao facto de se encontrarem no topo de cadeias alimentares baseadas em fitoplâncton, apresentam elevadas quantidades de EPA e DHA. Uma forma de aumentar o consumo de AG *n*-3 seria comer peixe mais frequentemente. No entanto, ou porque muitas pessoas não gostam do seu sabor ou porque começam a preocupar-se com o aumento dos teores de substâncias tóxicas detectadas em peixes (Dobson, 2002), a indústria disponibiliza, actualmente, cápsulas contendo suplementos de óleos (maioritariamente provenientes de peixe) e vários alimentos suplementados com AG *n*-3 (EPA, DHA ou α -linolénico). Estes suplementos, sendo ricos em ácidos polinsaturados, têm a desvantagem de serem sensíveis a processos de oxidação, necessitando frequentemente da adição de diversos antioxidantes de forma a aumentar o seu período de validade.

Devido aos problemas de obesidade com que as sociedades dos países desenvolvidos se têm vindo a deparar, a mensagem veiculada por diversos organismos e entidades ligadas à saúde tem sido a de reduzir a quantidade de gordura ingerida procurando, simultaneamente, substituir a gordura saturada por mono ou polinsaturada (Institute of Medicine of the National Academies (IOM), 2005; OMS, 2005; United States Department of Agriculture (USDA) e Department of Health and Human Services (HHS), 2005; Direcção Geral de Saúde, 2005). Segundo as directivas da USDA e HHS (2005), o consumo recomendado de gordura deve situar-se entre 20 e 35% do total de calorias ingeridas, recomendando-se ainda que o consumo diário de ácido linoleico e de α -linolénico seja aproximadamente de 18 g e 1,7 g, respectivamente. Já a IOM (2005) preconiza que uma ingestão adequada dos mesmos compostos corresponde a 17 g/dia (homens) e 12 g/dia (mulheres), e de 1,6 g/dia (homens) e 1,1 g/dia (mulheres), respectivamente. Os valores de ácido α -linolénico são frequentemente indexados aos valores de ácido linoleico, uma vez que o excesso do primeiro pode conduzir a situações prejudiciais de carência em ácido araquidónico devido ao mecanismo de competição existente entre os AG essenciais das séries *n*-3 e *n*-6 anteriormente referido. Apesar de existir uma certa unanimidade relativamente ao excessivo valor da relação *n*-6/*n*-3 actual (estimado em 20:1 e 30:1, considerando as dietas modernas) (Volker e Garg, 2000; Dobson, 2002), refira-se que o valor aconselhável para este rácio continua em estudo, uma vez que existem indicações que a actualmente aconselhada razão de 14:1 ou 10:1 poderá não ser necessariamente a ideal (Dobson, 2002).

5. PERFIL EM AG NA DETECÇÃO DE ADULTERAÇÕES

A composição em AG, tem sido tradicionalmente utilizada na indústria alimentar como um indicador de autenticidade e qualidade dos géneros alimentícios (Firestone e Reina, 1996; Aparicio e Aparicio-Ruiz, 2000; Ulberth e Buchgraber, 2000). Nas últimas décadas tem-se assistido a um aumento generalizado do consumo de óleos vegetais. De entre estes o azeite,

principal gordura consumida na dieta Mediterrânica, tem sofrido uma ampla divulgação devido à associação entre o seu consumo e benefícios para a saúde. Devido ao seu elevado valor económico, o azeite é alvo de frequentes adulterações. Por este motivo, através do Regulamento nº. 2568/91, foram introduzidos vários limites referentes a diversos compostos, de modo a controlar a autenticidade e qualidade deste produto. De entre os parâmetros controlados pela legislação está a composição em AG.

A utilização de óleo de avelã na adulteração de azeite é um assunto de interesse actual, tendo sido desenvolvidos vários trabalhos sobre este tema (Blanch *et al.*, 1998; Parcerisa *et al.*, 2000; Ozen e Mauer, 2002; Cercaci *et al.*, 2003; López-Díez *et al.*, 2003; Vigli *et al.*, 2003; Christopoulou *et al.*, 2004; Zabarar e Gordon, 2004; Peña *et al.*, 2005). Dado que as composições químicas do óleo de avelã e azeite, nomeadamente no que respeita à composição em AG, triacilgliceróis e fitosteróis, são algo similares, a adulteração de azeite com óleo de avelã torna-se de difícil detecção, especialmente quando esta é realizada com baixas percentagens de adulterante (Christopoulou *et al.*, 2004; Peña *et al.*, 2005). Por este motivo, há alguma preocupação de que este tipo de ocorrência possa tornar-se cada vez mais frequente (Peña *et al.*, 2005). A composição em AG, apesar de por si só não permitir a identificação das referidas adulterações pode, juntamente com outros parâmetros, ser bastante útil para detectar adulterações com óleo de avelã em percentagens superiores a 5% (Christopoulou *et al.*, 2004).

6. METODOLOGIAS ANALÍTICAS – BREVE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Antes de se proceder à análise da composição em AG dos frutos secos, há que efectuar a preparação da amostra o que, na maioria dos casos, envolve a extracção com solventes orgânicos (Myher e Kuksis, 1995; Dobson, 2002). A metodologia mais utilizada para a determinação do perfil em AG é, indubitavelmente, a cromatografia gasosa, sendo os AG analisados, regra geral, na forma de ésteres metílicos (FAME) (Gutnikov, 1995; Seppänen-Laakso *et al.*, 2002). Os FAME podem ser obtidos segundo dois processos diferentes de derivatização, conforme sejam realizados em meio ácido ou alcalino (Dobson, 2002). A derivatização através da catálise ácida é vantajosa por apresentar uma aplicabilidade mais ampla, uma vez que permite quer a esterificação de AG livres, quer a transesterificação quando estes se encontram ligados a outros compostos (Gutnikov, 1995, Dobson, 2002). O trifluoreto de boro (BF_3) é frequentemente utilizado como catalizador ácido pois permite realizar o processo de derivatização de AG livres num período curto de tempo, sendo no entanto mais demorado na transesterificação de triacilgliceróis, ésteres de fitosteróis e fosfolípidos (Gutnikov, 1995). Uma desvantagem deste processo é o facto de alguns AG mais lábeis poderem sofrer degradação, originando a produção de artefactos; esta desvantagem pode, no entanto, ser minimizada com a saponificação prévia da amostra (Gutnikov, 1995). Segundo Gutnikov (1995) a derivatização em meio alcalino, utilizando

preferencialmente soluções metanólicas de hidróxido de potássio / sódio, é uma boa opção nos casos em que a presença de AG livres é vestigial, uma vez que é um processo muito rápido e não causa a degradação de AG lábeis.

Encontram-se disponíveis na literatura excelentes revisões sobre os métodos analíticos utilizados na determinação da composição em AG, incluindo a preparação da amostra, derivatização dos compostos, métodos cromatográficos e tipos de detecção utilizados (Gutnikov, 1995; Myher e Kuksis, 1995; Brondz, 2002; Dobson, 2002; Seppänen-Laakso *et al.*, 2002).

II – ÁCIDOS GORDOS. PARTE EXPERIMENTAL

A composição em AG foi determinada por cromatografia gasosa usando uma coluna capilar e detecção por ionização em chama (GC/FID) segundo o método utilizado por Oliveira *et al.* (1994, 2001).

1. REAGENTES E PADRÕES

Os ésteres *cis-9-trans-12*-octadecadienoato de metilo ($C_{18:2n6ct}$), *trans-9-cis-12*-octadecadienoato de metilo ($C_{18:2n6tc}$) e *cis-11*-octadecenoato de metilo ($C_{18:1n7}$) foram adquiridos à Supelco (Bellefont, PA, USA). Ainda à mesma firma foi adquirida uma mistura de 37 ésteres metílicos de ácidos gordos constituída por: butanoato ($C_{4:0}$), hexanoato ($C_{6:0}$), octanoato ($C_{8:0}$), decanoato ($C_{10:0}$), undecanoato ($C_{11:0}$), dodecanoato ($C_{12:0}$), tridecanoato ($C_{13:0}$), tetradecanoato ($C_{14:0}$), pentadecanoato ($C_{15:0}$), hexadecanoato ($C_{16:0}$), heptadecanoato ($C_{17:0}$), octadecanoato ($C_{18:0}$), eicosanoato ($C_{20:0}$), heneicosanoate ($C_{21:0}$), docosanoato ($C_{22:0}$), tricosanoato ($C_{23:0}$), tetracosanoato ($C_{24:0}$), *cis-9*-tetradecenoato ($C_{14:1}$), *cis-10*-pentadecenoato ($C_{15:1}$), *cis-9*-hexadecenoato ($C_{16:1}$), *cis-10*-heptadecenoato ($C_{17:1}$), *trans-9*-octadecenoato ($C_{18:1n9t}$), *cis-9*-octadecenoato ($C_{18:1n9}$), *cis-11*-eicosenoato ($C_{20:1}$), *cis-13*-docosenoato ($C_{22:1n9}$), *cis-15*-tetracosenoato ($C_{24:1n9}$), *trans-9,12*-octadecadienoato ($C_{18:2n6tt}$), *cis-9,12*-octadecadienoato ($C_{18:2n6}$), *cis-6,9,12*-octadecatrienoato ($C_{18:3n6}$), *cis-9,12,15*-octadecatrienoato ($C_{18:3n3}$), *cis-11,14*-eicosadienoato ($C_{20:2n6}$), *cis-8,11,14*-eicosatrienoato ($C_{20:3n6}$), *cis-11,14,17*-eicosatrienoato ($C_{20:3n3}$), *cis-5,8,11,14*-eicosatetraenoato ($C_{20:4n6}$), *cis-13,16*-docosadienoato ($C_{22:2n6}$), *cis-5,8,11,14,17*-eicosapentenoato ($C_{20:5n3}$) e *cis-4,7,10,13,16,19*-docosahexenoato ($C_{22:6n3}$) de metilo. A solução metanólica de trifluoreto de boro a 14% ($BF_3/MeOH$) foi adquirida à Sigma (St. Louis, MO, USA).

2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Procedeu-se de igual forma para nozes e avelãs. As sementes foram partidas manualmente e o miolo foi separado e moído. A amostra foi misturada com sulfato de sódio anidro, introduzida num cartucho e extraída com éter de petróleo (40-60 °C) num aparelho Soxhlet (Büchi, Flawil, Switzerland), durante 1h 30 min. Após extracção, o solvente remanescente foi evaporado em corrente de azoto. O óleo extraído foi armazenado em tubos contendo sulfato de sódio anidro. Os tubos foram depois cheios com azoto, envoltos em papel de alumínio e conservados a 4 °C, durante o mais breve espaço de tempo possível, até as análises serem efectuadas.

Os AG foram analisados na forma de ésteres metílicos segundo o método utilizado por Oliveira *et al.* (1994, 2001). Uma toma de 100 µl de óleo foi colocada em balão volumétrico e dissolvida em 2 ml de *n*-heptano. Após a adição de 10 ml de solução metanólica de KOH a 11g/l, procedeu-se à sua hidrólise levando à ebulição em refluxo durante 10 min. Seguidamente procedeu-se à metilesterificação dos AG pela adição do ácido de Lewis BF₃ em solução metanólica a 14%, permanecendo em ebulição durante dois minutos. Após arrefecimento, adicionou-se solução aquosa saturada de NaCl até atingir o gargalo do balão, aguardando-se depois a separação da fase orgânica. Esta foi retirada para um tubo de vidro contendo sulfato de sódio anidro e, após conveniente diluição com *n*-heptano, a amostra foi colocada em recipiente apropriado e analisada por GC/FID.

3. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

O sistema cromatográfico utilizado tinha as seguintes características:

- Cromatógrafo Chrompack CP 9001 (Chrompack, Middelburg, The Netherlands) com injector “split-splitless”;
- Detector de ionização em chama (FID);
- Injector automático CP-9050;
- Coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 (Chrompack) (50 m x 0,25 mm d.i., 0,19 µm de espessura de filme).

Utilizaram-se as seguintes condições analíticas:

- Temperatura do injector: 230 °C;
- Temperatura da coluna: 160 °C durante um minuto, programada para em seguida aumentar até 239 °C à velocidade de 4 °C/min, e permanecer a esta temperatura durante 10 min;

- Temperatura do detector: 270 °C;
- Razão de "split": 1:50;
- Gás vector: hélio, à pressão interna inicial de 120 kPa;
- Volume de injeção: 1,2 µl.

Os dados cromatográficos obtidos foram analisados utilizando o software Maitre (JMBS Developments, Grenoble, França). Os compostos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos picos da amostra com os tempos de retenção obtidos com os padrões e, quando necessário, através da co-cromatografia com padrões. Tendo em consideração que as áreas referentes a cada pico do cromatograma são aproximadamente proporcionais à massa dos FAME que cada pico representa (Dobson, 2002), os resultados foram expressos em percentagem relativa de cada AG, calculado por normalização interna das áreas cromatográficas, assumindo um coeficiente de resposta idêntico para os compostos com cadeias carbonadas compreendidas entre C14 e C24 (Dobson, 2002).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o programa "Statistica for Windows" (Statistica for Windows, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) e os resultados obtidos comentados com base em literatura existente (Naes e Indhal, 1998; Alves e Oliveira, 2004; Alves *et al.*, 2005).

A análise envolveu a realização de testes MANOVA, de modo a avaliar a existência pelo menos um grupo diferente dos outros em pelo menos um AG, a realização de testes Hotelling T^2 para cada par de grupos, de forma a avaliar a hipótese de os grupos serem diferentes em pelo menos um composto e testes *t*-Student, para avaliação da existência de diferenças significativas relativamente a cada composto em cada par de grupos comparados. Para cada uma das matrizes estudadas, a análise multivariada dos dados obtidos envolveu uma análise discriminante "forward stepwise" de modo a seleccionar os AG mais discriminantes e, seguidamente, uma análise de variáveis canónicas baseada nos compostos seleccionados, de forma a analisar as diferenças entre grupos e permitir a sua visualização em gráficos apropriados. Realizou-se ainda uma análise de componentes principais (PCA), de forma a visualizarmos o comportamento geral das amostras e mostrar através de gráficos as similaridades entre as amostras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avelleira

No fracção lipídica das amostras de avelá foram detectados 15 ácidos gordos, nomeadamente os SFA C_{14:0}, C_{15:0}, C_{16:0}, C_{17:0}, C_{18:0}, C_{20:0} e C_{22:0}, os MUFA C_{16:1n7}, C_{17:1n7},

C_{18:1n9}, C_{18:1n7}, C_{20:1n9} e C_{22:1} e os PUFA C_{18:2n6} e C_{18:3n3}. Na Figura 3.2 apresenta-se um cromatograma típico relativo à mistura padrão utilizada (contendo 37 FAME). A separação dos AG referidos pode ser observada na Figura 3.3 (A e B), a qual mostra um cromatograma típico relativo a uma amostra de óleo de avelã.

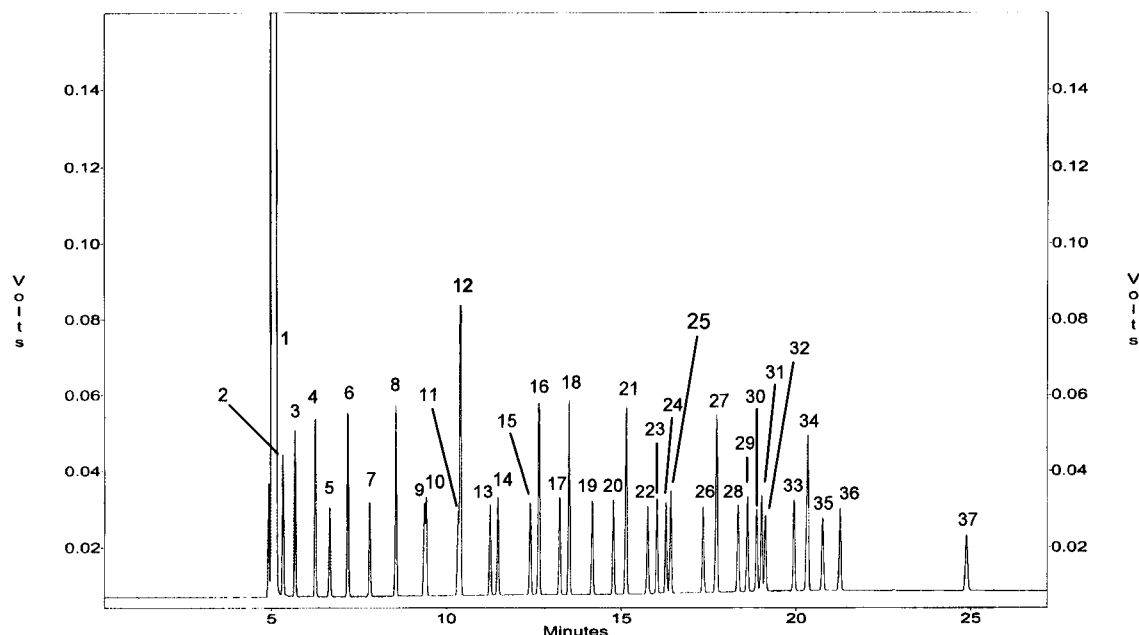


FIGURA 3.2. Cromatograma obtido por GC/FID representativo de uma mistura padrão com 37 FAME. Picos: 1: C_{4:0}; 2: C_{6:0}; 3: C_{8:0}; 4: C_{10:0}; 5: C_{11:0}; 6: C_{12:0}; 7: C_{13:0}; 8: C_{14:0}; 9: C_{14:1}; 10: C_{15:0}; 11: C_{15:1}; 12: C_{16:0}; 13: C_{16:1n7}; 14: C_{17:0}; 15: C_{17:1}; 16: C_{18:0}; 17: C_{18:1n9t}; 18: C_{18:1n9c}; 19: C_{18:2n6t}; 20: C_{18:2n6c}; 21: C_{20:0}; 22: C_{18:3n6}; 23: C_{20:1}; 24: C_{18:3n3}; 25: C_{21:0}; 26: C_{20:2}; 27: C_{22:0}; 28: C_{20:3n6}; 29: C_{22:1n9}; 30: C_{20:3n3}; 31: C_{20:4n6}; 32: C_{23:0}; 33: C_{22:2}; 34: C_{24:0}; 35: C_{20:5n3}; 36: C_{24:1}; 37: C_{22:6n3}.

A Tabela 3.2 apresenta os valores médios para cada AG detectado, bem como os totais em SFA, MUFA e PUFA por cultivar, ano de produção e localização geográfica. Na mesma tabela apresentam-se os teores em gordura e humidade, e os resultados obtidos para a resistência à oxidação. A percentagem de água foi determinada em aproximadamente 3 g de amostra, utilizando uma balança de infravermelhos SMO 01 (Scaltec, Goettingen, Germany) a operar a 100 ± 2 °C. O teor total de gordura foi determinado segundo os métodos oficiais da AOAC (AOAC, 2000). A resistência à oxidação foi determinada num aparelho de Rancimat (Metrohm CH series 679, Herisau, Switzerland) da seguinte forma: uma amostra de 3 ml de óleo foi colocada num tubo de aparelho, à temperatura de 110 ± 2 °C, fazendo borbulhar um fluxo de ar de 20 l/h; os compostos voláteis libertados durante a oxidação da gordura foram recolhidos num vaso colector contendo água, cuja condutividade era continuamente registada.

Como se pode verificar na referida tabela, à excepção do AG C_{15:0}, o qual não foi

detectado em algumas das amostras estudadas, todas as amostras apresentaram um perfil qualitativo idêntico e caracteristicamente composto pelos AG referidos. Também o perfil quantitativo se manteve de uma forma geral idêntico. Em todas as amostras o ácido oleico foi o AG maioritário (variando entre 74,2% e 83,3%), seguido pelos ácidos linoleico, palmítico, esteárico e *cis*-vacênico. Todos os restantes AG detectados e quantificados, invariavelmente apresentaram valores <1%.

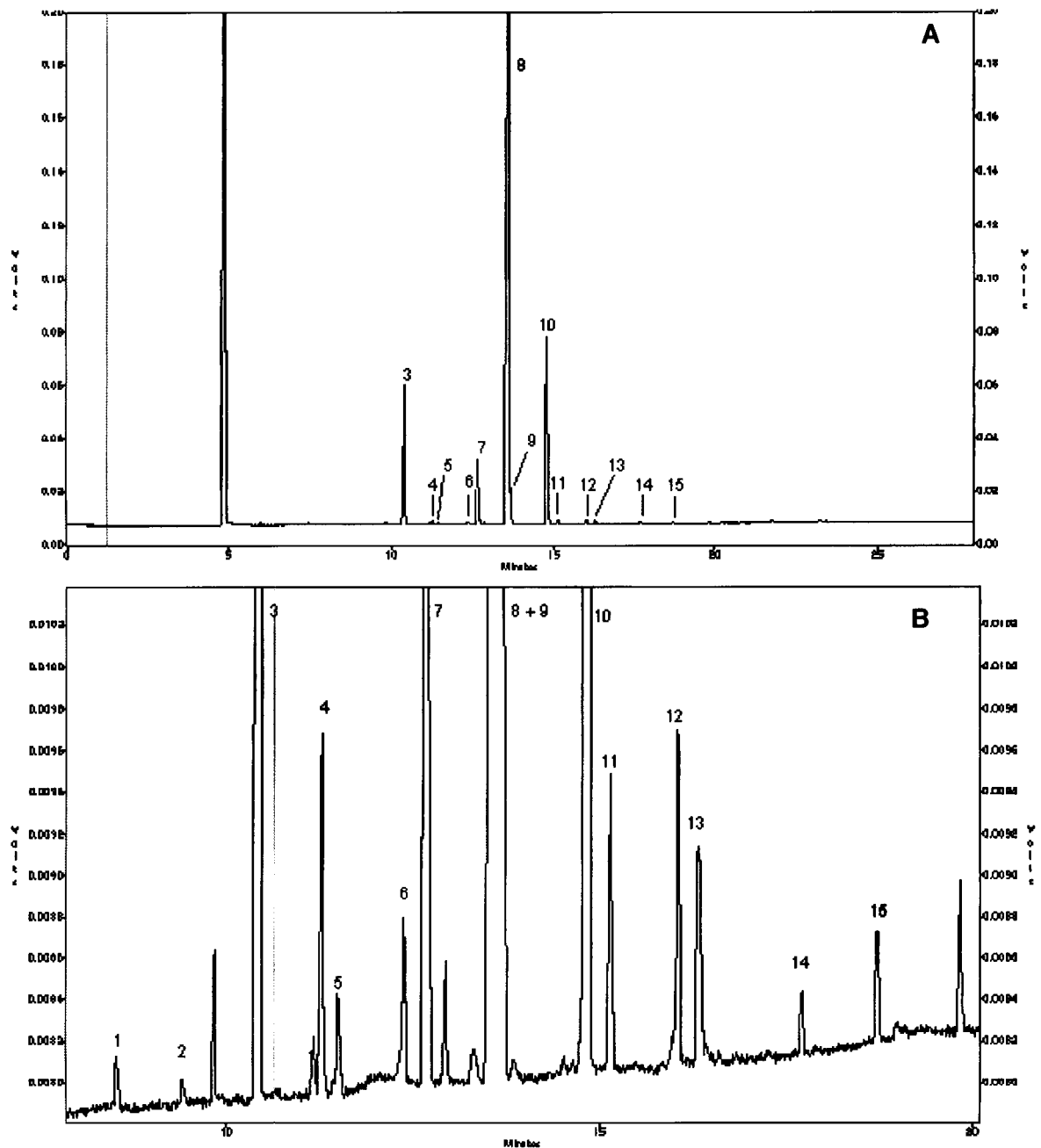


FIGURA 3.3. Cromatograma obtido por GC/FID representativo do perfil de ácidos gordos de uma amostra de avelã (A: perspectiva global, B: ampliação da imagem A). Picos: 1: C_{14:0}; 2: C_{15:0}; 3: C_{16:0}; 4: C_{16:1n7}; 5: C_{17:0}; 6: C_{17:1n7}; 7: C_{18:0}; 8: C_{18:1n9}; 9: C_{18:1n7}; 10: C_{18:2n6}; 11: C_{20:0}; 12: C_{20:1n9}; 13: C_{18:3n3}; 14: C_{22:0}; 15: C_{22:1n9}.

Encontram-se disponíveis na literatura diversos dados referentes à composição em AG do óleo de avelã (Parcerisa *et al.*, 1995a; Parcerisa *et al.*, 1997; Parcerisa *et al.*, 1998; Ruggeri *et al.*, 1998; Savage e McNeil, 1998; Ozdemir *et al.*, 2001a; Alasalvar *et al.*, 2003a; Benitez-Sánchez *et al.*, 2003). No entanto, a maioria dos estudos realizados visou cultivares diferentes das incluídas neste trabalho ou cultivadas noutros países. Tanto quanto nos é dado saber, o único trabalho publicado relativo a avelãs cultivadas em Portugal (Bernardo-Gil *et al.*, 2002), não refere qual ou quais as cultivares estudadas, não sendo por isso possível estabelecer relações entre os resultados obtidos pelos autores e os apresentados na Tabela 3.2. No entanto, em termos gerais, verificou-se que ambos os perfis, qualitativo e quantitativo, obtidos para as amostras estudadas, são semelhantes aos publicados na bibliografia referida.

Segundo alguns autores (Parcerisa *et al.*, 1995a; Alasalvar *et al.*, 2003a) a razão entre os ácidos oleico / linoleico varia entre as diferentes cultivares de avelã, estando os seus teores inversamente relacionados. Os resultados obtidos e apresentados na Tabela 3.2 são coerentes com a referida teoria, uma vez que, na generalidade, as cultivares com teores superiores de ácido linoleico apresentam também percentagens inferiores de ácido oleico. Verifica-se ainda que algumas cultivares apresentam comportamentos algo característicos ao longo dos diferentes anos de amostragem (por exemplo as cvs. Cosford, Gunslebert, Merveille de Bollwiller e Negreta parecem apresentar valores tendencialmente superiores de ácido linoleico e inferiores de ácido oleico comparativamente às restantes cultivares). Fazendo o cálculo da relação ácidos oleico/linoleico para as diferentes cultivares, ao longo dos três anos de amostragem, verifica-se que esta tem uma variação bastante lata (de 4,8 a 13,6) o que pode indicar a existência de diferenças entre as várias cultivares estudadas e, conseqüentemente, diferenças de comportamento, especialmente no que se refere à estabilidade oxidativa da sua fracção lipídica. Os valores da Tabela 3.2 mostram que, as cultivares com teores superiores em ácido linoleico, e conseqüentemente com relações oleico/linoleico inferiores apresentam, regra geral, menor resistência à oxidação.

Da análise dos resultados obtidos, verifica-se que os MUFA foram maioritários, seguidos pelos PUFA e SFA. Estes últimos apresentam magnitudes idênticas entre si, apesar de, na maioria das amostras estudadas, se verificarem teores ligeiramente superiores de PUFA relativamente aos de SFA.

TABELA 3.2. Composição em ácidos gordos (%relativa), teores de humidade e gordura total (%) e resistência à oxidação (R.O.) das cultivares de avelã estudadas, por ano de produção e localização geográfica.

| Cultivar | ÁCIDOS GORDOS | | | | | | | | | | | | | | R.O. oleico/linoleico (h) | Humidade (%) | Gordura (%) | | | | | |
|---------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------|--------------|-------------|------------|------------|------------|-----------|-------------|
| | C14:0 | C15:0 | C16:0 | C16:1n7 | C17:0 | C17:1n7 | C18:0 | C18:1n9 | C18:1n7 | C18:2n6 | C20:0 | C20:1n9 | C18:3n3 | C22:0 | | | | C21:1n9 | SFA | MUFA | PUFA | |
| Ano: 2001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Butler | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,84 ± 0,01 | 0,20 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 3,05 ± 0,00 | 79,71 ± 0,11 | 1,49 ± 0,11 | 9,11 ± 0,01 | 0,14 ± 0,00 | 0,13 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 9,15 | 81,65 | 9,20 | 8,75 | 15,3 | 4,4 ± 0,0 | 61,8 ± 1,9 |
| Campanica | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,02 ± 0,01 | 0,16 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,74 ± 0,00 | 82,81 ± 0,10 | 1,34 ± 0,11 | 7,27 ± 0,01 | 0,13 ± 0,00 | 0,16 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 8,01 | 84,59 | 7,37 | 11,39 | 9,7 | 4,7 ± 0,1 | 64,9 ± 0,2 |
| Costford | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,55 ± 0,03 | 0,19 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 2,81 ± 0,00 | 80,93 ± 0,16 | 1,38 ± 0,18 | 8,50 ± 0,01 | 0,13 ± 0,00 | 0,16 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 8,61 | 82,77 | 8,59 | 9,52 | 13,7 | 4,5 ± 0,2 | 62,0 ± 0,1 |
| Couplat | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,41 ± 0,01 | 0,20 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,07 ± 0,01 | 2,87 ± 0,00 | 81,13 ± 0,02 | 1,66 ± 0,02 | 8,12 ± 0,00 | 0,12 ± 0,00 | 0,16 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 8,50 | 83,27 | 8,20 | 10,00 | 14,5 | 3,8 ± 0,1 | 67,0 ± 0,2 |
| Daviana | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,32 ± 0,01 | 0,18 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 2,69 ± 0,01 | 80,49 ± 0,10 | 1,45 ± 0,13 | 9,25 ± 0,02 | 0,14 ± 0,00 | 0,17 ± 0,01 | 0,08 ± 0,01 | 0,04 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 8,26 | 82,40 | 9,34 | 8,70 | 16,3 | 5,4 ± 0,1 | 60,9 ± 0,1 |
| Ennis | 0,03 ± 0,00 | nd | 6,05 ± 0,01 | 0,22 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,08 ± 0,01 | 2,82 ± 0,01 | 80,36 ± 0,07 | 1,58 ± 0,07 | 8,41 ± 0,01 | 0,13 ± 0,01 | 0,13 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 9,11 | 82,41 | 8,48 | 9,56 | 16,2 | 6,4 ± 0,0 | 60,2 ± 0,1 |
| F. Coutard | 0,04 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,38 ± 0,01 | 0,21 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,20 ± 0,00 | 79,09 ± 0,11 | 1,05 ± 0,12 | 11,37 ± 0,01 | 0,12 ± 0,00 | 0,17 ± 0,00 | 0,12 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 7,83 | 80,67 | 11,48 | 6,96 | 8,9 | 6,3 ± 0,2 | 62,7 ± 0,2 |
| Grossal | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,71 ± 0,01 | 0,24 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 2,76 ± 0,01 | 82,00 ± 0,05 | 1,39 ± 0,03 | 7,20 ± 0,00 | 0,15 ± 0,00 | 0,16 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 8,73 | 83,91 | 7,30 | 11,39 | 15,1 | 5,2 ± 0,2 | 65,3 ± 0,2 |
| Gunslebert | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,97 ± 0,03 | 0,22 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 3,70 ± 0,00 | 76,71 ± 0,10 | 1,40 ± 0,11 | 11,25 ± 0,02 | 0,17 ± 0,00 | 0,17 ± 0,00 | 0,11 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 9,97 | 78,65 | 11,36 | 6,82 | 10,7 | 5,8 ± 0,2 | 60,2 ± 0,5 |
| Lansing | 0,04 ± 0,00 | nd | 6,75 ± 0,02 | 0,25 ± 0,00 | 0,05 ± 0,01 | 0,07 ± 0,00 | 2,77 ± 0,00 | 79,54 ± 0,12 | 1,76 ± 0,13 | 8,25 ± 0,01 | 0,15 ± 0,00 | 0,12 ± 0,00 | 0,10 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 9,79 | 81,79 | 8,35 | 9,64 | 13,0 | 4,9 ± 0,0 | 63,0 ± 0,0 |
| L. Espanha | 0,05 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 5,19 ± 0,01 | 0,20 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 2,08 ± 0,00 | 80,87 ± 0,03 | 1,17 ± 0,03 | 9,76 ± 0,00 | 0,12 ± 0,00 | 0,20 ± 0,02 | 0,12 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 7,54 | 82,59 | 9,88 | 8,28 | 15,3 | 3,8 ± 0,1 | 65,4 ± 0,1 |
| M. Bollwiller | 0,04 ± 0,01 | 0,01 ± 0,00 | 5,91 ± 0,31 | 0,21 ± 0,01 | 0,05 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 2,21 ± 0,05 | 80,02 ± 0,07 | 1,14 ± 0,05 | 9,90 ± 0,07 | 0,11 ± 0,01 | 0,14 ± 0,01 | 0,11 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 0,06 ± 0,01 | 8,36 | 81,66 | 10,01 | 8,08 | 14,4 | 4,6 ± 0,1 | 59,2 ± 0,2 |
| Morell | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 4,84 ± 0,01 | 0,14 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,81 ± 0,00 | 81,44 ± 0,10 | 1,33 ± 0,10 | 8,74 ± 0,01 | 0,13 ± 0,00 | 0,18 ± 0,01 | 0,10 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 7,90 | 83,23 | 8,84 | 9,32 | 14,8 | 4,1 ± 0,2 | 64,8 ± 0,1 |
| Negreta | 0,03 ± 0,00 | nd | 5,31 ± 0,00 | 0,19 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,59 ± 0,00 | 79,80 ± 0,29 | 1,12 ± 0,30 | 10,40 ± 0,01 | 0,12 ± 0,00 | 0,13 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 8,12 | 81,38 | 10,50 | 7,68 | 11,9 | 3,5 ± 0,2 | 69,0 ± 0,2 |
| Pauetet | 0,03 ± 0,00 | nd | 5,82 ± 0,01 | 0,21 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 2,49 ± 0,01 | 79,25 ± 0,03 | 1,76 ± 0,03 | 9,90 ± 0,01 | 0,12 ± 0,00 | 0,13 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 8,53 | 81,48 | 10,00 | 8,00 | 12,7 | 5,6 ± 0,3 | 65,6 ± 0,1 |
| R. Piemont | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 6,02 ± 0,00 | 0,26 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 3,01 ± 0,00 | 80,03 ± 0,11 | 1,28 ± 0,12 | 8,78 ± 0,01 | 0,13 ± 0,00 | 0,14 ± 0,00 | 0,11 ± 0,00 | 0,03 ± 0,01 | 0,04 ± 0,00 | 9,26 | 81,84 | 8,89 | 9,12 | 13,4 | 4,2 ± 0,0 | 66,7 ± 0,0 |
| Segorbe | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 4,99 ± 0,01 | 0,16 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 2,82 ± 0,01 | 80,94 ± 0,15 | 1,54 ± 0,14 | 8,72 ± 0,01 | 0,12 ± 0,00 | 0,18 ± 0,01 | 0,11 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 8,05 | 82,94 | 8,83 | 9,28 | 12,5 | 4,9 ± 0,2 | 63,0 ± 0,3 |
| St. M. Jesus | 0,04 ± 0,00 | nd | 5,21 ± 0,01 | 0,18 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 2,96 ± 0,00 | 81,53 ± 0,06 | 0,71 ± 0,03 | 8,63 ± 0,03 | 0,14 ± 0,00 | 0,16 ± 0,01 | 0,11 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,04 ± 0,01 | 8,44 | 82,70 | 8,74 | 9,45 | 13,4 | 4,4 ± 0,1 | 68,3 ± 1,5 |
| T. Giffoni | 0,02 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,14 ± 0,03 | 0,17 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,46 ± 0,00 | 80,14 ± 0,10 | 1,16 ± 0,05 | 10,29 ± 0,01 | 0,12 ± 0,00 | 0,15 ± 0,01 | 0,10 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 7,81 | 81,75 | 10,39 | 7,79 | 11,4 | 6,3 ± 0,0 | 65,3 ± 0,0 |
| Média | 0,03 | 0,01 | 5,55 | 0,20 | 0,05 | 0,08 | 2,73 | 80,36 | 1,35 | 9,15 | 0,13 | 0,15 | 0,10 | 0,03 | 0,05 | 8,52 | 82,19 | 9,25 | 8,93 | 13,3 | 4,9 | 64,0 |
| Varição | 0,02 - 0,05 | nd - 0,02 | 4,84 - 6,75 | 0,14 - 0,26 | 0,04 - 0,06 | 0,07 - 0,10 | 2,06 - 3,70 | 76,71 - 82,0 | 0,71 - 1,76 | 7,20 - 11,37 | 0,11 - 0,17 | 0,12 - 0,20 | 0,08 - 0,12 | 0,02 - 0,04 | 0,04 - 0,07 | 7,5 - 10,0 | 78,7 - 84,6 | 7,3 - 11,5 | 6,8 - 11,4 | 8,9 - 16,3 | 3,5 - 6,4 | 59,2 - 69,0 |
| Ano: 2002 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Butler | 0,04 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,92 ± 0,09 | 0,21 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 3,31 ± 0,02 | 80,64 ± 0,03 | 0,99 ± 0,02 | 8,28 ± 0,12 | 0,16 ± 0,00 | 0,16 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 9,52 | 82,11 | 8,38 | 9,74 | 14,5 | 5,2 ± 0,2 | 59,8 ± 4,8 |
| Campanica | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,50 ± 0,08 | 0,20 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 2,15 ± 0,02 | 80,51 ± 0,13 | 1,07 ± 0,05 | 9,89 ± 0,13 | 0,12 ± 0,00 | 0,18 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 7,89 | 82,11 | 9,99 | 8,14 | 13,6 | 6,4 ± 0,1 | 62,5 ± 1,2 |
| Costford | 0,04 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,11 ± 0,07 | 0,18 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,41 ± 0,07 | 78,83 ± 0,48 | 1,04 ± 0,04 | 11,67 ± 0,35 | 0,14 ± 0,01 | 0,17 ± 0,00 | 0,12 ± 0,02 | 0,03 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 7,80 | 80,36 | 11,79 | 6,75 | 11,9 | 4,9 ± 0,3 | 59,1 ± 1,1 |
| Couplat | 0,03 ± 0,01 | nd | 5,88 ± 0,12 | 0,26 ± 0,01 | 0,06 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,87 ± 0,08 | 80,28 ± 0,26 | 1,17 ± 0,04 | 8,84 ± 0,03 | 0,15 ± 0,01 | 0,15 ± 0,01 | 0,10 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 9,03 | 82,00 | 8,95 | 9,08 | 18,0 | 5,7 ± 0,3 | 62,0 ± 0,3 |
| Daviana | 0,03 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 5,47 ± 0,09 | 0,19 ± 0,01 | 0,06 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,86 ± 0,07 | 80,21 ± 0,16 | 1,02 ± 0,05 | 9,55 ± 0,17 | 0,15 ± 0,01 | 0,18 ± 0,01 | 0,10 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,05 ± 0,01 | 8,61 | 81,72 | 9,65 | 8,40 | 13,1 | 5,0 ± 0,1 | 58,7 ± 0,1 |
| Ennis | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,58 ± 0,13 | 0,21 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 2,39 ± 0,02 | 79,15 ± 0,19 | 1,11 ± 0,11 | 10,85 ± 0,24 | 0,14 ± 0,00 | 0,17 ± 0,00 | 0,10 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 8,22 | 80,79 | 10,94 | 7,30 | 12,7 | 5,0 ± 0,2 | 56,4 ± 0,6 |
| F. Coutard | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,59 ± 0,11 | 0,20 ± 0,01 | 0,05 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,17 ± 0,03 | 80,34 ± 0,34 | 1,07 ± 0,09 | 9,88 ± 0,09 | 0,15 ± 0,01 | 0,18 ± 0,02 | 0,11 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 8,03 | 81,92 | 9,99 | 8,14 | 13,4 | 6,0 ± 0,0 | 62,0 ± 0,6 |
| Grossal | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,82 ± 0,04 | 0,25 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,45 ± 0,01 | 81,42 ± 0,13 | 1,20 ± 0,09 | 8,20 ± 0,21 | 0,15 ± 0,00 | 0,16 ± 0,00 | 0,10 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 8,54 | 83,16 | 8,30 | 9,93 | 16,6 | 4,1 ± 0,2 | 68,8 ± 0,5 |
| Gunslebert | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,87 ± 0,08 | 0,23 ± 0,01 | 0,06 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,80 ± 0,01 | 79,23 ± 0,11 | 1,08 ± 0,07 | 10,08 ± 0,03 | 0,16 ± 0,01 | 0,16 ± 0,01 | 0,10 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 8,97 | 80,84 | 10,18 | 7,86 | 12,9 | 5,1 ± 0,4 | 55,4 ± 0,7 |
| Lansing | 0,04 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 6,18 ± 0,10 | 0,25 ± 0,01 | 0,06 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,56 ± 0,01 | 78,86 ± 0,15 | 1,10 ± 0,06 | 10,35 ± 0,03 | 0,15 ± 0,01 | 0,14 ± 0,00 | 0,12 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 9,02 | 80,49 | 10,47 | 7,62 | 14,3 | 5,3 ± 0,0 | 60,7 ± 1,0 |
| L. Espanha | 0,03 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 5,29 ± 0,05 | 0,18 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 1,87 ± 0,01 | 79,14 ± 0,11 | 1,09 ± 0,06 | 11,74 ± 0,08 | 0,12 ± 0,01 | 0,19 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 7,41 | 80,74 | 11,85 | 6,74 | 9,8 | 7,7 ± 0,3 | 53,8 ± 0,9 |
| M. Bollwiller | 0,03 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 4,92 ± 0,14 | 0,17 ± 0,01 | 0,06 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 2,10 ± 0,02 | 78,50 ± 0,26 | 1,06 ± 0,07 | 12,52 ± 0,10 | 0,13 ± 0,00 | 0,20 ± 0,01 | 0,12 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 7,29 | 80,05 | 12,64 | 6,27 | 9,3 | 5,7 ± 0,0 | 57,3 ± 0,5 |
| Morell | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,46 ± 0,13 | 0,20 ± 0,01 | 0,05 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,84 ± 0,01 | 82,72 ± 0,38 | 0,99 ± 0,08 | 7,02 ± 0,06 | 0,16 ± 0,01 | 0,17 ± 0,01 | 0,11 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 8,58 | 84,20 | 7,13 | 11,78 | 17,7 | 4,5 ± 0,2 | 67,5 ± 0,5 |
| Negreta | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,51 ± 0,05 | 0,21 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,29 ± 0,02 | 78,28 ± 0,09 | 1,22 ± 0,04 | 11,82 ± 0,06 | 0,14 ± 0,01 | 0,16 ± 0,01 | 0,10 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 8,03 | 80,02 | 11,92 | 6,62 | 9,7 | 5,3 ± 0,2 | 73,4 ± 0,9 |
| Pauetet | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 6,28 ± 0,11 | 0,30 ± 0,01 | 0,05 ± 0,01 | 0,08 ± 0,00 | 2,41 ± 0,08 | 79,11 ± 0,18 | 1,26 ± 0,09 | 9,93 ± 0,10 | 0,14 ± 0,01 | 0,16 ± 0,01 | | | | | | | | | | |

continuação da Tabela 3.2.

| Cultivar | C:14:0 | C:15:0 | C:16:0 | C:16:1n7 | C:17:0 | C:17:1n7 | C:18:0 | C:18:1n9 | C:18:1n7 | C:18:2n6 | C:20:0 | C:20:1n9 | C:18:3n3 | C:22:0 | C:21:1n9 | SFA | MUFA | PUFA | ratio | R.O. | Humidade | Gordura |
|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|-----------|-------------|
| Ano: 2002 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Butler | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,81 ± 0,09 | 0,20 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 3,18 ± 0,05 | 79,80 ± 0,11 | 0,87 ± 0,04 | 9,47 ± 0,07 | 0,16 ± 0,00 | 0,16 ± 0,00 | 0,11 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 9,29 | 81,12 | 9,58 | 8,43 | 13,3 | 3,7 ± 0,2 | 62,7 ± 0,7 |
| Campanica | 0,04 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,22 ± 0,09 | 0,21 ± 0,01 | 0,05 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,07 ± 0,01 | 81,00 ± 0,14 | 1,00 ± 0,03 | 9,80 ± 0,06 | 0,12 ± 0,00 | 0,10 ± 0,01 | 0,10 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 7,52 | 82,57 | 9,90 | 8,27 | 5,9 | 4,3 ± 0,4 | 67,2 ± 0,9 |
| Cosford | 0,04 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,33 ± 0,05 | 0,19 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,43 ± 0,03 | 79,71 ± 0,20 | 1,07 ± 0,03 | 10,63 ± 0,11 | 0,13 ± 0,00 | 0,16 ± 0,01 | 0,12 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 8,04 | 81,19 | 10,75 | 7,50 | 6,5 | 4,7 ± 0,3 | 57,6 ± 1,2 |
| Couplat | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,22 ± 0,09 | 0,19 ± 0,01 | 0,05 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,70 ± 0,05 | 82,24 ± 0,20 | 0,90 ± 0,06 | 8,08 ± 0,11 | 0,13 ± 0,00 | 0,17 ± 0,01 | 0,10 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 8,17 | 83,61 | 8,18 | 10,18 | 7,2 | 4,9 ± 0,2 | 69,4 ± 0,4 |
| Ennis | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,94 ± 0,14 | 0,23 ± 0,01 | 0,06 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 2,48 ± 0,02 | 79,78 ± 0,23 | 1,03 ± 0,08 | 9,86 ± 0,15 | 0,14 ± 0,01 | 0,15 ± 0,01 | 0,10 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 8,70 | 81,33 | 9,96 | 8,09 | 15,1 | 3,5 ± 0,3 | 56,1 ± 0,9 |
| F. Coutard | 0,02 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,43 ± 0,06 | 0,18 ± 0,01 | 0,06 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,42 ± 0,07 | 81,42 ± 0,16 | 0,89 ± 0,05 | 9,01 ± 0,19 | 0,14 ± 0,01 | 0,17 ± 0,01 | 0,09 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 8,11 | 82,79 | 9,10 | 9,04 | 11,2 | 4,1 ± 0,3 | 59,2 ± 0,5 |
| M. Bollwiller | 0,03 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 4,38 ± 0,15 | 0,14 ± 0,01 | 0,05 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 1,77 ± 0,04 | 79,36 ± 0,21 | 0,88 ± 0,02 | 12,78 ± 0,11 | 0,12 ± 0,01 | 0,20 ± 0,01 | 0,13 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 6,39 | 80,70 | 12,90 | 6,21 | 16,8 | 3,6 ± 0,5 | 58,5 ± 0,7 |
| Morell | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 4,97 ± 0,05 | 0,16 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | 1,95 ± 0,08 | 76,50 ± 0,12 | 1,05 ± 0,04 | 14,58 ± 0,05 | 0,13 ± 0,01 | 0,20 ± 0,00 | 0,14 ± 0,01 | 0,04 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 7,19 | 78,07 | 14,72 | 5,25 | 10,6 | 5,1 ± 0,1 | 68,4 ± 0,5 |
| Pauetet | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,06 ± 0,16 | 0,19 ± 0,01 | 0,05 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | 2,06 ± 0,04 | 81,31 ± 0,22 | 1,06 ± 0,07 | 9,64 ± 0,20 | 0,14 ± 0,01 | 0,17 ± 0,00 | 0,10 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 7,37 | 82,87 | 9,74 | 8,43 | 12,9 | 5,6 ± 0,2 | 65,1 ± 0,8 |
| T. Giffoni | 0,02 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 4,90 ± 0,11 | 0,16 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,55 ± 0,02 | 83,26 ± 0,21 | 0,91 ± 0,06 | 7,55 ± 0,11 | 0,14 ± 0,00 | 0,17 ± 0,01 | 0,09 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 7,70 | 84,62 | 7,64 | 11,02 | 8,1 | 4,2 ± 0,1 | 64,8 ± 1,6 |
| Média | 0,03 | 0,01 | 5,23 | 0,18 | 0,05 | 0,08 | 2,36 | 80,44 | 0,97 | 10,14 | 0,14 | 0,17 | 0,11 | 0,03 | 0,05 | 7,85 | 81,89 | 10,25 | 7,93 | 10,7 | 4,4 | 62,9 |
| Varição | 0,02 - 0,04 | 0,01 - 0,02 | 4,38 - 5,94 | 0,14 - 0,24 | 0,05 - 0,06 | 0,07 - 0,10 | 1,77 - 3,18 | 76,50 - 83,26 | 0,87 - 1,08 | 7,55 - 14,58 | 0,12 - 0,16 | 0,15 - 0,20 | 0,09 - 0,14 | 0,02 - 0,04 | 0,03 - 0,06 | 6,4 - 9,3 | 78,1 - 84,6 | 7,6 - 14,7 | 5,3 - 11,0 | 5,9 - 16,8 | 3,5 - 5,6 | 56,1 - 69,4 |
| Ano: 2003 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Butler | 0,04 ± 0,00 | nd | 6,11 ± 0,31 | 0,19 ± 0,01 | 0,07 ± 0,00 | 0,06 ± 0,01 | 3,94 ± 0,11 | 79,73 ± 0,32 | 2,30 ± 0,19 | 7,08 ± 0,17 | 0,18 ± 0,01 | 0,16 ± 0,02 | 0,09 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 10,37 | 82,49 | 7,17 | 11,26 | 18,1 | 3,8 ± 0,1 | 58,7 ± 0,0 |
| Campanica | 0,04 ± 0,00 | nd | 5,12 ± 0,04 | 0,16 ± 0,01 | 0,05 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,72 ± 0,02 | 81,58 ± 0,35 | 2,49 ± 0,24 | 7,23 ± 0,05 | 0,14 ± 0,00 | 0,19 ± 0,02 | 0,09 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 8,09 | 84,55 | 7,32 | 11,28 | 18,8 | 3,4 ± 0,0 | 61,4 ± 1,9 |
| Cosford | 0,05 ± 0,01 | nd | 6,00 ± 0,24 | 0,22 ± 0,01 | 0,06 ± 0,01 | 0,08 ± 0,01 | 2,56 ± 0,09 | 78,12 ± 0,54 | 2,04 ± 0,19 | 10,24 ± 0,51 | 0,14 ± 0,01 | 0,20 ± 0,01 | 0,10 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,06 ± 0,01 | 8,84 | 80,71 | 10,35 | 7,63 | 14,2 | 4,1 ± 0,0 | 52,6 ± 1,0 |
| Couplat | 0,03 ± 0,00 | nd | 5,65 ± 0,10 | 0,19 ± 0,01 | 0,04 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 3,22 ± 0,02 | 80,16 ± 0,43 | 3,15 ± 0,30 | 6,88 ± 0,04 | 0,14 ± 0,00 | 0,16 ± 0,01 | 0,09 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 9,11 | 83,79 | 6,97 | 11,65 | 20,4 | 3,3 ± 0,2 | 62,9 ± 0,0 |
| Ennis | 0,05 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 6,24 ± 0,08 | 0,21 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,08 ± 0,01 | 3,09 ± 0,04 | 79,10 ± 0,17 | 2,29 ± 0,14 | 8,32 ± 0,05 | 0,16 ± 0,00 | 0,19 ± 0,02 | 0,08 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 9,64 | 81,91 | 8,40 | 9,51 | 17,1 | 5,0 ± 0,2 | 56,2 ± 1,0 |
| F. Coutard | 0,04 ± 0,00 | nd | 6,11 ± 0,15 | 0,21 ± 0,01 | 0,06 ± 0,01 | 0,08 ± 0,00 | 2,71 ± 0,08 | 79,69 ± 0,31 | 2,13 ± 0,22 | 8,36 ± 0,26 | 0,15 ± 0,02 | 0,21 ± 0,01 | 0,09 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 9,10 | 82,37 | 8,45 | 9,53 | 15,4 | 4,1 ± 0,0 | 63,2 ± 0,6 |
| Grossal | 0,04 ± 0,00 | nd | 5,64 ± 0,03 | 0,21 ± 0,01 | 0,05 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 3,12 ± 0,02 | 80,67 ± 0,36 | 2,18 ± 0,22 | 7,17 ± 0,08 | 0,15 ± 0,01 | 0,19 ± 0,02 | 0,10 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 9,04 | 83,48 | 7,27 | 11,25 | 17,6 | 3,4 ± 0,0 | 65,0 ± 0,0 |
| Gunslebert | 0,04 ± 0,01 | 0,01 ± 0,00 | 5,68 ± 0,07 | 0,20 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 2,58 ± 0,03 | 75,38 ± 0,29 | 2,36 ± 0,36 | 8,44 ± 0,14 | 0,18 ± 0,01 | 0,20 ± 0,02 | 0,13 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 8,53 | 78,09 | 13,44 | 5,66 | 12,6 | 4,7 ± 0,1 | 50,7 ± 0,3 |
| Lansing | 0,06 ± 0,01 | nd | 7,57 ± 0,16 | 0,29 ± 0,02 | 0,07 ± 0,01 | 0,08 ± 0,01 | 3,13 ± 0,03 | 77,54 ± 0,34 | 2,48 ± 0,17 | 15,50 ± 0,16 | 0,11 ± 0,00 | 0,22 ± 0,02 | 0,12 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 7,28 | 76,99 | 15,62 | 4,78 | 11,5 | 4,8 ± 0,2 | 56,0 ± 0,0 |
| L. Espanha | 0,05 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 5,47 ± 0,06 | 0,20 ± 0,01 | 0,05 ± 0,01 | 0,09 ± 0,00 | 1,58 ± 0,06 | 74,15 ± 0,25 | 2,29 ± 0,28 | 12,54 ± 0,08 | 0,13 ± 0,01 | 0,21 ± 0,02 | 0,10 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 7,92 | 79,44 | 12,65 | 6,10 | 13,2 | 4,1 ± 0,0 | 55,9 ± 2,1 |
| M. Bollwiller | 0,04 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 5,28 ± 0,03 | 0,17 ± 0,00 | 0,06 ± 0,01 | 0,08 ± 0,00 | 2,37 ± 0,03 | 76,45 ± 0,18 | 2,48 ± 0,17 | 12,54 ± 0,08 | 0,13 ± 0,01 | 0,21 ± 0,02 | 0,10 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 7,92 | 79,44 | 12,65 | 6,10 | 13,2 | 4,1 ± 0,0 | 55,9 ± 2,1 |
| Morell | 0,03 ± 0,00 | nd | 5,51 ± 0,04 | 0,18 ± 0,01 | 0,06 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 2,52 ± 0,04 | 79,86 ± 0,08 | 2,57 ± 0,17 | 8,68 ± 0,12 | 0,13 ± 0,01 | 0,18 ± 0,01 | 0,11 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,05 ± 0,01 | 8,28 | 82,93 | 8,79 | 9,20 | 15,8 | 3,4 ± 0,0 | 62,6 ± 0,0 |
| Negreta | 0,03 ± 0,00 | nd | 5,59 ± 0,05 | 0,20 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 2,70 ± 0,01 | 75,25 ± 0,12 | 2,40 ± 0,11 | 13,21 ± 0,03 | 0,12 ± 0,01 | 0,18 ± 0,02 | 0,10 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 0,08 ± 0,01 | 8,51 | 78,19 | 13,30 | 5,70 | 13,4 | 3,2 ± 0,1 | 65,2 ± 0,7 |
| Pauetet | 0,03 ± 0,00 | nd | 5,78 ± 0,02 | 0,20 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 2,80 ± 0,03 | 79,09 ± 0,12 | 3,13 ± 0,12 | 8,38 ± 0,02 | 0,14 ± 0,00 | 0,18 ± 0,01 | 0,09 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,06 ± 0,01 | 8,83 | 82,73 | 8,47 | 9,44 | 17,0 | 3,4 ± 0,2 | 60,4 ± 0,1 |
| R. Piemont | 0,03 ± 0,00 | nd | 6,02 ± 0,06 | 0,25 ± 0,01 | 0,05 ± 0,00 | 0,08 ± 0,01 | 3,18 ± 0,03 | 80,07 ± 0,21 | 2,56 ± 0,19 | 7,24 ± 0,06 | 0,14 ± 0,01 | 0,16 ± 0,02 | 0,09 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 0,05 ± 0,01 | 9,45 | 83,17 | 7,33 | 11,06 | 18,8 | 2,8 ± 0,0 | 63,7 ± 0,2 |
| Segorbe | 0,03 ± 0,00 | nd | 5,42 ± 0,03 | 0,17 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 3,72 ± 0,03 | 80,03 ± 0,36 | 2,59 ± 0,23 | 7,49 ± 0,13 | 0,16 ± 0,00 | 0,17 ± 0,01 | 0,15 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 9,40 | 83,07 | 7,63 | 10,69 | 17,0 | 4,9 ± 0,1 | 59,5 ± 0,3 |
| St. M. Jesus | 0,04 ± 0,01 | nd | 5,70 ± 0,03 | 0,19 ± 0,01 | 0,04 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 3,52 ± 0,03 | 80,73 ± 0,07 | 1,77 ± 0,06 | 7,44 ± 0,02 | 0,16 ± 0,00 | 0,16 ± 0,01 | 0,10 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,06 ± 0,01 | 9,48 | 82,97 | 7,54 | 10,85 | 16,9 | 3,4 ± 0,1 | 60,9 ± 0,8 |
| T. Giffoni | 0,04 ± 0,00 | nd | 5,63 ± 0,09 | 0,17 ± 0,01 | 0,06 ± 0,01 | 0,07 ± 0,00 | 3,65 ± 0,02 | 79,50 ± 0,35 | 2,40 ± 0,31 | 7,96 ± 0,04 | 0,16 ± 0,01 | 0,18 ± 0,01 | 0,09 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 9,57 | 82,38 | 8,04 | 9,99 | 15,3 | 3,7 ± 0,1 | 64,6 ± 0,5 |
| Média | 0,04 | 0,02 | 5,81 | 0,20 | 0,05 | 0,07 | 2,95 | 78,73 | 2,41 | 9,19 | 0,15 | 0,18 | 0,10 | 0,03 | 0,05 | 9,03 | 81,65 | 9,29 | 9,15 | 16,2 | 4,0 | 59,9 |
| Varição | 0,03 - 0,06 | nd - 0,02 | 5,12 - 7,57 | 0,16 - 0,29 | 0,04 - 0,07 | 0,06 - 0,09 | 1,58 - 3,94 | 74,15 - 81,58 | 1,77 - 3,15 | 6,88 - 15,50 | 0,11 - 0,18 | 0,16 - 0,22 | 0,08 - 0,15 | 0,02 - 0,03 | 0,03 - 0,08 | 7,3 - 11,1 | 77,0 - 84,6 | 7,0 - 15,6 | 4,8 - 11,7 | 11,5 - 20,4 | 2,8 - 6,3 | 52,6 - 65,2 |
| Butler | 0,03 ± 0,00 | nd | 5,96 ± 0,07 | 0,16 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 3,77 ± 0,03 | 78,78 ± 0,25 | 3,07 ± 0,17 | 7,64 ± 0,07 | 0,16 ± 0,00 | 0,22 ± 0,02 | 0,08 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 10,00 | 82,31 | 7,73 | 10,31 | 17,0 | 6,0 ± 0,1 | 59,1 ± 0,4 |
| Campanica | 0,04 ± 0,00 | nd | 5,56 ± 0,16 | 0,20 ± 0,02 | 0,05 ± 0,00 | 0,08 ± 0,01 | 3,28 ± 0,09 | 79,03 ± 0,57 | 3,64 ± 0,27 | 7,64 ± 0,41 | 0,15 ± 0,01 | 0,17 ± 0,01 | 0,09 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 | 9,12 | 83,16 | 7,73 | 10,35 | 15,8 | 4,2 ± 0,0 | 60,4 ± 0,2 |
| Cosford | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 5,79 ± 0,03 | 0,17 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 2,96 ± 0,02 | 78,75 ± 0,05 | 2,44 ± 0,05 | 9,20 ± 0,03 | 0,14 ± 0,00 | 0,21 ± 0,01 | 0,12 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 9,02 | 81,67 | 9,32 | 8,56 | 16,5 | 5,0 ± 0,1 | 56,0 ± 0,7 |
| Couplat | 0,03 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 5,53 ± 0,08 | 0,19 ± 0,01 | 0,05 ± 0,01 | 0,07 ± 0,00 | 3,65 ± 0,02 | 80,08 ± 0,23 | 4,08 ± 0,12 | 5,89 ± 0,12 | 0,14 ± 0,00 | 0,16 ± 0,01 | 0,12 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 9,42 | 84,61 | 6,00 | 13,60 | 21,1 | 3,6 ± 0,1 | 63,2 ± 0,2 |
| Ennis | 0,03 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 6,52 ± 0,23 | 0,21 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Como referido anteriormente, o óleo de avelã apresenta semelhanças ao azeite, especialmente no que se refere à composição em AG. O elevado valor económico do azeite, propicia diversos tipos de adulterações, entre as quais se inclui a adição de óleo de avelã. Pela similaridade das suas composições químicas, torna-se difícil detectar a adição de pequenas quantidades de óleo de avelã a azeite. Refira-se no entanto que, comparando os dados relativos à composição em AG de azeites provenientes de diversos países (Pereira *et al.* 2002; Benitez-Sánchez *et al.*, 2003; Mannina *et al.*, 2003; Ollivier *et al.*, 2003; Salvador *et al.*, 2003) com os obtidos para as amostras de avelã estudadas (Tabela 3.2), parecem existir ligeiras diferenças, nomeadamente no que se refere às percentagens relativas de ácidos palmítico e linoleico. Observa-se que, em ambos os casos, o AG maioritário é o oleico. No entanto, para a generalidade dos azeites segue-se o ácido palmítico e só depois o linoleico, ao passo que no óleo de avelã a ordem entre segundo e terceiro AG maioritário é inversa, isto é, o ácido linoleico apresenta um teor superior ao do palmítico. Consequentemente, a comparação dos valores obtidos com os descritos na literatura relativamente à composição em AG de diferentes azeites, parece sugerir que o óleo de avelã apresenta um teor de SFA tendencialmente inferior a aquele existente na maioria dos azeites.

Obviamente, nos casos de adulterações com pequenas quantidades de óleo de avelã, muito provavelmente esta ligeira diferença de composição dissipar-se-á. No entanto, como referido por outros autores, a conjugação de vários parâmetros, entre os quais a composição em AG, poderá ser uma ferramenta útil para a detecção de adulterações (Christopoulou *et al.*, 2004). Neste ponto há que fazer uma chamada de atenção para a importância da realização de estudos abrangendo diferentes cultivares, cultivadas em diferentes países e sujeitas a diversas condições edafo-climáticas. Sabendo-se que os factores referidos podem influenciar a composição química, neste caso de azeites ou de óleos de avelã (Ozdemir *et al.*, 2001a; Parcerisa *et al.*, 1998; Açkurt *et al.*, 1999; Benitez-Sánchez *et al.*, 2003), a variação de valores para um mesmo produto proveniente de diferentes localizações geográficas pode ser um factor limitante na interpretação de dados com o objectivo de identificar possíveis adulterações. Desta forma, a caracterização qualitativa e quantitativa realizada neste trabalho, permite não apenas traçar os perfis químicos característicos das diferentes cultivares cultivadas em Portugal, como também recolher dados que possam vir a ser úteis para outros estudos, como por exemplo a avaliação de adulterações de azeites com óleo de avelã.

Para além da utilidade na verificação da autenticidade dos produtos alimentares, a comparação da composição em AG dos óleos de avelã e azeite, em termos de SFA, MUFA e PUFA totais, permite ainda observar que, o óleo de avelã é uma fonte importante em ácido oleico, o qual como referido tem sido associado com benefícios para a saúde. Apresenta ainda a vantagem de, regra geral, os seus teores em SFA, associados ao desenvolvimento de DCV, serem inferiores aos existentes no azeite.

De forma a estudar a influência da cultivar, ano e localização geográfica na composição em AG do óleo de avelã, foram estudadas 79 amostras, compreendendo 19 cultivares diferentes, 3 anos de colheita e 2 localizações geográficas. Após análise sistemática da totalidade das amostras, procedeu-se ao tratamento estatístico dos resultados obtidos.

De forma a verificar a influência do ano, efectuaram-se testes MANOVA e Hotelling T^2 , considerando apenas os resultados obtidos ao longo dos três anos de estudo para as cultivares provenientes da localização geográfica “Vila Real” e tendo como factor agrupante o ano de produção. Tendo em consideração que não foram obtidos resultados para a cv. Daviana no ano 2003, os dados referentes a esta cultivar não foram incluídos na análise estatística. Os resultados obtidos nos testes referidos demonstraram diferenças significativas entre todos os grupos comparados (Tabela 3.3). A realização de testes t -Student permitiu verificar quais os compostos responsáveis pelas diferenças entre os anos de produção (Tabela 3.3). Observando os resultados apresentados na referida tabela, verifica-se que a maioria dos AG que explicam as diferenças observadas entre 2001 e 2003 são os mesmos que explicam as diferenças entre 2002 e 2003. Entre estes AG encontra-se o ácido oleico, AG caracteristicamente maioritário no óleo de avelã. Já entre os anos 2001 e 2002, observa-se que as diferenças são explicadas por oito AG, de entre os quais consta o ácido linoleico, segundo AG maioritário, mas não o ácido oleico. Pode-se observar ainda que determinados AG, nomeadamente os ácidos $C_{17:1n7}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1n7}$, $C_{20:0}$ e $C_{20:1n9}$, parecem ser importantes na discriminação dos anos uma vez que explicam as diferenças existentes para qualquer par de anos considerado.

TABELA 3.3. Testes MANOVA, Hotelling T^2 e t -Student relativos às diferenças entre anos de produção em termos de AG.

| RESUMO DO TESTE MANOVA | | | |
|---|--|--|---|
| Wilks' Lambda = 0,03465; $F_{(30,280)} = 40,805$; $p < 0,0000$ | | | |
| RESUMO DOS TESTES HOTELLING T^2 E t -STUDENT | | | |
| | 2001 | 2002 | 2003 |
| 2001 | ----- | $C_{16:1n7}$, $C_{17:0}$, $C_{17:1n7}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1n7}$, $C_{18:2n6}$, $C_{20:0}$, $C_{20:1n9}$ | $C_{14:0}$, $C_{15:0}$, $C_{16:0}$, $C_{17:0}$, $C_{17:1n7}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1n9}$, $C_{18:1n7}$, $C_{20:0}$, $C_{20:1n9}$ |
| 2002 | $T^2 = 546,61$; $F_{(15,92)} = 31,628$ $p < 0,0000$ | ----- | $C_{14:0}$, $C_{15:0}$, $C_{16:1n7}$, $C_{17:1n7}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1n9}$, $C_{18:1n7}$, $C_{20:0}$, $C_{20:1n9}$ |
| 2003 | $T^2 = 1031,24$; $F_{(15,87)} = 59,220$ $p < 0,0000$ | $T^2 = 1580,39$; $F_{(15,87)} = 90,755$ $p < 0,0000$ | ----- |

Triângulo inferior: valores de F_{obs} (Hotelling T^2) e nível de significância; triângulo superior: AG para os quais os valores de t_{obs} são significativos ($p < 0,05$).

De modo a ter uma imagem global das diferenças existentes, efectuou-se uma análise discriminante (DA) "forward stepwise" de modo a seleccionar os AG mais discriminantes. Para a realização desta análise, os dados foram agrupados por ano de produção e, devido ao facto de faltarem demasiados valores para a variável $C_{15:0}$ (uma vez que este composto não foi detectado em várias amostras), retirou-se este AG da análise. Foram seleccionados seis AG como sendo os mais discriminantes, com base nos quais se realizou uma análise de variáveis canónicas (CVA), a qual permitiu construir o gráfico apresentado na Figura 3.4. O gráfico obtido condensa as informações resultantes das DA e CVA, estando representada 90% da informação contida nos dados na primeira dimensão (variável canónica 1) enquanto os restantes 10% são representados na segunda dimensão (variável canónica 2). Constatou-se que, na primeira dimensão, o ano 2003 se separa dos restantes, reflectindo o facto de as amostras de avelãs colhidas neste ano apresentarem teores superiores dos ácidos $C_{18:1n7}$, $C_{18:0}$ e $C_{14:0}$. A segunda dimensão expressa o facto de, na generalidade, o óleo das avelãs colhidas em 2001 apresentar teores superiores de $C_{18:0}$ e inferiores de $C_{16:1n7}$, $C_{20:0}$ e $C_{20:1n9}$ quando comparadas com as avelãs obtidas em 2002.

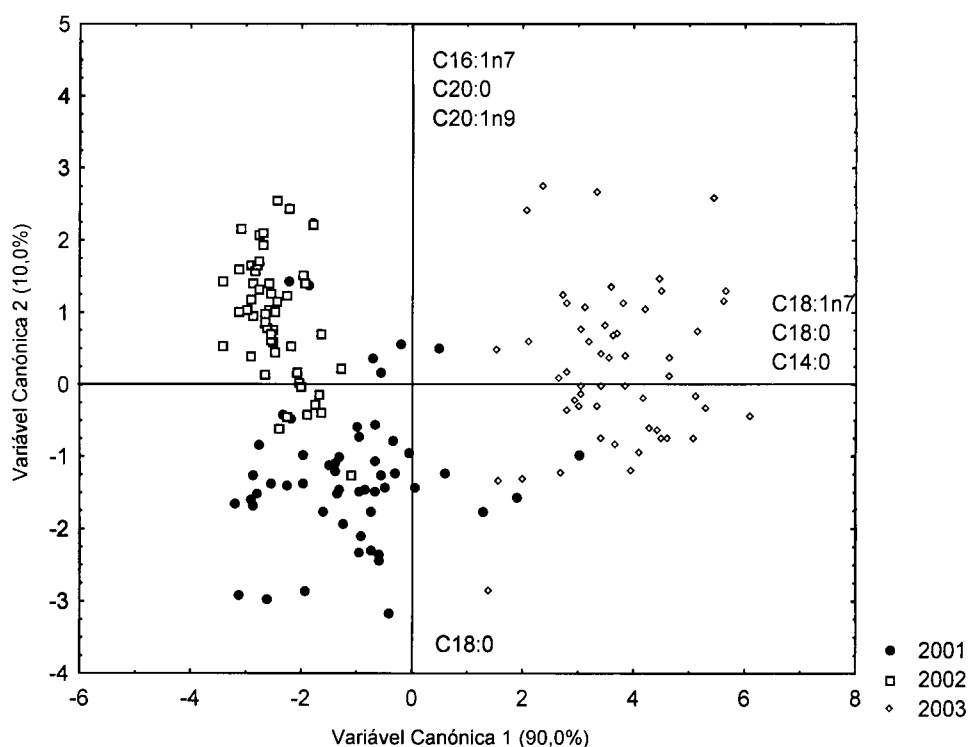


FIGURA 3.4. Resultados da CVA relativa à composição em AG da fracção lipídica da avelã, tendo o ano como factor agrupante e realizada com base nas variáveis seleccionadas mediante a DA (as percentagens referem o total da informação explicada por cada dimensão canónica).

Verifica-se que a variável canónica 1 (CV_1) representa uma percentagem da variância dos dados muito superior à variável canónica 2 (CV_2), o que significa que as diferenças entre os

grupos são explicadas sobretudo pela CV_1 , isto é, pelos teores em ácidos vacénico, esteárico e mirístico. A primeira dimensão diferencia sobretudo o ano 2003 dos anos 2001 e 2002, ao passo que estes dois últimos se diferenciam sobretudo na segunda dimensão. Como se pode constatar na Figura 3.4, o ano 2003 diferencia-se de 2001 e 2002, ao passo que estes dois são mais semelhantes entre si. Saliente-se ainda o facto de que estes resultados vão de encontro aos anteriormente referidos relativamente à análise dos dados por testes MANOVA, Hotelling T^2 e t -Student (Tabela 3.3).

Ainda por observação da Figura 3.4, verifica-se que os anos de produção são separados por AG que na sua maioria são minoritários. Uma vez que a DA se baseia numa matriz de distâncias entre grupos dividida por uma matriz de distâncias dentro dos grupos (em que as distâncias representam diferenças), a inversão da última tem tendência a favorecer as variáveis com menor importância (Naes e Indhal, 1998; Alves e Oliveira, 2004; Alves *et al.*, 2005). Desta forma, quando a DA nos mostra as fontes de variação dos dados, pequenas diferenças que ocorram a nível dos compostos minoritários poderão tornar-se estatisticamente mais relevantes e, desta forma, mesmo que possam existir diferenças a nível dos AG majoritários, os minoritários serão os escolhidos como sendo os de maior poder discriminante.

Considerando que para o trabalho apresentado nesta dissertação é de maior interesse prático verificar a ocorrência, ou não, de diferenças significativas em termos dos AG majoritários, aplicou-se a análise de componentes principais (PCA) aos mesmos dados, uma vez que esta análise nos permite realizar uma descrição parcimoniosa dos resultados. Obtiveram-se 5 componentes principais (PCs) com valores próprios superiores à unidade (eigen values >1), as quais explicam 76,6% da variância dos dados. Para cada uma destas PCs, que representam grupos de variáveis correlacionadas entre si, escolheu-se um ou dois AG mais importantes nessa componente, para representar esse grupo de variáveis. A selecção foi feita mediante os valores apresentados na Tabela 3.4.

Partindo das seis variáveis atrás referidas como sendo as mais discriminantes, e com base nos valores apresentados na Tabela 3.4, seleccionou-se um grupo de AG de forma a representar as diversas PCs seleccionadas, e procurando substituir os AG minoritários escolhidos pela DA por outros majoritários que com eles se relacionem nas diferentes PCs. Desta forma, manteve-se a escolha dos AG $C_{18:0}$ e $C_{18:1n7}$, uma vez que ambos foram seleccionados na DA e são altamente representativos relativamente a PC_1 e PC_3 , respectivamente. O $C_{14:0}$, muito representativo da PC_2 , foi substituído pelo $C_{18:1n9}$, uma vez que o primeiro é um AG minoritário e o segundo é majoritário, sendo também muito representativo na mesma componente. Tendo-se verificado que o AG $C_{16:0}$ é simultaneamente representativo da PC_1 e PC_2 , optou-se pela sua inclusão no grupo de variáveis seleccionadas. Relativamente aos restantes três AG seleccionados na DA, $C_{20:0}$, $C_{20:1n9}$ e $C_{16:1n7}$, optou-se pela sua exclusão, uma vez que todos eles pertencem a PCs já representadas por AG majoritários. Uma vez que nenhum dos AG seleccionados na DA são

muito representativos nas PC₄ e PC₅, que os AG mais representativos em ambas as referidas PCs são todos eles AG com teor ainda inferior ao dos AG minoritários seleccionados pela DA e, considerando que a percentagem de variância explicada por estas PCs é inferior às três primeiras, optou-se por não seleccionar nenhum destes AG. Desta forma, seleccionou-se um grupo de quatro AG (C_{18:0}, C_{18:1n9}, C_{16:0} e C_{18:1n7}), todos eles maioritários, e representativos de três PCs (PC₁, PC₂ e PC₃), as quais no total representam 57,5 % da variância total dos dados.

TABELA 3.4. Correlações entre as variáveis iniciais (AG) e componentes principais (PC), e importância das PC seleccionadas, verificadas na PCA relativa à composição em AG da avelã.

| Variável | PC ₁ | PC ₂ | PC ₃ | PC ₄ | PC ₅ |
|---------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| C _{14:0} | -0,047781 | 0,741292 | -0,194965 | 0,007100 | 0,265428 |
| C _{16:0} | -0,580081 | 0,574570 | 0,379417 | 0,366099 | 0,060185 |
| C _{16:1n7} | -0,292279 | 0,342473 | 0,701527 | 0,412608 | 0,040759 |
| C _{17:0} | -0,138428 | 0,512963 | -0,014047 | -0,527729 | 0,318448 |
| C _{17:1n7} | 0,600202 | 0,246388 | 0,466180 | -0,264161 | 0,311300 |
| C _{18:0} | -0,820819 | 0,025797 | -0,208104 | -0,113047 | -0,352280 |
| C _{18:1n9} | -0,376114 | -0,744537 | 0,153895 | -0,366392 | 0,203512 |
| C _{18:1n7} | -0,308932 | 0,324870 | -0,699368 | 0,387459 | 0,028508 |
| C _{18:2n6} | 0,808495 | 0,438562 | 0,027629 | 0,163759 | -0,133586 |
| C _{20:0} | -0,766870 | 0,385960 | -0,019989 | -0,330407 | -0,209075 |
| C _{20:1n9} | 0,453113 | 0,330081 | -0,593734 | -0,192888 | 0,108645 |
| C _{18:3n3} | 0,392401 | 0,301448 | 0,074810 | -0,153885 | -0,631237 |
| C _{22:0} | -0,157492 | 0,477994 | 0,216227 | -0,531349 | -0,156370 |
| C _{21:1n9} | 0,291838 | -0,060721 | 0,140974 | -0,047199 | -0,567258 |
| Valor Próprio | 3,425270 | 2,754603 | 1,873643 | 1,431182 | 1,258438 |
| Variância | 24,4662 | 19,6757 | 13,3832 | 10,2227 | 8,9888 |
| Total (%) | | | | | |

A negrito encontram-se as correlações com maior valor absoluto dentro de cada PC.

Subsequentemente, executou-se uma nova CVA com as variáveis seleccionadas através da PCA, obtendo-se o gráfico apresentado na Figura 3.5, no qual a CV₁ representa 98,5% das informações contidas nos dados, enquanto que apenas 1,5% estão representados na segunda dimensão (CV₂). Neste gráfico pode-se constatar que a separação entre os anos não é tão clara como no gráfico anterior (Figura 3.4), justificando desta forma a inclusão dos AG minoritários na DA “forward-stepwise” inicial, uma vez que estes apresentam um maior poder discriminante comparativamente aos AG maioritários.

Pela análise dos dados apresentados nas Figuras 3.4 e 3.5 e na Tabela 3.3, pode verificar-se a coerência dos resultados obtidos. Verifica-se que o AG com maior poder discriminante é o ácido vacénico e que apesar de os ácidos palmítico, esteárico e oleico também contribuírem nas discriminação dos anos, principalmente entre 2001 e 2002, a sua

importância é mínima, pois a CV_2 representa apenas 1,5% da variância dos dados. Desta forma conclui-se que, apesar de se verificarem diferenças significativas entre os três anos de colheitas, estas são fundamentalmente explicadas pelos teores em ácido vacénico e outros compostos minoritários.

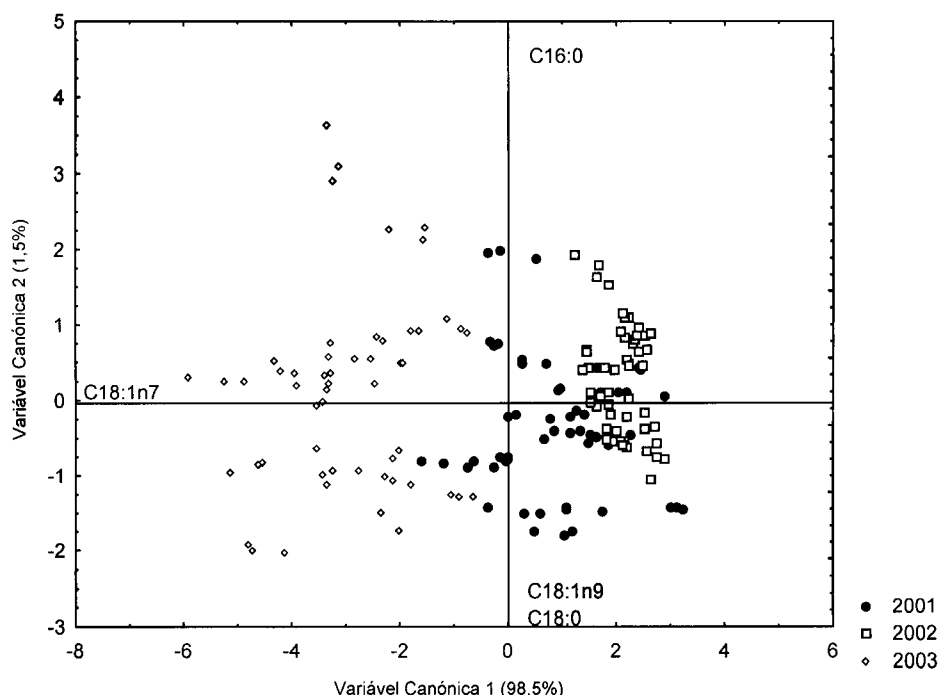


FIGURA 3.5. Resultados da CVA relativa à composição em AG da avelã, tendo o ano como factor agrupante e realizada com base nas variáveis seleccionadas mediante a PCA.

Os resultados obtidos sugerem que a composição em AG poderá ser influenciada por factores climáticos, uma vez que se observam diferenças em diferentes anos de produção, quando consideradas as mesmas cultivares, crescidas no mesmo campo experimental e submetidas a práticas agrícolas idênticas. Refira-se contudo que, no que diz respeito aos AG maioritários $C_{18:1n9}$, $C_{18:2n6}$ e $C_{16:0}$, a nível prático, as diferenças existentes parecem ser modestas, verificando-se valores médios relativamente estáveis ao longo dos três anos considerados.

As diferenças encontradas entre anos de produção poderão estar relacionadas com diferenças climáticas entre os anos estudados. Segundo os dados do Instituto Português de Meteorologia, o ano de 2003 caracterizou-se por um Verão muito quente (principalmente os meses de Julho e Agosto), tendo sido o segundo Verão mais quente em Portugal desde 1931 (IPM, 2005). Segundo a definição de onda de calor da Organização Mundial de Meteorologia, Portugal sofreu uma onda de calor com duração de 16 a 17 dias, verificada entre 29 de Julho e 15 de Agosto (IPM, 2005). Em Vila Real, o mês de Agosto de 2003 foi muito quente, apresentando temperaturas máximas e médias superiores às verificadas em 2001 e 2002; a

humidade relativa máxima do ar foi também superior em Julho de 2003, quando comparada com os outros dois anos em estudo. Entre 2001 e 2002 também se verificaram algumas diferenças climáticas, apesar de não serem tão notórias quanto as verificadas em 2003. As principais diferenças verificadas entre 2001 e 2002 relacionam-se com a humidade relativa máxima do ar (superior em Agosto de 2002), com as temperaturas máximas (inferiores em Maio de 2002) e principalmente com as temperaturas mínimas, que comparativamente a 2001 foram inferiores nos meses de Janeiro a Junho e também durante o mês de Agosto de 2002 (ver anexo). Desta forma, poder-se-á hipotetizar que as diferenças observadas em termos da composição em AG do óleo de avelã, mais notórias no ano 2003, poderão estar relacionadas com as temperaturas superiores atingidas no referido ano.

Parcerisa *et al.* (1998), num trabalho relativo à caracterização de várias cultivares de avelãs crescidas no mesmo campo em Oregon, USA, no qual foram identificados e quantificados oito AG, referiram que uma análise DA com os diferentes AG como variáveis agrupava as cultivares de avelãs segundo a sua origem (Turquia, Espanha, Itália e USA). No presente trabalho, realizou-se uma abordagem idêntica, utilizando os diferentes AG como variáveis. Apesar de todas as amostras estudadas serem provenientes de árvores cultivadas em Portugal, as diversas cultivares em estudo são nativas de diferentes países. Desta forma, considerou-se a existência de quatro grupos, segundo a origem das cultivares em estudo (Bergougnoux *et al.*, 1978): USA (cvs. Butler, Ennis e Lansing), Itália (cvs. Campanica, Round du Piemont, Santa Maria de Jesus e Tonda di Giffoni), Espanha (cvs. Couplat, Grossal, Morell, Negreta e Pauetet) e um grupo denominado como "Outras", compreendendo uma cultivar de origem Francesa (cv. Fertille de Coutard), cultivares Inglesas (cvs. Cosford, Daviana, Longue d'Espanha) e Alemãs (cvs. Gunslebert and Merveille de Bollwiller).

Com o intuito de verificar a existência de diferenças significativas entre os referidos grupos, seguiu-se o mesmo modelo de análise referido para os anos de produção. Desta forma, obteve-se o gráfico representado na Figura 3.6A, no qual a CV_1 e a CV_2 representam, respectivamente, 73,6% e 25,2% da informação contida nos dados. A CV_2 diferencia os grupos segundo os seus teores de ácidos palmítico e linoleico, ao passo que na CV_1 a separação ocorre segundo os teores de ácido linoleico e de três AG minoritários, $C_{14:0}$, $C_{22:0}$ e $C_{21:1n9}$. Apesar dos grupos não estarem perfeitamente separados, podem ser apontadas algumas diferenças gerais. A deficiente separação entre grupos poder-se-á dever ao facto da variabilidade dentro dos grupos ser provavelmente grande (quer devido ao facto de se agruparem diferentes cultivares, quer pelo facto de se considerarem os resultados de três anos), o que poderá mascarar as diferenças entre os grupos. Verifica-se que, de um modo geral, as cvs. de origem Espanhola e Italiana parecem ser mais similares entre si, apresentando ambas teores tendencialmente inferiores de $C_{18:2n6}$, $C_{22:0}$ e $C_{14:0}$, comparativamente às cvs. de origem Americana, Alemã, Francesa e Inglesa. Como referido anteriormente, os teores em $C_{14:0}$ estão inversamente correlacionados com os teores em

$C_{18:1n9}$ e daí que se possa inferir que as cvs. Espanholas e Italianas apresentem, tendencialmente, teores superiores neste AG. Algumas das amostras pertencentes ao grupo de cultivares americanas apresentam teores superiores em ácido palmítico comparativamente às demais amostras. Pode constatar-se ainda que a maioria das cultivares pertencentes ao agrupamento denominado como “Outras” apresentam geralmente valores superiores de ácido linoleico. Sabe-se actualmente que em várias sementes, tais como girassol, linhaça e colza, o grau de insaturação dos AG é inversamente proporcional às temperaturas que ocorrem durante a maturação das sementes (Fieldsend e Morrison, 2000). Com base neste conhecimento poder-se-á hipotetizar que os teores superiores em ácido linoleico apresentados pelas cultivares pertencentes ao grupo “Outras” poderá ser a manifestação de uma característica genética traduzindo uma adaptação destas cultivares, ao longo de inúmeras gerações, aos climas mais frios que se fazem sentir nos países referidos.

Seguindo a abordagem estatística anteriormente referida, repetiu-se a mesma análise, agora utilizando as variáveis seleccionadas nas DA e PCA, nomeadamente a variável $C_{18:2n6}$ (segundo AG maioritário) representativa da PC_1 , $C_{18:1n9}$ representativo da PC_2 (em substituição de $C_{14:0}$), a variável $C_{16:0}$ (moderadamente representativa em ambas as componentes PC_1 e PC_2), e as variáveis $C_{22:0}$ e $C_{21:1n9}$ (representativas das PC_4 e PC_5 , respectivamente). Estes dois últimos AG foram seleccionados apesar de serem minoritários, uma vez que são importantes nas referidas PCs, não havendo qualquer outro AG maioritário igualmente representativo que os possa substituir. Com base nas variáveis seleccionadas ($C_{18:2n6}$, $C_{18:1n9}$, $C_{18:1n7}$, $C_{16:0}$, $C_{22:0}$ e $C_{21:1n9}$) realizou-se uma CVA, com resultados em tudo semelhantes aos apresentados na Figura 3.6A, pelo que não foi incluído o respectivo gráfico. Ainda com base nas variáveis seleccionadas, procedeu-se a CVA individuais relativamente aos resultados obtidos para cada ano de produção, de forma a eliminar este factor de variação. Os resultados foram semelhantes aos apresentados na Figura 3.6A e estão apresentados nas Figuras 3.6B, 3.6C e 3.6D. Para além de se verificarem as tendências referidas, constata-se que em 2001 existe uma grande dispersão de resultados intra-grupo, qualquer que seja o grupo considerado, dispersão esta que, à excepção do grupo de cultivares americanas, se mantém em 2002. Em 2003 verifica-se que as cultivares Italianas e Espanholas se sobrepõem, sendo claramente distintas das cultivares americanas, as quais por sua vez são distintas das cultivares agrupadas sob a designação “Outras”. No grupo de cultivares americanas verifica-se uma grande dispersão de resultados, havendo uma cultivar que claramente se distingue das restantes duas.

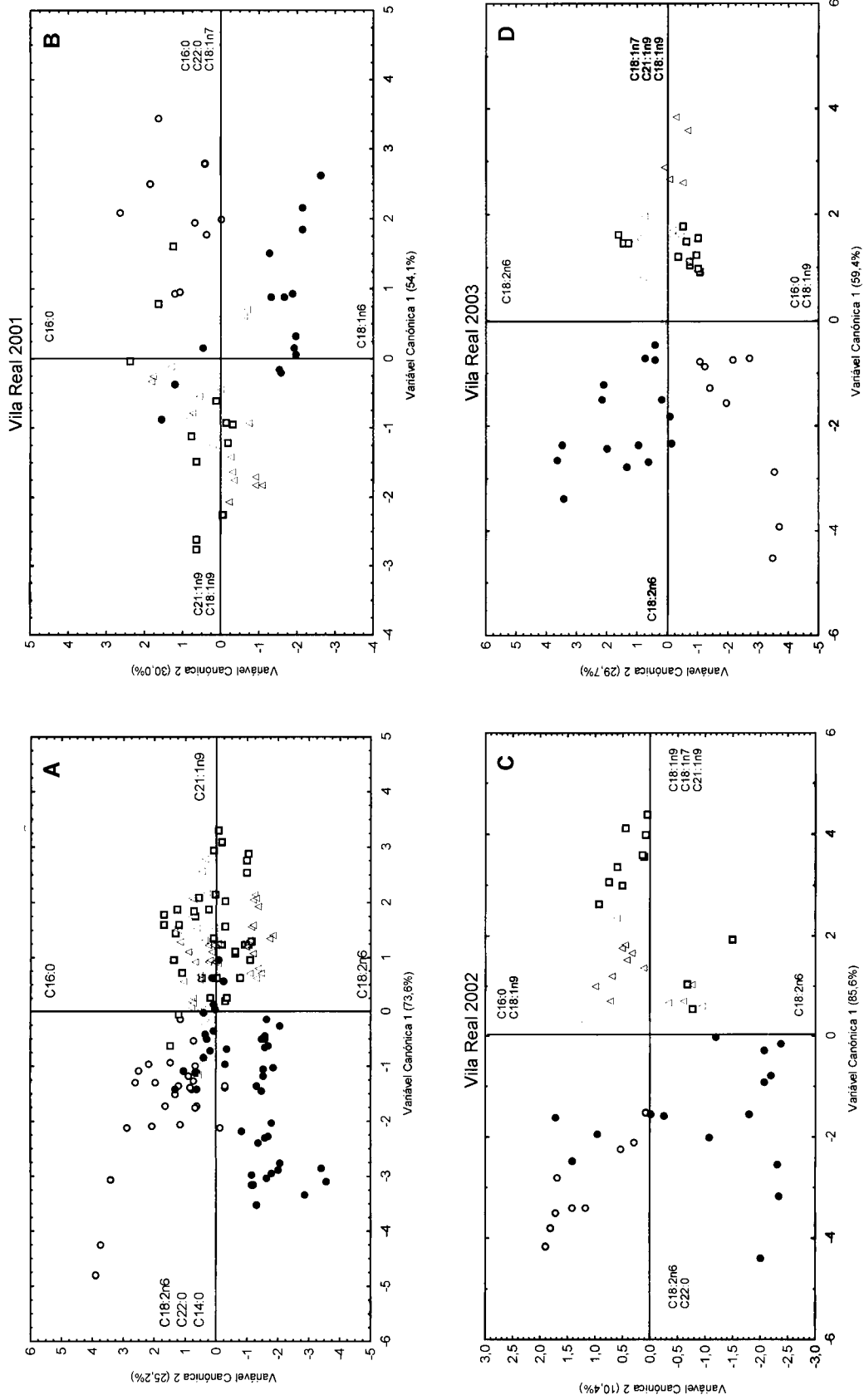


FIGURA 3.6. Resultados da CVA relativa à composição em AG da avelã, tendo a origem das cultivares como factor agrupante e realizada com base nas variáveis seleccionadas mediante a DA (figura A) e DA e PCA (figuras B, C e D). **A:** CVA considerando os dados referentes aos três anos de amostragem em Vila Real; **B:** CVA considerando apenas os dados referentes a 2001; **C:** CVA considerando apenas os dados referentes a 2002; **D:** CVA considerando apenas os dados referentes a 2003. Símbolos: ○:USA; □: Espanha; ●: "Outras"; △: Itália.

Relativamente ao factor “localização geográfica”, quando consideradas as mesmas cultivares, constata-se que, apesar de algumas amostras provenientes de Vila Real apresentarem teores em ácido vacénico ligeiramente superiores aos verificados em Felgueiras, a composição das amostras provenientes de Vila Real é muito similar aquela das amostras provenientes de Felgueiras (Figura 3.7). Desta forma o factor “localização geográfica” parece exercer uma influência desprezável no que diz respeito a variações da composição de AG em termos das suas percentagens relativas.

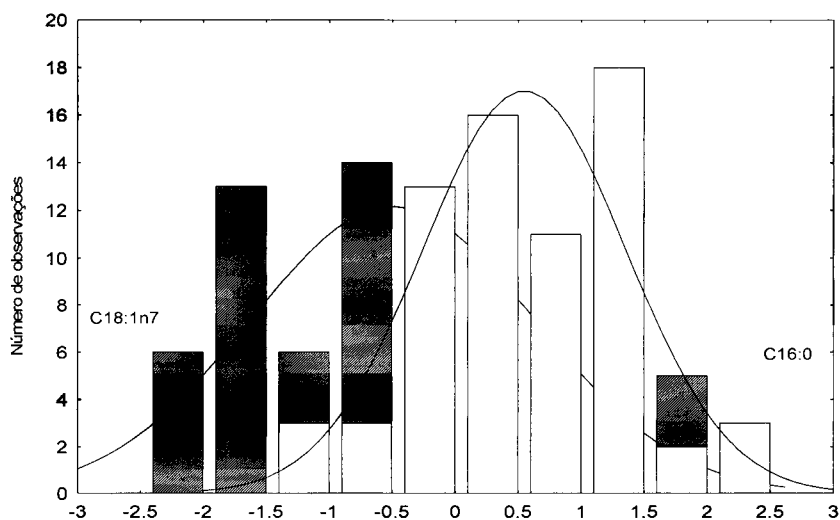


FIGURA 3.7. Resultados da CVA tendo a localização geográfica como factor agrupante.

▨ : Felgueiras; □ : Vila Real.

5.2 Nogueira

Na fracção lipídica da noz foram identificados e quantificados dezoito AG: C_{14:0}, C_{16:0}, C_{16:1n7}, C_{17:0}, C_{18:0}, C_{18:1n9t}, C_{18:1n9}, C_{18:1n7}, C_{18:2ct}, C_{18:2n6}, C_{20:0}, C_{18:3n6}, C_{20:1n9}, C_{18:3n3}, C_{20:2n6}, C_{22:0}, C_{22:2n6} e C_{20:5n3}.

A Figura 3.8 mostra um cromatograma característico, obtido com uma amostra de óleo noz e analisado segundo as condições experimentais descritas.

A Tabela 3.5 mostra os valores médios de cada AG obtidos para cada cultivar, ano de produção e localização geográfica em estudo.

Como se pode constatar pela análise dos valores da Tabela 3.5, apesar de existirem algumas diferenças quantitativas entre as amostras estudadas, na generalidade, as amostras apresentaram um perfil semelhante, uma vez que caracteristicamente apresentam os mesmos AG maioritários e minoritários.

TABELA 3.5. Composição em ácidos gordos (% relativa), teores de humidade e gordura total (%) e resistência à oxidação (R.O.) das cultivares de noz estudadas, por ano de produção e localização geográfica.

| Cultivar | Ácidos Gordos | | | | | | | | | | | | | SFA | MUFA | PUFA | R.O. (h) | Humidade (%) | Gordura (%) | | | |
|------------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-----------|-------------|--------------|-------------|-----------|-----------|-------------|
| | C14:0 | C16:0 | C16:1n7 | C17:0 | C18:0 | C18:1n7 | C18:1n9 | C18:2n6 | C18:2n6 ct | C18:2n6 | C18:3n6 | C20:0 | C18:3n3 | | | | | | | C20:2n6 | C22:0 | C22:2n6 |
| Ano: 2001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bragança | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Franquette | 0,03±0,00 | 7,48±0,02 | 0,05±0,00 | 0,04±0,00 | 2,43±0,00 | 0,02±0,00 | 0,02±0,00 | 16,99±0,04 | 1,53±0,04 | 0,08±0,00 | 0,06±0,00 | 0,19±0,00 | 11,69±0,02 | 0,07±0,00 | 0,05±0,00 | nd | 10,1 | 18,8 | 71,2 | 3,3 | 4,4±0,0 | 62,3±0,1 |
| Lara | 0,03±0,00 | 6,94±0,02 | 0,06±0,00 | 0,05±0,00 | 2,22±0,01 | 0,02±0,00 | 14,26±0,02 | 1,29±0,04 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,05±0,01 | 0,18±0,01 | 12,16±0,02 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,01±0,00 | 9,3 | 15,8 | 74,9 | 2,8 | 4,0±0,3 | 66,5±0,0 |
| Marbot | 0,02±0,00 | 7,14±0,01 | 0,08±0,00 | 0,05±0,00 | 2,77±0,01 | 0,02±0,00 | 16,51±0,08 | 1,26±0,06 | 0,09±0,01 | 0,08±0,00 | 0,07±0,01 | 0,19±0,00 | 12,74±0,01 | 0,06±0,01 | 0,04±0,01 | 0,02±0,00 | 10,1 | 18,1 | 72,0 | 3,0 | 3,5±0,1 | 66,3±0,1 |
| Mayette | 0,03±0,00 | 7,00±0,01 | 0,08±0,00 | 0,04±0,00 | 2,55±0,01 | 0,03±0,00 | 18,09±0,09 | 1,21±0,08 | 0,08±0,00 | 0,07±0,02 | 0,07±0,00 | 0,19±0,01 | 12,98±0,01 | 0,03±0,00 | 0,03±0,00 | 0,04±0,00 | 9,7 | 19,6 | 70,7 | 3,4 | 3,9±0,4 | 66,3±0,4 |
| Mellanaise | 0,03±0,00 | 7,02±0,01 | 0,07±0,00 | 0,05±0,00 | 2,65±0,03 | 0,02±0,00 | 14,49±0,12 | 1,24±0,08 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,17±0,00 | 12,51±0,00 | 0,03±0,00 | 0,04±0,00 | 0,03±0,00 | 9,9 | 16,0 | 74,0 | 3,2 | 4,3±0,0 | 63,0±0,4 |
| Parisienne | 0,03±0,00 | 6,32±0,00 | 0,07±0,00 | 0,04±0,00 | 2,41±0,01 | 0,02±0,00 | 17,45±0,06 | 1,11±0,06 | 0,07±0,00 | 0,03±0,00 | 0,03±0,00 | 0,22±0,00 | 9,64±0,01 | 0,04±0,00 | 0,03±0,00 | nd | 8,9 | 18,9 | 72,3 | 2,7 | 4,3±0,5 | 63,1±0,2 |
| Média | 0,03 | 6,98 | 0,07 | 0,05 | 2,51 | 0,02 | 16,30 | 1,27 | 0,07 | 60,31 | 0,07 | 0,19 | 11,95 | 0,05 | 0,04 | 0,02 | 9,7 | 17,9 | 72,5 | 3,0 | 4,1 | 64,6 |
| Varição | 0,02 - 0,03 | 6,32 - 7,48 | 0,05 - 0,08 | 0,04 - 0,05 | 2,22 - 2,77 | 0,02 - 0,03 | 14,26 - 18,09 | 1,11 - 1,53 | 0,04 - 0,09 | 57,46 - 62,50 | 0,06 - 0,08 | 0,03 - 0,07 | 9,64 - 12,98 | 0,03 - 0,07 | 0,03 - 0,05 | nd - 0,03 | 8,9 - 10,1 | 15,8 - 19,6 | 70,7 - 74,9 | 2,7 - 3,4 | 3,5 - 4,4 | 62,3 - 66,5 |
| Ano: 2002 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bragança | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Franquette | 0,03±0,00 | 6,85±0,09 | 0,09±0,00 | 0,06±0,00 | 3,02±0,08 | 0,03±0,00 | 22,03±0,51 | 0,78±0,01 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,22±0,00 | 10,45±0,09 | 0,02±0,00 | 0,05±0,00 | nd | 10,1 | 23,1 | 66,8 | 3,0 | 3,1±0,1 | 62,6±1,1 |
| Lara | 0,03±0,00 | 6,55±0,04 | 0,08±0,00 | 0,06±0,00 | 3,44±0,01 | 0,03±0,00 | 18,69±0,11 | 0,78±0,01 | 0,05±0,00 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,21±0,00 | 10,79±0,01 | 0,03±0,00 | 0,06±0,00 | nd | 10,3 | 19,8 | 70,0 | 3,4 | 3,3±0,0 | 66,9±0,6 |
| Marbot | 0,02±0,00 | 6,71±0,13 | 0,08±0,00 | 0,07±0,00 | 3,32±0,02 | 0,03±0,00 | 20,74±0,05 | 0,78±0,01 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,25±0,00 | 10,17±0,01 | 0,03±0,00 | 0,04±0,00 | nd | 10,3 | 21,9 | 67,9 | 3,3 | 5,2±0,2 | 65,2±0,2 |
| Mayette | 0,03±0,00 | 5,99±0,20 | 0,08±0,00 | 0,06±0,00 | 3,11±0,03 | 0,03±0,00 | 26,12±0,12 | 0,78±0,01 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,03±0,00 | 0,24±0,01 | 8,89±0,04 | 0,03±0,00 | 0,04±0,00 | nd | 9,3 | 27,2 | 63,3 | 3,5 | 4,3±0,1 | 64,1±0,5 |
| Mellanaise | 0,03±0,00 | 6,13±0,09 | 0,07±0,00 | 0,06±0,00 | 3,20±0,00 | 0,03±0,00 | 22,38±0,07 | 0,83±0,01 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,25±0,00 | 9,38±0,01 | 0,03±0,00 | 0,05±0,00 | nd | 9,6 | 23,6 | 66,9 | 4,5 | 4,7±0,1 | 63,6±0,3 |
| Parisienne | 0,03±0,00 | 6,19±0,01 | 0,07±0,00 | 0,06±0,00 | 3,54±0,00 | 0,03±0,00 | 25,08±0,02 | 0,73±0,01 | 0,04±0,00 | 0,03±0,00 | 0,03±0,00 | 0,24±0,00 | 8,53±0,00 | 0,02±0,00 | 0,04±0,00 | nd | 10,0 | 28,1 | 63,9 | 3,8 | 5,0±0,1 | 65,7±0,4 |
| Média | 0,03 | 6,40 | 0,08 | 0,06 | 3,27 | 0,03 | 22,51 | 0,78 | 0,04 | 56,61 | 0,12 | 0,24 | 9,70 | 0,03 | 0,05 | - | 9,9 | 23,6 | 66,5 | 3,6 | 4,3 | 64,7 |
| Varição | 0,02 - 0,03 | 5,99 - 6,85 | 0,07 - 0,09 | 0,06 - 0,07 | 3,02 - 3,54 | 0,03 - 0,03 | 18,69 - 26,12 | 0,73 - 0,83 | 0,04 - 0,05 | 54,28 - 59,06 | 0,11 - 0,13 | 0,03 - 0,04 | 9,21 - 10,79 | 0,02 - 0,03 | 0,04 - 0,06 | - | 9,3 - 10,3 | 19,8 - 27,2 | 63,3 - 70,0 | 3,0 - 4,5 | 3,1 - 5,2 | 62,6 - 66,9 |
| Ano: 2003 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bragança | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Franquette | 0,03±0,00 | 7,74±0,04 | 0,11±0,00 | 0,06±0,00 | 2,52±0,01 | 0,03±0,00 | 18,60±0,03 | 1,32±0,01 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,20±0,00 | 11,94±0,01 | 0,02±0,00 | 0,03±0,00 | nd | 10,4 | 20,3 | 69,3 | 3,0 | 3,1±0,1 | 65,9±0,0 |
| Lara | 0,08±0,00 | 6,82±0,07 | 0,07±0,00 | 0,06±0,00 | 3,09±0,03 | 0,08±0,00 | 15,06±0,04 | 0,88±0,02 | 0,05±0,00 | 0,05±0,00 | 0,05±0,00 | 0,22±0,01 | 13,73±0,02 | 0,03±0,00 | 0,04±0,00 | nd | 10,2 | 16,3 | 73,5 | 2,6 | 3,3±0,0 | 66,2±1,0 |
| Marbot | 0,04±0,00 | 6,91±0,05 | 0,08±0,00 | 0,06±0,00 | 3,02±0,01 | 0,03±0,00 | 16,10±0,01 | 0,91±0,01 | 0,05±0,00 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,21±0,01 | 12,21±0,02 | 0,02±0,00 | 0,03±0,00 | nd | 10,1 | 17,3 | 72,6 | 2,9 | 5,2±0,2 | 65,3±0,0 |
| Mayette | 0,03±0,00 | 7,46±0,05 | 0,09±0,00 | 0,06±0,00 | 2,84±0,02 | 0,02±0,00 | 15,16±0,02 | 1,28±0,01 | 0,05±0,00 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,24±0,01 | 12,67±0,02 | 0,03±0,00 | 0,04±0,00 | nd | 10,5 | 16,8 | 72,7 | 3,2 | 4,3±0,1 | 63,9±0,1 |
| Mellanaise | 0,04±0,00 | 6,92±0,08 | 0,08±0,00 | 0,07±0,00 | 2,82±0,00 | 0,03±0,00 | 18,08±0,03 | 0,97±0,01 | 0,05±0,00 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,25±0,01 | 11,85±0,00 | 0,03±0,00 | 0,05±0,00 | nd | 10,0 | 19,4 | 70,7 | 2,9 | 4,7±0,1 | 63,8±0,7 |
| Parisienne | 0,03±0,00 | 7,26±0,04 | 0,12±0,00 | 0,06±0,00 | 2,54±0,01 | 0,02±0,00 | 22,15±0,03 | 1,51±0,01 | 0,04±0,00 | 0,03±0,00 | 0,03±0,00 | 0,21±0,00 | 9,29±0,01 | 0,02±0,00 | 0,03±0,00 | nd | 10,0 | 24,0 | 66,0 | 3,9 | 5,0±0,1 | 66,8±0,5 |
| Média | 0,04 | 7,19 | 0,09 | 0,06 | 2,80 | 0,04 | 17,52 | 1,14 | 0,05 | 58,71 | 0,07 | 0,22 | 11,95 | 0,02 | 0,04 | - | 10,2 | 19,0 | 70,8 | 3,1 | 4,3 | 65,7 |
| Varição | 0,03 - 0,08 | 6,82 - 7,74 | 0,07 - 0,12 | 0,06 - 0,07 | 2,52 - 3,09 | 0,02 - 0,08 | 15,06 - 22,15 | 0,88 - 1,51 | 0,04 - 0,05 | 56,63 - 60,20 | 0,06 - 0,10 | 0,03 - 0,05 | 9,29 - 13,73 | 0,02 - 0,03 | 0,03 - 0,05 | - | 10,0 - 10,5 | 16,3 - 24,0 | 66,0 - 73,5 | 2,6 - 3,9 | 3,1 - 5,2 | 63,8 - 68,2 |
| Colimbra | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Arco | 0,03±0,00 | 7,19±0,02 | 0,08±0,01 | 0,05±0,00 | 2,73±0,02 | 0,03±0,00 | 16,54±0,15 | 1,40±0,10 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,05±0,00 | 0,23±0,02 | 13,56±0,02 | 0,03±0,00 | 0,04±0,00 | nd | 10,1 | 18,3 | 71,7 | 3,3 | 4,0±0,1 | 67,8±0,4 |
| Franquette | 0,03±0,00 | 6,57±0,02 | 0,06±0,00 | 0,05±0,00 | 2,92±0,01 | 0,02±0,00 | 16,51±0,02 | 1,30±0,02 | 0,05±0,00 | 0,03±0,00 | 0,03±0,00 | 0,22±0,00 | 11,10±0,01 | 0,03±0,00 | 0,04±0,00 | nd | 9,7 | 18,1 | 72,3 | 3,5 | 5,2±0,1 | 64,3±2,3 |
| Hartley | 0,04±0,00 | 7,71±0,02 | 0,11±0,00 | 0,05±0,00 | 2,79±0,01 | 0,02±0,00 | 17,52±0,05 | 1,57±0,05 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,19±0,01 | 12,51±0,01 | 0,02±0,00 | 0,03±0,00 | nd | 10,7 | 19,4 | 69,9 | 3,4 | 4,4±0,0 | 65,6±0,1 |
| Lara | 0,03±0,00 | 7,27±0,07 | 0,07±0,00 | 0,06±0,00 | 2,89±0,01 | 0,02±0,00 | 13,48±0,03 | 1,07±0,05 | 0,05±0,00 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,22±0,00 | 11,91±0,04 | 0,03±0,00 | 0,04±0,00 | nd | 10,4 | 14,9 | 74,8 | 3,4 | 4,7±0,0 | 66,3±0,1 |
| Mayette | 0,03±0,00 | 7,32±0,01 | 0,08±0,00 | 0,06±0,00 | 2,65±0,03 | 0,02±0,00 | 15,14±0,04 | 1,25±0,05 | 0,05±0,00 | 0,05±0,00 | 0,05±0,00 | 0,22±0,00 | 12,83±0,01 | 0,03±0,00 | 0,03±0,00 | nd | 10,2 | 16,7 | 73,2 | 3,6 | 4,3±0,1 | 64,0±0,3 |
| Mellanaise | 0,03±0,00 | 6,85±0,03 | 0,08±0,00 | 0,06±0,00 | 3,40±0,02 | 0,03±0,00 | 19,11±0,25 | 1,20±0,03 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,22±0,01 | 11,48±0,06 | 0,02±0,00 | 0,05±0,00 | nd | 10,5 | 20,6 | 69,0 | 5,1 | 5,1±0,1 | 64,7±0,5 |
| Parisienne | 0,04±0,00 | 6,89±0,07 | 0,09±0,00 | 0,05±0,00 | 2,70±0,01 | 0,03±0,00 | 19,09±0,01 | 1,31±0,01 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,04±0,00 | 0,25±0,02 | 10,93±0,01 | 0,02±0,00 | 0,04±0,00 | nd | 9,8 | 20,8 | 69,5 | 3,5 | 4,6±0,0 | 63,3±0,1 |
| Rago | 0,04±0,00 | 6,07±0,03 | 0,07±0,00 | 0,05±0,01 | 2,68±0,01 | 0,03±0,00 | 16,90±0,03 | 1,20±0,05 | 0,05±0,00 | 0,05±0,00 | 0,05±0,00 | 0,22±0,01 | 13,06±0,01 | 0,03±0,00 | 0,04±0,00 | nd | 9,0 | 18,4 | 72,7 | 3,2 | 4,5±0,0 | 67,9±0,1 |
| Média | 0,03 | 6,98 | 0,08 | 0,05 | 2,84 | 0,03 | 16,79 | 1,29 | 0,05 | 59,30 | 0,07 | 0,22 | 12,17 | 0,03 | 0,04 | - | 10,0 | 18,4 | 71,6 | 3,6 | 4,6 | 65,5 |
| Varição | 0,03 - 0,04 | 6,07 - 7,71 | 0,06 - 0,11 | 0,05 - 0,06 | 2,65 - 3,40 | 0,02 - 0,03 | 13,48 - 19,11 | 1,07 - 1,57 | 0,04 - 0,05 | 57,28 - 62,75 | 0,06 - 0,08 | 0,03 - 0,05 | 9,29 - 13,56 | 0,02 - 0,03 | 0,03 - 0,05 | - | 9,0 - 10,7 | 14,9 - 20,8 | 69,0 - 74,8 | 3,2 - 5,1 | 4,0 - 5,2 | 63,3 - 67,9 |

Média de três determinações; nd: não determinado; R.O.: resistência à oxidação.

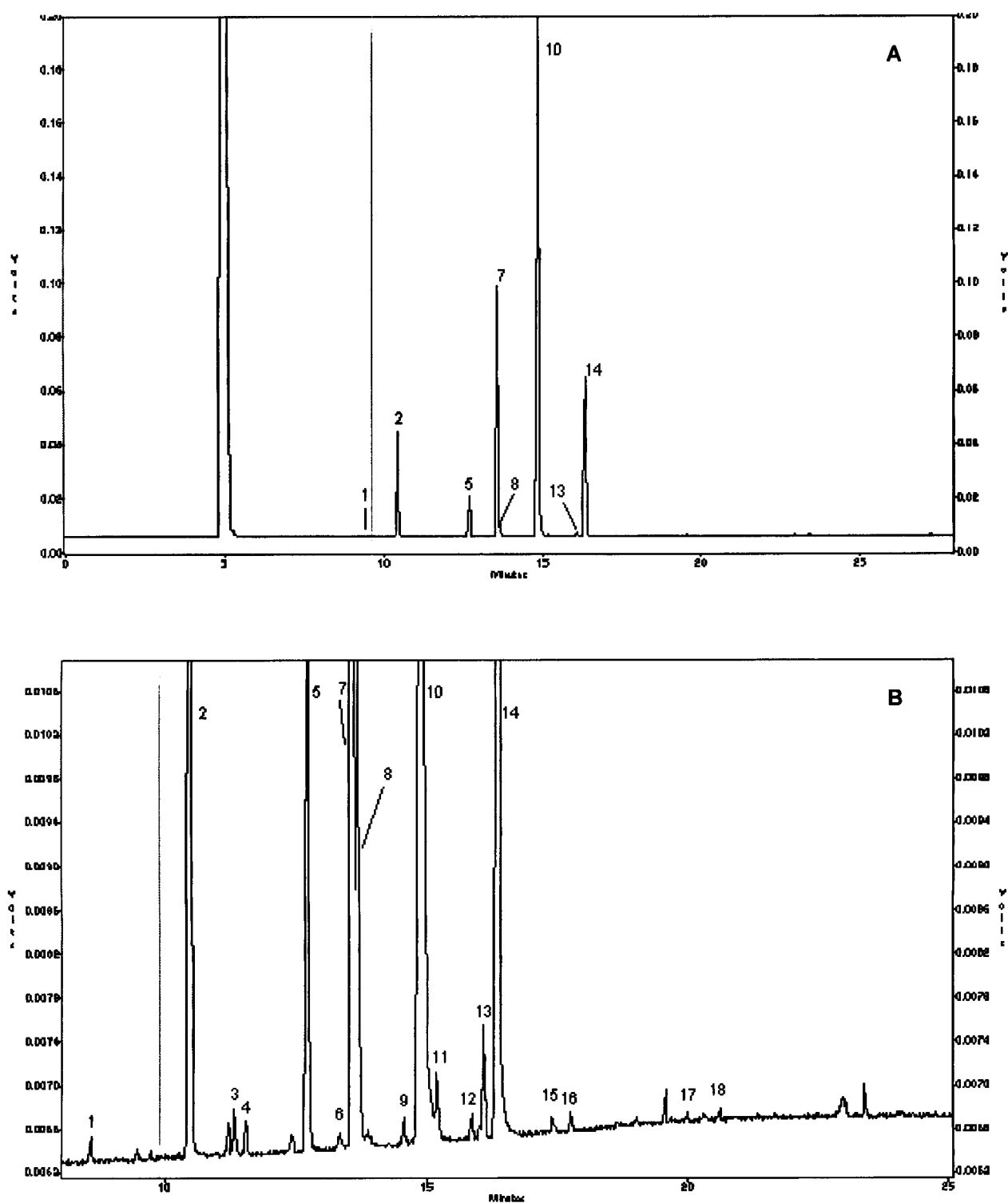


FIGURA 3.8: Cromatograma obtido por GC/FID representativo do perfil de AG de uma amostra de óleo de noz (A: perspectiva global, B: ampliação da imagem A). Picos: 1: $C_{14:0}$; 2: $C_{16:0}$; 3: $C_{16:1n7}$; 4: $C_{17:0}$; 5: $C_{18:0}$; 6: $C_{18:1n9i}$; 7: $C_{18:1n9}$; 8: $C_{18:1n7}$; 9: $C_{18:2ci}$; 10: $C_{18:2n6}$; 11: $C_{20:0}$; 12: $C_{18:3n6}$; 13: $C_{20:1n9}$; 14: $C_{18:3n3}$; 15: $C_{20:2n6}$; 16: $C_{22:0}$; 17: $C_{22:2n6}$; 18: $C_{20:5n3}$.

A maioria dos AG detectados no óleo de noz, havia já sido descrita por outros autores (Ruggeri *et al.*, 1998; Savage *et al.*, 1999; Zwarts *et al.*, 1999) mas, tanto quanto nos é dado saber, outros foram descritos pela primeira vez, nomeadamente os isómeros *trans*, C_{18:1n9t} e C_{18:2n6ct} e os ácidos C_{18:3n6}, C_{20:2n6}, C_{22:0}, C_{22:2n6} e C_{20:5n3}. Estes dois últimos foram detectados apenas em algumas amostras recolhidas no primeiro ano de estudos, o que nos leva a emitir uma palavra de cautela.

Em todas as amostras estudadas, o AG maioritário foi o ácido linoleico (cujo teor se situa entre 54,3 e 62,8%), seguido pelo oleico (entre 13,5 e 26,1%) e pelo α -linolénico (entre 8,5 e 13,7%). Para além destes três AG maioritários, apenas os ácidos palmítico, esteárico e vacénico apresentaram percentagens relativas superiores a 1%, tendo-se verificado teores abaixo deste valor para os restantes AG, em todas as amostras estudadas. Pela análise dos valores apresentados na Tabela 3.5 constata-se que o principal grupo de AG na fracção lipídica extraída das nozes são os PUFA (entre 63,3 e 74,9%), seguido dos MUFA (entre 14,9 e 27,2%) e por últimos os SFA (entre 8,9 e 10,7%). Em todas as amostragens realizadas, isto é, considerando os três anos de colheita e as duas localizações geográficas, a cv. Lara foi, consistentemente, a cultivar que apresentou valores inferiores de MUFA e superiores de PUFA, facto este que está directamente relacionado com os teores inferiores em ácido oleico e superiores em linoleico apresentados pela referida cultivar (Tabela 3.5).

Os valores de resistência à oxidação (R.O.) apresentados pelo óleo de noz foram muito inferiores aos determinados para o óleo de avelã, o que facilmente se compreende dado os teores, em muito superiores, de PUFA existentes no óleo de noz. As amostras colhidas no ano 2002 em Bragança apresentaram valores de R.O. tendencialmente superiores comparativamente aos restantes anos, o que poderá estar relacionado com a ocorrência de valores ligeiramente inferiores de PUFA e superiores de MUFA nesse ano.

De forma a verificar a existência, ou não, de diferenças significativas entre anos de produção, cultivares e localizações geográficas, realizou-se a análise estatística dos dados. Iniciou-se a análise pela avaliação de diferenças significativas entre anos de produção. Para tal, utilizou-se o ano como factor agrupante e apenas foram considerados os resultados relativos à localização “Bragança”, sendo excluídas as variáveis C_{22:2n6} e C_{20:5n3}, uma vez que só foram detectadas em quatro cultivares e durante o primeiro ano de estudos. A Tabela 3.6 apresenta os resultados obtidos nos testes MANOVA, Hotelling T^2 e *t*-Student. Verificam-se diferenças significativas entre qualquer par de grupos comparado, indicando diferenças significativas entre os diferentes anos de produção. Subsequentemente, efectuou-se uma análise discriminante “forward-stepwise” de forma a seleccionar as variáveis mais discriminantes e, com base nestas, proceder à CVA dos dados. O gráfico de variáveis canónicas obtido encontra-se representado na Figura 3.9, no qual CV₁ e CV₂ expressam, respectivamente, 85,8% e 14,2 % da variância dos dados. Apesar de se constatar a

existência de três grupos claramente distintos, verifica-se que as variáveis que explicam essas diferenças são todas elas AG minoritários.

TABELA 3.6. Testes MANOVA, Hotelling T^2 e t -Student relativos às diferenças entre anos de produção em termos de AG do óleo de noz.

| RESUMO DO TESTE MANOVA | | | |
|---|--|---|--|
| Wilks'Lambda = 0,00115; F(32,72) = 64,227; p < 0.0000 | | | |
| RESUMO DOS TESTES HOTELLING T^2 E t -STUDENT | | | |
| | 2001 | 2002 | 2003 |
| 2001 | ----- | todos os AG | C14:0, C16:1n7, C17:0, C18:0 C18:1n9t, C18:2n6, C18:2n6cf, C20:1n9 |
| 2002 | $T^2 = 4274,92$; F(16,19) = 149,31 p < 0,00000 | ----- | todos os AG excepto: C17:0, C18:1n9t, C20:2n6 |
| 2003 | $T^2 = 3364,39$; F(16,19) = 117,51 p < 0,0000 | $T^2 = 1966,50$; F(16,19) = 68,683 p < 0,000000 | ----- |

Triângulo inferior: valores de F_{obs} (Hotelling T^2) e nível de significância; triângulo superior: AG para os quais os valores de t_{obs} são significativos (p < 0,05).

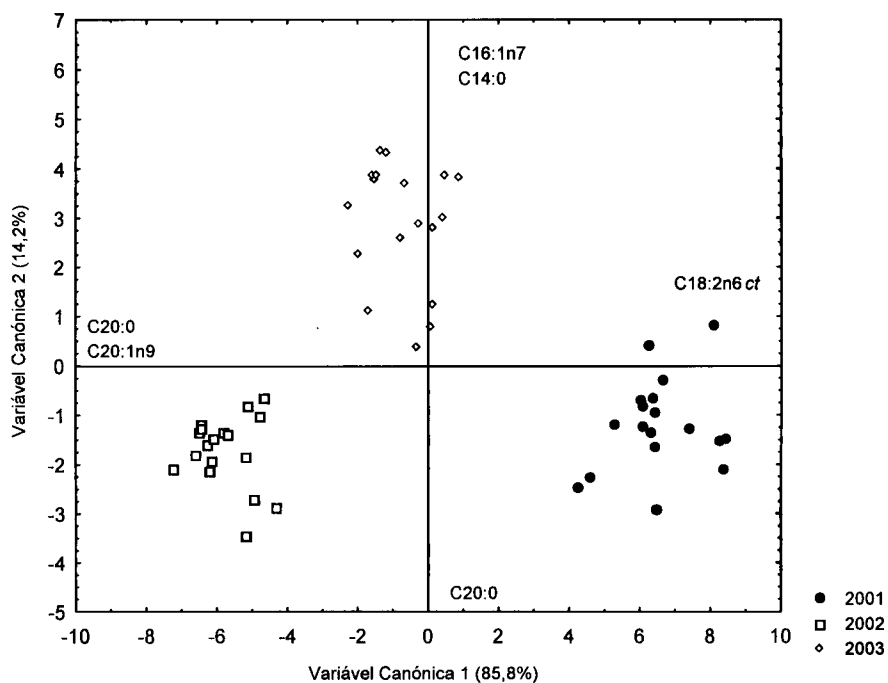


FIGURA 3.9. Resultados da CVA relativa à composição em AG do óleo de noz, tendo o ano como factor agrupante e realizada com base nas variáveis seleccionadas pela DA.

Pelos motivos anteriormente referidos para as sementes de avelleira, realizou-se uma PCA de forma a verificar a existência de correlações e seleccionar variáveis representativas das diferentes PCs, que simultaneamente sejam AG maioritários no óleo de noz. A Tabela 3.7 apresenta os valores mediante os quais foram seleccionadas as variáveis, tendo-se escolhido apenas os PCs com valores próprios superiores à unidade (eigen values >1). Como se pode observar pelos valores apresentados na Tabela 3.7, as quatro PCs escolhidas representam um total de 82,17 % da variância dos dados, sendo que mais de 50% da variância total é representada por apenas duas PCs.

TABELA 3.7. Correlação entre as variáveis iniciais (AG) e componentes principais (PC), e importância das PC seleccionadas, verificadas na PCA relativa à composição em AG da noz.

| Variável | PC ₁ | PC ₂ | PC ₃ | PC ₄ |
|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| C _{14:0} | 0,124713 | -0,737952 | 0,431521 | 0,406974 |
| C _{16:0} | 0,661444 | 0,085708 | 0,507975 | -0,455808 |
| C _{16:1n7} | -0,236946 | 0,383513 | 0,689028 | -0,393946 |
| C _{17:0} | -0,556760 | -0,323227 | 0,492316 | -0,395153 |
| C _{18:0} | -0,828392 | -0,373407 | -0,113788 | -0,070912 |
| C _{18:1n9t} | -0,104586 | -0,736793 | 0,417084 | 0,323141 |
| C _{18:1n9} | -0,837107 | 0,388161 | -0,145511 | -0,034173 |
| C _{18:1n7} | 0,801802 | 0,403253 | 0,203432 | -0,179276 |
| C _{18:2n6ct} | 0,654488 | -0,037790 | -0,419931 | -0,159281 |
| C _{18:2n6} | 0,717353 | -0,228367 | -0,052993 | 0,300931 |
| C _{20:0} | -0,826458 | -0,339383 | -0,339338 | -0,126993 |
| C _{18:3n6} | 0,703831 | -0,476934 | -0,212578 | -0,332760 |
| C _{20:1n9} | -0,823363 | -0,133005 | 0,179254 | -0,194674 |
| C _{18:3n3} | 0,725090 | -0,531397 | 0,241327 | -0,172651 |
| C _{22:2n6} | 0,431154 | -0,320569 | -0,526199 | -0,386149 |
| C _{22:0} | -0,372249 | -0,588946 | -0,251165 | -0,474396 |
| Valor Próprio | 6,51 | 2,94 | 2,18 | 1,51 |
| Variância | 40,68% | 18,40% | 13,63% | 9,45% |

A negrito encontram-se as correlações com maior valor absoluto dentro de cada PC.

Uma vez que a primeira componente principal, comparativamente às restantes, é altamente representativa da variância dos dados e tendo em conta que na DA foram seleccionados 3 AG com “loadings” (valores de correlação entre variáveis iniciais e PCs) elevados em PC₁, nomeadamente C_{20:0}, C_{18:2n6ct} e C_{20:1n9}, optou-se por manter três variáveis representativas de PC₁, com o cuidado de seleccionar AG maioritários com “loadings” igualmente elevados. Desta forma seleccionaram-se os AG C_{18:0}, C_{18:2n6} e C_{18:1n9}. Para além disso, seleccionou-se a variável C_{16:0} pois à semelhança de C_{16:1n7}, apresenta um valor elevado na PC₃, para além de apresentar ainda “loadings” consideráveis na PC₁, PC₃ e PC₄. Por último a variável C_{14:0} foi substituída por C_{18:3n3}, pois apesar de apresentar um “loading” inferior ao apresentado por C_{14:0} o seu valor é ainda considerável, sendo que as únicas variáveis com “loadings” superiores ao de C_{18:3n3} são apenas C_{18:1n9t} e C_{22:0}, ambos AG

minoritários. Após a escolha destas cinco variáveis, todas elas referentes a AG maioritários do óleo de noz, procedeu-se a uma nova análise CVA, tendo-se obtido o gráfico representado na Figura 3.10.

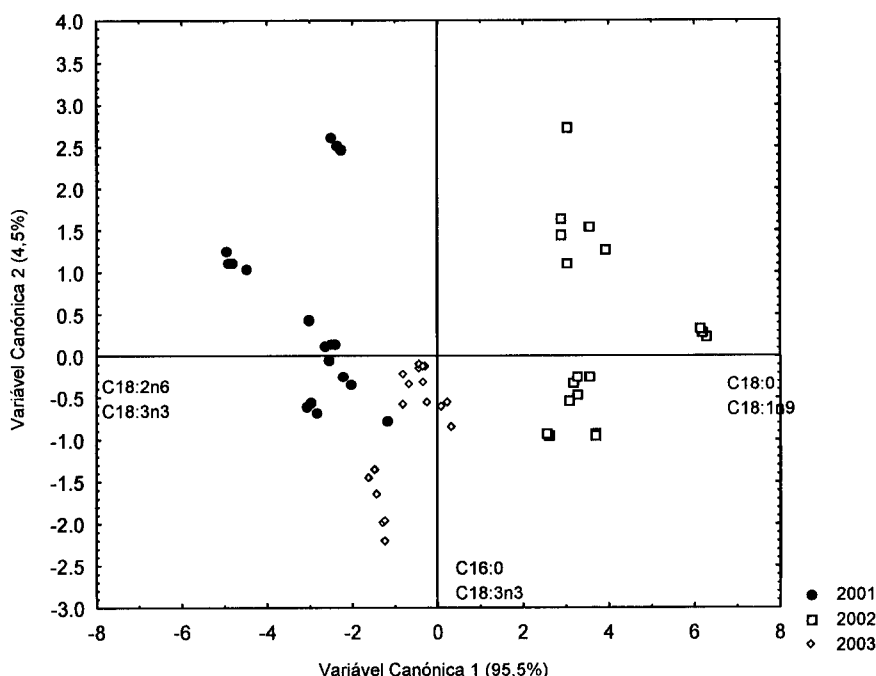


FIGURA 3.10. Resultados da CVA relativa à composição em AG do óleo de noz, tendo o ano como factor agrupante e realizada com base nas variáveis seleccionadas mediante a PCA.

Apesar das diferenças não serem tão evidentes comparativamente ao verificado na análise anterior (Figura 3.9), os três grupos continuam a apresentar claras diferenças entre si. Verifica-se que a CV_1 representa 95,5% da variância dos dados, significando que os teores relativos aos AG representados nesta componente são mais relevantes na diferenciação dos grupos do que os representados na CV_2 , a qual representa apenas 4,5% da variação dos dados. As amostras obtidas em 2002 são as que mais se diferenciam das restantes, ao passo que as amostras colhidas em 2001 e 2003 parecem ser mais semelhantes entre si. As amostras do ano 2002 apresentam simultaneamente teores mais elevados de $C_{18:0}$ e $C_{18:1n9}$ e inferiores de $C_{18:2n6}$ e $C_{18:3n3}$, verificando-se exactamente o oposto relativamente às amostras colhidas em 2001. O ano 2003, comparativamente aos restantes, apresenta teores intermédios de $C_{18:0}$, $C_{18:1n9}$, $C_{18:2n6}$ e $C_{18:3n3}$. Os três anos apresentam amostras com teores variáveis de $C_{16:0}$ e $C_{18:3n3}$, parecendo existir, em cada ano, um grupo de amostras com teores superiores dos referidos ácidos e um outro grupo de amostras com teores inferiores. Este dado parece indicar a possibilidade de algumas cultivares apresentarem, caracteristicamente, teores mais elevados de ácido α -linolénico, a ingestão do qual, como referido, está associado a benefícios para a saúde. Esta informação levou à verificação de diferenças significativas entre as diferentes cultivares.

Para o estudo das diferenças entre cultivares, procedeu-se de forma similar ao referido relativamente ao factor “ano de produção”. De forma idêntica, para esta análise foram apenas considerados os dados provenientes da localização geográfica Bragança. Os resultados dos testes Hotelling T^2 e t -Student obtidos podem ser observados na Tabela 3.8. Apesar de se verificarem diferenças significativas entre alguns dos pares de cultivares comparadas, nomeadamente entre os pares Franquette / Lara, Franquette / Mellanaise, Franquette / Parisienne, Lara / Mellanaise e Mayette / Parisienne, constata-se que em muitos dos casos considerados as cultivares são similares entre si ($p > 0,05$). Por vezes verifica-se que, ao comparar duas cultivares, apesar de existirem variáveis (AG) para as quais se obtiveram valores significativos no teste univariado de t -Student ($p < 0,05$), na globalidade essas mesmas cultivares não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$). Nestes casos os resultados obtidos na análise univariada do teste t -Student deverão ser considerados com cautela, pois poderão resultar de artifícios matemáticos.

TABELA 3.8. Resultados dos testes Hotelling T^2 , relativos a diferenças entre pares de cultivares de noqueira, e dos testes t -Student, relativos à significância das diferenças entre pares de cultivares para cada AG.

| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 |
|----|---|--|--|--|---|---|
| C1 | ----- | C _{16:0} , C _{18:1} , C _{18:2n6} , C _{20:2n6} | C _{16:0} , C _{18:0} , C _{18:2n6} | C _{14:0} , C _{20:2n6} | C _{16:0} | C _{16:0} , C _{18:3n6} , C _{18:3n3} , C _{22:0} |
| C2 | F _(16.1) = 21790 p < 0,00532 | ----- | C _{16:1n7} , C _{18:2n6} | C _{16:1n7} , C _{18:1n9} , C _{18:2n6} , C _{22:0} | C _{18:3n6} , C _{20:2n6} | C _{18:1n9} , C _{18:3n6} , C _{18:3n3} , C _{20:2n6} , C _{22:0} |
| C3 | F _(16.1) = 57,518 p < 0,10326 | F _(16.1) = 18,787 p < 0,17954 | ----- | C _{17:0} | - | C _{17:0} , C _{18:1n9} , C _{18:3n6} , C _{18:3n3} , C _{20:2n6} , C _{22:0} |
| C4 | F _(16.1) = 66,200 p < 0,09629 | F _(16.1) = 31,482 p < 0,13922 | F _(16.1) = 92,750 p < 0,08141 | ----- | C _{17:0} , C _{20:2n6} | C _{18:3n6} , C _{18:3n3} , C _{20:2n6} , C _{22:0} |
| C5 | F _(16.1) = 695,21 p < 0,02978 | F _(16.1) = 373,04 p < 0,04065 | F _(16.1) = 152,03 p < 0,06363 | F _(16.1) = 187,36 p < 0,05733 | ----- | C _{18:1n9t} , C _{18:3n6} , C _{18:3n3} , C _{22:0} |
| C6 | F _(16.1) = 313,37 p < 0,04435 | F _(16.1) = 186,18 p < 0,05752 | F _(16.1) = 53,146 p < 0,10739 | F _(16.1) = 2523,1 p < 0,01564 | F _(16.1) = 41,850 p < 0,12091 | ----- |

C1: Franquette, C2: Lara, C3: Marbot, C4: Mayette, C5: Mellanaise, C6: Parisienne; Triângulo inferior: valores de F_{obs} (Hotelling T^2); Triângulo superior: AG para os quais os valores de t_{obs} foram significativos no teste t -Student ($p < 0,05$).

Os AG que explicam as diferenças entre a cv. Franquette e as cvs. Lara, Mellanaise e Parisienne são, na sua maioria, maioritários entre os quais se observa a presença constante do ácido palmítico. Verifica-se ainda que o AG essencial α -linolénico é uma das variáveis que

permite explicar as diferenças encontradas entre a cv. Parisienne e as cvs. Franquette e Mayette. Apesar de, segundo os valores obtidos no teste Hotelling T^2 , a cv. Parisienne ser semelhante às cvs. Lara, Marbot e Mellanaise, pelo teste t -Student verifica-se que a primeira apresenta diferenças significativas em termos de ácido α -linoleico relativamente às restantes cultivares. Consultando os valores apresentados na Tabela 3.5 constata-se que de facto, a cv. Parisienne apresenta tendencialmente percentagens relativas deste composto inferiores às apresentadas pelas restantes cultivares.

Procedeu-se seguidamente a uma DA "forward-stepwise", com base nos AG maioritários seleccionados mediante a PCA, seguida de uma CVA. Obteve-se o gráfico apresentado na Figura 3.11, o qual demonstra que, apesar de em termos dos AG maioritários $C_{16:0}$, $C_{18:1n9}$, $C_{18:2n6}$ e $C_{18:3n3}$ se verificarem algumas diferenças entre as cultivares, não se observa a formação de grupos claramente distintos entre si.

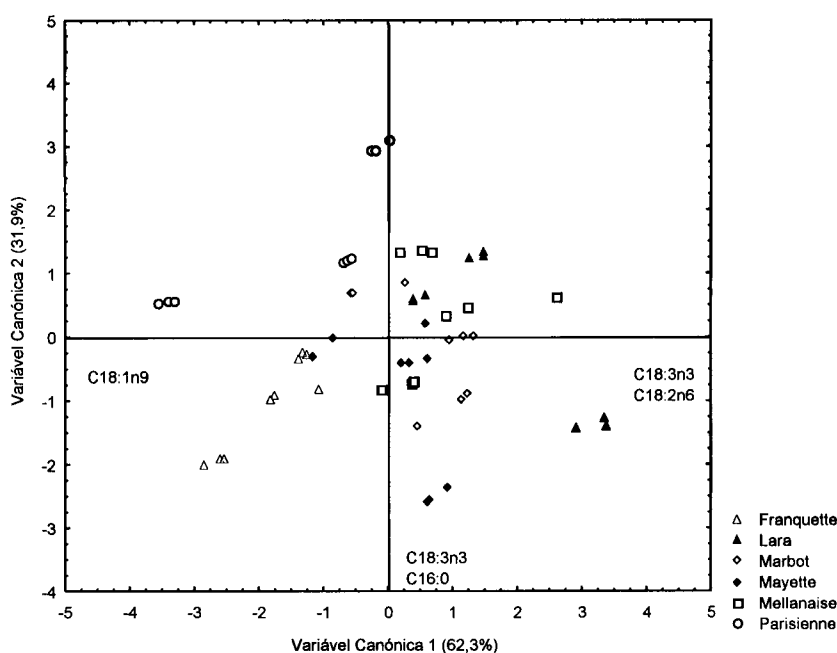


FIGURA 3.11. Resultados da CVA relativa à composição em AG da noz, tendo a cultivar como factor agrupante e realizada com base nos AG seleccionados pela PCA e DA.

Com o intuito de averiguar possíveis diferenças relacionadas com a localização geográfica das amostras, em 2003 foram analisadas amostras provenientes de outra localização (Coimbra). Para a avaliação de diferenças significativas relacionadas com este factor, apenas se consideraram os dados relativos às cultivares comuns às duas localizações. Inicialmente, efectuou-se uma DA "forward-stepwise", na qual se seleccionaram os AG com maior poder discriminante, nomeadamente $C_{17:0}$, $C_{16:1n7}$ e $C_{18:1n9t}$, com base nos quais se realizou uma CVA. O gráfico obtido demonstrou a existência de diferenças entre as duas localizações geográficas. No entanto, uma vez que as diferenças são explicadas em termos dos referidos AG minoritários, repetiu-se a análise, agora com base nos AG maioritários

seleccionados através da análise PCA. Apesar das diferenças serem mais nítidas na análise realizada com base nos AG minoritários, os dois gráficos são muito similares. Sendo a segunda análise de maior interesse prático, optou-se por apenas mostrar o gráfico referente à análise baseada nos AG majoritários (Figura 3.12). Neste gráfico constata-se que, apesar de existirem algumas similaridades entre amostras das duas localizações, isto é, de algumas amostras de ambas as localidades apresentarem composições em termos de AG semelhantes entre si, há um grupo de amostras provenientes de Coimbra que parecem apresentar valores tendencialmente superiores de ácido linoleico e inferiores de palmítico, oleico e α -linolénico.

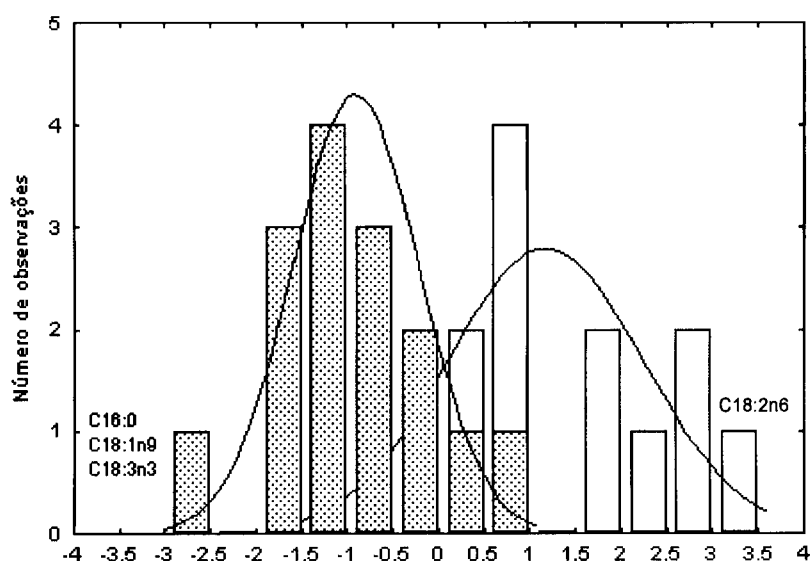


FIGURA 3.12. Resultados da CVA relativa à composição em AG da noz, tendo a localização geográfica como factor agrupante. : Bragança; : Coimbra.

6. CONCLUSÕES

Apesar de existir, actualmente, uma preocupação crescente, por parte da generalidade dos consumidores, relativamente ao consumo excessivo de alimentos com elevados teores lipídicos, não se pode esquecer que os AG desempenham funções de extrema importância no organismo e que determinados AG, considerados essenciais, têm obrigatoriamente que ser adquiridos através da dieta. Segundo os conselhos emitidos por entidades nacionais e internacionais, a gordura rica em AG saturados deverá ser preferencialmente substituída por gordura rica em AG insaturados. Qualquer dos frutos secos estudados, demonstrou ter um perfil em ácidos gordos aconselhável segundo as directrizes emitidas pelas referidas entidades.

Verificou-se que a avelã é um alimento rico em lípidos monoinsaturados, essencialmente

devido às elevadas percentagens de ácido oleico. Por sua vez, a noz revelou ser um alimento rico em AG polinsaturados, apresentando teores elevados de ácido linoleico e teores consideráveis de ácido α -linolénico.

Relativamente às amostras de óleo de avelã estudadas, após aplicação da análise estatística aos resultados obtidos, verificou-se que:

- Apesar de se verificarem diferenças significativas em termos da composição em AG (% relativas) do óleo de avelã entre os três anos de produção avaliados, o factor “ano de produção” parece não exercer uma influência importante. De entre os AG que explicam estas diferenças, o ácido vacénico foi o mais relevante. A composição em AG das amostras colhidas em 2001 e 2002 revelou mais semelhanças entre si, comparativamente às amostras colhidas em 2003, sendo que estas últimas se diferenciaram das primeiras principalmente no que diz respeito aos teores de ácido vacénico. Estas diferenças poderão estar relacionadas com as altas temperaturas que se fizeram sentir no Verão de 2003. Relativamente ao comportamento das amostras, ao longo dos anos estudados, no que respeita ao composto maioritário (o ácido oleico) e aos ácidos palmítico e esteárico (SFA maioritários), verificou-se uma grande dispersão de resultados. Apesar das diferenças existentes relativamente aos AG maioritários serem estatisticamente mais relevantes, a nível prático parecem ser muito modestas, verificando-se teores médios relativamente similares ao longo dos três anos considerados.
- Observou-se um perfil característico relativamente à composição em AG do óleo de avelã. No entanto, os resultados sugerem que os factores genéticos podem influenciar de forma significativa a referida composição, uma vez que se verificaram diferenças entre os grupos criados segundo as origens das cultivares. De uma forma geral, não se evidenciou a formação de grupos claramente distintos entre si, embora os resultados obtidos sugiram a existência de diferenças. Mais concretamente, as cultivares de origem Espanhola e Italiana parecem ter composições em AG mais similares entre si, apresentando percentagens tendencialmente superiores em ácido oleico e inferiores em ácido linoleico. De uma forma geral, as cultivares Americanas apresentam percentagens superiores de ácido palmítico. As cultivares agrupadas sob a designação “Outras” apresentam percentagens elevadas de ácido linoleico, comparativamente com as demais cultivares estudadas.
- De uma forma geral, as amostras estudadas provenientes das mesmas cultivares cultivadas em duas localizações geográficas diferentes, apresentaram composições semelhantes em AG.

Uma vez que, por motivos económicos e de semelhança de composição, o óleo de avelã é um dos óleos vegetais utilizado como adulterante do azeite, os dados obtidos neste trabalho poderão ser úteis em trabalhos posteriores relativos à avaliação da autenticidade de azeites. Comparando os valores obtidos com os descritos na literatura para a composição em AG (% relativa) de avelãs de proveniências variadas, parecem existir algumas diferenças, nomeadamente no que se refere às percentagens relativas de ácidos palmítico e linoleico. Os dados obtidos sugerem que o óleo de avelã apresenta teores de SFA tendencialmente inferiores aos apresentados por diferentes azeites.

Relativamente às amostras de óleo de noz estudadas, após aplicação da análise estatística aos resultados obtidos, verificou-se que:

- A composição percentual em AG variou significativamente ao longo dos três anos estudados. Uma vez que foram consideradas as mesmas cultivares, provenientes do mesmo campo de cultivo e recolhidas das mesmas árvores nos diferentes períodos de amostragem, pode inferir-se que as diferenças encontradas poderão estar relacionadas com as variações climáticas, naturalmente existentes de ano para ano. No entanto os dados climáticos disponíveis, não evidenciam variações climáticas significativas entre 2001, 2002 e 2003, que nos permitam hipotetisar um relação com as diferenças na composição em AG.
- Apesar de se observarem algumas diferenças entre determinados pares de cultivares, a generalidade das cultivares parece ser muito similar entre si em termos da composição média em AG. Desta forma, os resultados obtidos sugerem que os factores genéticos exercerão uma fraca influência na composição de AG do óleo de noz.
- De igual forma, os dados obtidos sugerem uma fraca influência por parte do factor localização geográfica, em termos da composição percentual em AG.

CAPÍTULO 4

PERFIL DE TRIACILGLICERÓIS

I. TRIACILGLICERÓIS. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

1. INTRODUÇÃO

A maioria das gorduras comercialmente importantes, vegetais ou animais, são maioritariamente constituídas por lípidos simples da classe dos triacilgliceróis (TAG). A função primordial dos TAG, quer nos animais quer nas plantas, é a de funcionarem como reservas energéticas. Na natureza, para além dos TAG, existem mono e diacilgliceróis, os quais são sobretudo intermediários da biossíntese dos TAG e doutros lípidos mas podem, alguns deles, funcionar como mensageiros celulares. Os monoacilgliceróis, à semelhança dos diacilgliceróis, existem nos alimentos frescos, em quantidades vestigiais. No entanto, durante o processo de digestão das gorduras, os TAG são transformados, por acção das lípases pancreáticas, originando 2-monoacilgliceróis que são, posteriormente, absorvidos a nível das células intestinais.

Na natureza estes compostos são sintetizados por sistemas enzimáticos específicos, sendo conhecidas três vias biossintéticas principais: a via do ácido fosfatídico (que ocorre sobretudo no fígado e tecido adiposo), a via dos monoacilgliceróis (que ocorre sobretudo nos intestinos) e uma terceira via envolvendo uma enzima específica (diacilglicerol transferase) que ocorre sobretudo nas plantas, principalmente a nível das sementes. Devido à especificidade destes sistemas enzimáticos, a composição em AG nas três posições da molécula de TAG não é inteiramente aleatória, o que parcialmente justifica as diferenças na composição em TAG entre a maioria das espécies, bem como a manutenção de uma certa consistência no perfil apresentado quando a mesma espécie é considerada. Os ácidos gordos que ocupam as três posições do glicerol podem ser distintos, e a sua análise pode indicar aspectos importantes sobre os processos biossintéticos que estiveram na base da sua produção.

Apesar de serem ainda poucos os dados disponíveis, alguns autores (Ruiz-Gutiérrez e Barron, 1995; Christie, 2005) referem que, para a generalidade dos óleos obtidos de sementes, a posição *sn2* dos TAG é bastante enriquecida em PUFA, enquanto que os SFA se encontram predominantemente distribuídos nas posições *sn1* e *sn3*, encontrando-se os MUFA equitativamente distribuídos pelas três posições.

A maioria dos TAG existentes nas gorduras naturais, quer de origem animal quer vegetal, tem na sua composição AG com um número par de átomos de carbono (sendo os mais abundantes os ácidos palmítico, oleico e linoleico). Os AG insaturados existem quase exclusivamente com configuração *cis*. As propriedades físico-químicas dos lípidos dependem em larga escala dos TAG que os constituem, sendo influenciadas não somente pela composição em AG como também pela sua distribuição nas diferentes posições da molécula

de TAG. A composição em AG dos TAG é também de grande importância no que se refere à sua estabilidade oxidativa e resistência à deterioração hidrolítica (lipólise), apresentando os SFA uma maior resistência à oxidação, seguindo-se os MUFA e por último os PUFA.

Apesar da composição em AG ser certamente importante para a caracterização da fracção lipídica, o facto de o perfil em TAG ser relativamente característico para cada óleo vegetal faz com que este parâmetro seja cada vez mais utilizado. É especialmente importante na avaliação da qualidade e pureza de óleos, o que acontece frequentemente quando se pretende confirmar a autenticidade dos produtos (Aparicio e Aparicio-Ruiz, 2000; González *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001). Nestes casos, a vantagem de utilizar este parâmetro, em detrimento ou complementarmente à determinação da composição em AG, baseia-se no facto da distribuição dos AG na molécula de glicerol ser geneticamente controlada; isto significa que a informação obtida pela análise dos TAG intactos é superior à obtida pela análise da composição em AG após hidrólise dos TAG originais.

2. ESTRUTURA QUÍMICA E NOMENCLATURA

Em termos químicos, os triacilgliceróis (TAG) são ésteres do glicerol com três AG. Quando os dois hidroxilos primários da molécula do glicerol são esterificados com dois AG diferentes, o triacilglicerol resultante é assimétrico apresentando, conseqüentemente, actividade óptica. Segundo as recomendações da comissão IUPAC-IUB dever-se-á utilizar o sistema de numeração estereoespecífico “*sn*” (IUPAC-IUB, 1967) em detrimento dos sistemas convencionais D/L ou R/S utilizado na nomenclatura de enantiómeros. Neste sistema, na projecção de Fisher da molécula de glicerol, o hidroxilo secundário deverá situar-se à esquerda do carbono 2 (C₂). O carbono que se situa acima deste será designado como C₁ e o que está abaixo como C₃ (Figura 4.1). Desta forma, uma determinada espécie molecular será designada, indubitavelmente, segundo a identificação dos AG presentes nas posições *sn1*, *sn2* e *sn3*. Nestes casos deve-se utilizar o prefixo “*sn*” na nomenclatura do composto.

Os TAG são designados, frequentemente, pela utilização de abreviaturas, construídas com base num conjunto de letras que substituem a designação dos três AG constituintes. Desta forma, e referindo apenas os mais frequentes, o ácido palmítico é designado por “P”, o esteárico por “S”, o oleico por “O”, o linoleico por “L” e o linolénico por “Ln”. Assim, um TAG que contenha apenas ácido oleico será representado, simplesmente, por OOO.

A possibilidade de existirem isómeros posicionais e estereoisómeros, conduz à existência de um número elevado de TAG.

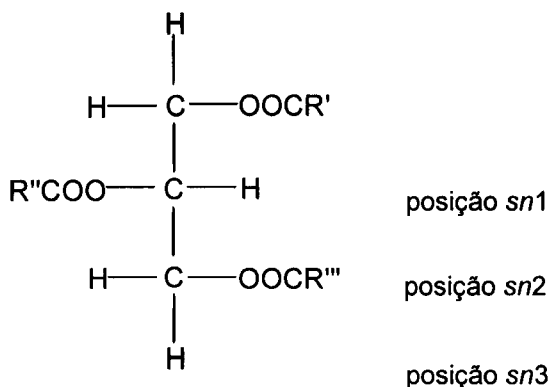


FIGURA 4.1. Projecção de Fisher evidenciando a configuração estereoquímica de um triacilglicerol (adaptado de Christie, 2005).

3. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS – BREVE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os TAG podem ser determinados por cromatografia, utilizando GC ou HPLC. Esta última técnica é actualmente a mais utilizada devido a determinadas desvantagens apresentadas pela primeira, tais como a diminuta volatilidade destes compostos, problemas associados ao sistema de injeção e a rápida deterioração da coluna devido à utilização de temperaturas muito elevadas (Aparicio e Aparicio-Ruiz, 2000). Por outro lado, ao permitir que a análise dos compostos seja realizada à temperatura ambiente, ou pouco superior, diminui-se o stress térmico imposto aos compostos e, conseqüentemente, possíveis fenómenos de degradação dos AG, especialmente no caso dos polinsaturados.

A separação de TAG por HPLC utiliza colunas de fase reversa (RP-HPLC) e eluentes não aquosos (NA), sendo frequente a utilização da designação NA-RP-HPLC (Firestone, 1994; Ruiz-Gutiérrez e Barron, 1995; Aparicio e Aparicio-Ruiz, 2000; Andrikopoulos, 2002). Esta separação baseia-se em dois factores principais: no número total de insaturações e no tamanho das cadeias carbonadas dos AG da molécula de TAG (Ruiz-Gutiérrez e Barron, 1995; Andrikopoulos, 2002; Buchgraber *et al.*, 2004). Segundo vários autores a caracterização e a ordem relativa de eluição das moléculas de TAG pode ser descrita pelo número de carbonos equivalentes (ECN), antigamente denominado de número de partição (PN), definido pela equação (Ruiz-Gutiérrez e Barron, 1995; Buchgraber *et al.*, 2004):

$$\text{ECN} = \text{NC} - 2\text{LD}$$

em que NC representa o número total de carbonos e LD o número total de ligações duplas.

No entanto, a separação de misturas complexas de TAG apresenta, com frequência, dificuldades na separação de TAG com ECN iguais, sendo por este motivo denominados pares críticos. Na Tabela 4.1 encontram-se os TAG compostos pelos cinco AG mais abundantes nos óleos vegetais, classificados de acordo com o seu ECN e número de duplas ligações.

TABELA 4.1. Classificação dos TAG com os AG mais abundantes (P: palmítico; S: esteárico; O: oleico; L: linoleico; Ln: linolénico) de acordo com o seu ECN e número total de ligações duplas (LD); (adaptado de Buchgraber *et al.*, 2004).

| ECN LD | 36 | 38 | 40 | 42 | 44 | 46 | 48 | 50 | 52 | 54 |
|-----------|--------|-------|-------|-------|------|------|------|-----|-----|-----|
| 0 | | | | | | | PPP | PPS | PSS | SSS |
| 1 | | | | | | | PPO | PSO | SSO | |
| 2 | | | | | | PPL | PSL | SSL | | |
| | | | | | | | POO | SOO | | |
| 3 | | | | | PPLn | PSLn | SSLn | | | |
| | | | | | | POL | SOL | | | |
| | | | | | | | OOO | | | |
| 4 | | | | | POLn | SOLn | | | | |
| | | | | | PLL | SLL | | | | |
| | | | | | | | OOL | | | |
| 5 | | | | PLLn | SLLn | | | | | |
| | | | | | OOLn | | | | | |
| | | | | | OLL | | | | | |
| 6 | | | PLnLn | SLnLn | | | | | | |
| | | | | OLLn | | | | | | |
| | | | | LLL | | | | | | |
| 7 | | | OLnLn | | | | | | | |
| | | | LLLn | | | | | | | |
| 8 | | LLnLn | | | | | | | | |
| 9 | LnLnLn | | | | | | | | | |

Informações detalhadas sobre as metodologias utilizadas na análise de TAG, nomeadamente GC, TLC, HPLC, “Silver-ion chromatography”, cromatografia por fluidos supercríticos, podem ser encontradas em Buchgraber *et al.* (2004). Os autores apresentam igualmente informações e uma lista detalhada sobre fases móveis, colunas e detectores utilizados na determinação do perfil de TAG em variadas matrizes.

Até à presente data, os métodos cromatográficos *per si* não permitem a completa análise estrutural dos triacil-*sn*-gliceróis, isto é, a determinação da distribuição dos diferentes AG na molécula de glicerol. Se por um lado este tipo de análise poderá, futuramente, ter um grande impacto no campo da avaliação da autenticidade dos produtos, poderá ser igualmente importante para a determinação da estabilidade oxidativa dos alimentos. Apesar da informação existente ser ainda muito escassa, alguns investigadores colocaram a hipótese da existência de uma relação entre a estabilidade oxidativa dos TAG e a distribuição relativa dos seus AG na molécula de glicerol.

As metodologias descritas actualmente para a análise estrutural dos triacil-*sn*-gliceróis são bastante trabalhosas e morosas conjugando, frequentemente, a utilização de métodos enzimáticos, químicos e diversos processos cromatográficos (Buchgraber *et al.*, 2004). As três abordagens principais envolvem a formação de diacilgliceróis, por métodos enzimáticos (1,2- e 2,3-*sn*-diacilgliceróis) ou químicos (1,2-, 1,3- e 2,3-*sn*-diacilgliceróis). Após obtenção dos diacilgliceróis podem ser aplicadas três metodologias, nomeadamente:

- Conversão da mistura de 1,2- e 2,3-*sn*-diacilgliceróis em derivados fosfolipídicos, os quais são posteriormente submetidos à acção da enzima fosfolípase A, que reage com os 1,2-diacil-*sn*-glicerofosfatídeos. Após isolamento das fracções obtidas, a composição em AG é analisada por GC/FID;
- Reacção dos *sn*-diacilgliceróis obtidos por reacção química com um agente quiral, formando-se diastereoisómeros. Estes podem ser separados por métodos cromatográficos e a composição em AG analisada por GC/FID;
- Separação dos enantiómeros formados através de cromatografia quiral.

II – TRIACILGLICERÓIS. PARTE EXPERIMENTAL

1. REAGENTES E PADRÕES

Os padrões 1,2,3-tripalmitoilglicerol (PPP), 1,2,3-triestearoilglicerol (SSS), 1,2,3-trilinolenoilglicerol (LnLnLn), e 1,2,3-tripalmitoleoilglicerol (PoPoPo), com purezas superiores a 98%, e os padrões 1,2,3-trioleoilglicerol (OOO), 1,2,3-trilinoilglicerol (LLL), 1,2-dilinoil-3-palmitoil-*rac*-glicerol (PLL), 1,2-dilinoil-3-oleoil-*rac*-glicerol (OLL), 1,2-dipalmitoil-3-oleoil-*rac*-glicerol (PPO), 1,2-dioleoil-3-estearoil-*rac*-glicerol (SOO), 1-palmitoil-2-oleoil-3-linoilglicerol (POL), e 1,2-dioleoil-3-palmitoil-*rac*-glicerol (POO), com purezas superiores a 99%, foram adquiridos à Sigma (St. Louis, MO, USA). O acetonitrilo e a acetona tinham grau de pureza Lichrosolv e foram adquiridas à Merck (Darmstadt, Germany).

2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A preparação da amostra foi idêntica para ambas as matrizes em estudo. Aproximadamente 0,2 g de óleo, previamente extraído de cada uma das amostras, foi dissolvido em 4,0 ml de acetona e homogeneizado. A mistura foi filtrada para um vial apropriado utilizando um filtro descartável de 0,22 µm e analisada por HPLC.

3. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Para a análise de ambas as matrizes utilizou-se o mesmo sistema cromatográfico, com as seguintes características:

- Cromatógrafo Jasco (Tóquio, Japão) equipado com uma bomba quaternária PU-1580 (Jasco), um injector automático AS-950 (Jasco) e um "loop" de 10 µl;
- Detector ELSD (evaporative light scattering), modelo 75-Sedere (Sedere, França);
- Coluna Kromasil 100 C₁₈, 250 x 4,6 mm e 5 µm de tamanho de partícula (Teknokroma, Espanha) a operar à temperatura ambiente (~ 20 °C);

Utilizaram-se as seguintes condições analíticas:

NOZ:

- Fase móvel: mistura acetona/acetonitrilo (70:30, v/v), com um fluxo de 1 ml/min, a operar em programa isocrático;
- Detector: Temperatura de evaporação: 40 °C;
Pressão do gás nebulizador (ar comprimido): 3,5 bar;
Sensibilidade do fotomultiplicador: 6;

AVELÃ:

- Fase móvel: mistura acetona/acetonitrilo 70:30, v/v (Solvente A) e mistura acetona/acetonitrilo 80:20, v/v (Solvente B);
Gradiente: 0 min: 0% B; 35 min: 0% B; 35,1 min: 100% B; 50 min: 100% B; 50,1 min: 0% B; com fluxo de 1 ml/min;
- Detector: Temperatura de evaporação: 40 °C;
Pressão do gás nebulizador (ar comprimido): 3,5 bar;
Sensibilidade do fotomultiplicador: 5.

Os dados cromatográficos foram analisados utilizando o software Borwin (JMBS, França). Os compostos foram identificados tendo em conta as selectividades, isto é, os tempos de retenção relativos à substância de referência (trioleína no caso da avelã e trilinoleína para a noz). A identificação dos compostos foi ainda suportada por dados de espectrometria de massa disponíveis na literatura, mais concretamente estudos realizados nas matrizes em estudo com Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight (MALDI-TOF) Mass

Spectrometry (Ayorinde *et al.*, 1999) e através de Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) Mass Spectrometry (Holcapek *et al.*, 2003; Parcerisa *et al.*, 2000).

A quantificação foi feita por normalização interna das áreas, assumindo que a resposta do detector é semelhante para os compostos identificados (Cunha e Oliveira, 2006).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o programa "Statistica for Windows" (Statistica for Windows, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) e os resultados obtidos comentados com base na literatura (Naes e Indhal, 1998; Alves e Oliveira, 2004; Alves *et al.*, 2005).

A análise multivariada dos dados obtidos para cada uma das matrizes estudadas envolveu uma análise discriminante (DA) "forward stepwise" de modo a seleccionar os TAG mais discriminantes e, seguidamente, uma análise de variáveis canónicas (CVA) baseada nos compostos seleccionados, de forma a analisar as diferenças entre grupos e apresentá-las convenientemente na forma de gráficos.

A análise estatística envolveu também testes MANOVA (de modo a avaliar se existia pelo menos um grupo diferente dos outros em pelo menos um TAG), testes Hotelling T^2 para cada par de grupos (de modo a avaliar a hipótese de os grupos serem diferentes em pelo menos um composto) e testes *t*-Student (para avaliação de diferenças significativas relativamente a cada composto, em cada par de grupos comparados).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como foi já referido, estes compostos são frequentemente avaliados utilizando técnicas de HPLC de fase reversa (RP-HPLC) com solventes não aquosos. O comprimento da cadeia e o grau de insaturação dos AG constituintes da molécula de TAG são os principais factores de separação dos mesmos. Com base na literatura disponível, constata-se uma reduzida variabilidade de fases estacionárias utilizadas na determinação de TAG por RP-HPLC (Ruiz-Gutiérrez e Barron, 1995; Buchgraber *et al.*, 2004). Desta forma, a escolha da fase móvel a utilizar torna-se um factor cromatográfico importante na separação dos TAG. Usualmente, preconiza-se a utilização de misturas contendo um solvente orgânico base e um modificador orgânico (Ruiz-Gutiérrez e Barron, 1995; Andrikopoulos, 2002; Buchgraber *et al.*, 2004). Este último melhora a solubilidade dos TAG no solvente base e aumenta a selectividade dos picos. Neste trabalho, escolheu-se uma mistura de acetona/acetonitrilo, uma vez que estes são os solventes mais frequentemente referidos na literatura como modificador orgânico e solvente base, respectivamente. A acetona apresenta a vantagem de melhorar a separação dos pares críticos de TAG, ao passo que o acetonitrilo interage com os electrões π (π) das ligações duplas, auxiliando desta forma na separação de compostos com diferente número de insaturações (Buchgraber *et al.*, 2004). Para além destes motivos, os solventes referidos

foram já utilizados com sucesso na análise de TAG em outras matrizes (Firestone, 1994; Parcerisa, 1994, 1995a, 1999; Ruiz-Gutiérrez e Barron, 1995; Pons, 1998; Aparicio e Aparicio-Ruiz, 2000; Andrikopoulos, 2002; Cunha e Oliveira, 2006). Para ambas as matrizes foram testadas misturas com diferentes proporções de acetona/acetonitrilo. As fases móveis foram escolhidas em cada caso de forma a obter tempos de análise não excessivamente longos e, simultaneamente, obter uma boa resolução dos picos. Para ambas as matrizes, avelã e noz, o solvente seleccionado foi uma mistura acetona/acetonitrilo 70:30, v/v, no entanto, no caso da matriz avelã, optou-se por fazer uma mudança da composição do eluente aos 35 min, aumentando a percentagem de modificador orgânico (ver ponto II.3, análise cromatográfica), de modo a facilitar a eluição dos picos com um maior número de SFA e de AG com maior massa molecular, isto é, com ECN mais elevado. Desta forma, na análise do óleo de avelã utilizou-se um gradiente com dois patamares. O fluxo do eluente foi testado para ambas as matrizes, tendo-se optado por um fluxo de 1ml/min para ambos os casos.

Relativamente ao detector, optou-se pela utilização do ELSD, apesar de outros, igualmente referidos como possíveis opções para a análise de TAG por HPLC, estarem disponíveis. O detector de UV apresenta a desvantagem de ser incompatível com solventes que absorvam fortemente na zona UV, caso da acetona, para além de os TAG apresentarem cromóforos fracos (Stolyhwo *et al.*, 1985; Ruiz-Gutiérrez e Barron, 1995; Andrikopoulos, 2002). O detector de índice de refração (RI) apresenta uma baixa sensibilidade, é muito susceptível a oscilações de temperatura e não pode ser utilizado com eluição em gradiente (Stolyhwo *et al.*, 1985; Firestone, 1994; Gutiérrez e Barron, 1995; Andrikopoulos, 2002). Para além destes motivos, o ELSD apresenta as seguintes vantagens: permite a detecção de compostos não voláteis independentemente da sua estrutura química, apresenta uma maior sensibilidade quando comparado com o detector RI, não é sensível a flutuações de temperatura e pode ser utilizado com eluição em gradiente (Kohler e Haerdi, 1997; Buchgraber *et al.*, 2004).

No entanto, refira-se que o ELSD é geralmente utilizado apenas para determinações semi-quantitativas, devido à dependência não-linear entre a concentração de analito e o sinal obtido (Stolyhwo *et al.*, 1985). Esta falta de linearidade depende em muito da geometria do nebulizador, embora as versões mais recentes tenham sido melhoradas de forma a que a resposta seja linear numa gama abrangente de concentrações (Neff *et al.*, 1999; Buchgraber *et al.*, 2004). Mais recentemente, alguns autores referiram que o ELSD produz resultados fiáveis na análise de TAG sem ser necessário a determinação de factores de resposta individualmente para cada TAG (Neff *et al.*, 1999; Cunha e Oliveira, 2006).

O ELSD pode ser aplicado em cromatografia líquida sempre que o soluto apresente uma volatilidade inferior que a da fase móvel. A técnica consiste em três passos básicos: nebulização do eluente que sai da coluna, evaporação do solvente volátil (fase móvel) e

dispersão da luz pelas partículas do analito. Este princípio torna o ELSD um detector universal, uma vez que pode ser utilizado para detecção de analitos que não contenham cromóforos. As propriedades que podem ser ajustadas são o fluxo de gás, o fluxo da fase móvel, a pressão do gás nebulizador e a temperatura de volatilização do solvente. O fluxo da fase móvel não deverá ser muito elevado, pois pode gerar uma incompleta vaporização da fase móvel, levando ao aumento do ruído do detector. O mesmo se aplica relativamente ao fluxo de gás, pois pode originar uma diminuição da resposta do detector por diminuição excessiva do tamanho das partículas de aerossol formado no nebulizador. Contrariamente, se o fluxo de gás for muito diminuto, o tamanho das partículas de aerossol formado poderá ser excessivo, levando a uma difícil evaporação da fase móvel e podendo gerar fenómenos de aglutinação de partículas, pelo que o factor de resposta diminui rapidamente com fluxos de gás demasiado pequenos. No tubo aquecido, a temperatura deverá ser tal que permita a completa evaporação do solvente da fase móvel, sem no entanto causar a parcial evaporação dos analitos, o que levaria a perda de sensibilidade. Se o solvente não é completamente evaporado, o ruído do detector aumenta. O diâmetro médio e a uniformidade das partículas do aerossol são os factores mais importantes que afectam a sensibilidade e reprodutibilidade do ELSD. Desta forma, é necessário chegar a uma situação de compromisso entre o fluxo da fase móvel, fluxo do gás nebulizador e temperatura do tubo aquecido. Num trabalho previamente elaborado no Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia do Porto (Cunha e Oliveira, 2006) procedeu-se ao desenvolvimento e validação do método utilizado neste trabalho, optimizando os parâmetros descritos, nomeadamente o fluxo da fase móvel, pressão do gás nebulizador, temperatura de volatilização do solvente e ganho imposto ao detector. No referido trabalho foram estudados vários óleos vegetais, entre os quais amostras de óleo de avelã e de óleo de noz comerciais.

Uma vez que no presente estudo para além da obtenção de um perfil para cada uma das matrizes se pretendia analisar uma quantidade considerável de amostras, de forma a verificar a existência, ou não, de diferenças significativas em termos da composição em TAG que pudessem estar relacionadas com os factores estudados (cultivar, ano de produção e localização geográfica), tornava-se necessário a utilização de uma metodologia simples e rápida. O método utilizado adequa-se aos objectivos pretendidos, sendo a preparação da amostra simples, envolvendo apenas diluição da toma de óleo em acetona, homogenização e filtração. Desta forma, o método aplicado permite a obtenção de resultados num período de tempo relativamente curto, fazendo com que seja um método apropriado para análises de rotina.

5.1 Aveleira

Na matriz avelã foram determinados onze TAG: LLL, OLL, PLL, OOL, POL, PPL, OOO, POO, PPO, SOO e PSO. A Tabela 4.2 apresenta os valores médios para cada TAG detectado, para cada cultivar, ano de produção e localização geográfica. Em todas as amostras estudadas, o composto maioritário foi o OOO (53,6 a 73,5 %, com o valor médio de 65,3%), seguido pelo OLL (9,4 a 25,1 %, com o valor médio de 15,4%) e o POO (7,4 a 15,9%, com o valor médio de 11,4%), reflectindo o elevado teor em ácido oleico das avelãs. Cinco dos TAG determinados (LLL, PLL, PPL, PPO e PSO) apresentaram teores inferiores a 1% em todas as amostras. Como se pode constatar pela análise dos valores da Tabela 4.2, apesar de existirem algumas diferenças quantitativas entre as amostras estudadas, pode dizer-se que na sua generalidade, as amostras apresentaram um perfil semelhante, definindo um “fingerprint” químico que poderá ser útil na avaliação da identidade e qualidade dos óleos de avelã (Figura 4.2).

A Figura 4.3 mostra um cromatograma característico, obtido com uma amostra de óleo extraído de avelãs e analisado segundo as condições experimentais descritas.

Considerando os valores apresentados na Tabela 4.2 e a composição em AG obtida para cada uma das mesmas amostras, seria de esperar a obtenção de teores mais elevados de TAG contendo na sua composição moléculas de ácido esteárico e de ácido linoleico, do que aqueles obtidos. Esta pequena diferença pode ser explicada pelas reduzidas quantidades de SLL e SOL, uma vez que segundo Ayorinde *et al.* (1999) e Holcapek *et al.* (2003), os dados obtidos por espectrometria de massa demonstram a existência de SLL e SOL no óleo de avelã, co-eluído com OOL e OOO, respectivamente. A co-eluição destes compostos justifica-se pela metodologia RP-HPLC utilizada, uma vez que estes compostos apresentam ECN iguais, sendo por isso difícil a sua resolução cromatográfica. Conclui-se então que nas amostras analisadas poderão existir pequenas quantidades de SLL e de SOL, não sendo contudo possível detectar e quantificar estes compostos com a metodologia utilizada. Este facto explica as pequenas diferenças existentes quando comparadas as composições de TAG e de AG para as mesmas amostras.

Saliente-se contudo que existe uma grande coerência entre os resultados das composições em TAG e em AG, traduzida no facto de que, regra geral, as cultivares que apresentam teores superiores e inferiores de ácido linoleico são aquelas que apresentam teores superiores e inferiores de TAG contendo moléculas deste AG. A título de exemplo, no ano de 2001 as cultivares que apresentaram teores superiores (Fertille de Coutard, Negreta e Gunslebert) e inferiores (Grossal, Campanica e Lansing) de ácido linoleico, foram aquelas que apresentaram, respectivamente, teores superiores e inferiores em TAG contendo na sua composição ácido linoleico. Relativamente ao ácido esteárico, verifica-se um comportamento idêntico ao descrito para o ácido linoleico.

TABELA 4.2. Composição em triacilgliceróis (% relativa) das cultivares de avelãs estudadas, por ano de produção e localização geográfica.

| Cultivar | Triacilgliceróis | | | | | | | | | | |
|--------------------------|------------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|---------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | LLL | OLL | PLL | OOL | POL | PPL | OOO | POO | PPO | SOO | PSO |
| Ano: 2001 | | | | | | | | | | | |
| | Vila Real | | | | | | | | | | |
| Butler | 0,24 ± 0,00 | 2,03 ± 0,02 | 0,09 ± 0,00 | 14,92 ± 0,15 | 1,67 ± 0,02 | 0,03 ± 0,00 | 63,99 ± 0,06 | 12,05 ± 0,04 | 0,11 ± 0,01 | 4,76 ± 0,07 | 0,11 ± 0,00 |
| Camponica | 0,22 ± 0,03 | 1,15 ± 0,10 | 0,08 ± 0,01 | 11,24 ± 0,32 | 1,17 ± 0,14 | 0,03 ± 0,00 | 71,37 ± 1,26 | 10,93 ± 0,35 | 0,06 ± 0,01 | 3,67 ± 0,29 | 0,09 ± 0,00 |
| Cosford | 0,16 ± 0,02 | 1,44 ± 0,10 | 0,06 ± 0,01 | 13,78 ± 0,09 | 1,41 ± 0,09 | 0,03 ± 0,00 | 67,41 ± 0,70 | 11,94 ± 0,24 | 0,13 ± 0,00 | 3,54 ± 0,20 | 0,11 ± 0,01 |
| Couplat | 0,12 ± 0,00 | 1,11 ± 0,04 | 0,05 ± 0,00 | 11,46 ± 0,14 | 1,22 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 67,99 ± 0,10 | 12,76 ± 0,11 | 0,14 ± 0,00 | 4,98 ± 0,08 | 0,14 ± 0,00 |
| Daviana | 0,19 ± 0,00 | 1,49 ± 0,05 | 0,05 ± 0,00 | 14,60 ± 0,08 | 1,16 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 69,09 ± 0,05 | 10,45 ± 0,08 | 0,06 ± 0,00 | 2,77 ± 0,01 | 0,09 ± 0,01 |
| Ennis | 0,30 ± 0,02 | 2,38 ± 0,21 | 0,14 ± 0,02 | 16,60 ± 0,38 | 2,08 ± 0,09 | 0,04 ± 0,00 | 63,27 ± 0,50 | 12,70 ± 0,17 | 0,15 ± 0,00 | 2,28 ± 0,07 | 0,06 ± 0,00 |
| F. de Coutard | 0,15 ± 0,00 | 2,15 ± 0,06 | 0,06 ± 0,00 | 18,85 ± 0,20 | 1,43 ± 0,02 | 0,01 ± 0,00 | 64,78 ± 0,05 | 8,51 ± 0,11 | 0,03 ± 0,00 | 3,90 ± 0,14 | 0,12 ± 0,00 |
| Grossal | 0,11 ± 0,00 | 0,98 ± 0,03 | 0,04 ± 0,00 | 11,63 ± 0,22 | 1,18 ± 0,04 | 0,02 ± 0,00 | 70,13 ± 0,05 | 12,48 ± 0,06 | 0,12 ± 0,00 | 3,25 ± 0,15 | 0,07 ± 0,00 |
| Gunslebert | 0,70 ± 0,00 | 3,31 ± 0,00 | 0,24 ± 0,01 | 17,15 ± 0,08 | 2,37 ± 0,03 | 0,04 ± 0,00 | 57,56 ± 0,23 | 12,89 ± 0,06 | 0,20 ± 0,00 | 5,13 ± 0,01 | 0,30 ± 0,03 |
| Lansing | 0,12 ± 0,01 | 1,06 ± 0,01 | 0,04 ± 0,00 | 12,28 ± 0,29 | 1,15 ± 0,05 | 0,01 ± 0,00 | 65,66 ± 0,29 | 12,30 ± 0,11 | 0,09 ± 0,00 | 6,91 ± 0,11 | 0,36 ± 0,01 |
| L. Espanha | 0,19 ± 0,01 | 1,68 ± 0,04 | 0,05 ± 0,00 | 14,32 ± 0,41 | 0,97 ± 0,02 | 0,01 ± 0,00 | 70,15 ± 0,36 | 8,36 ± 0,22 | 0,03 ± 0,00 | 4,15 ± 0,11 | 0,10 ± 0,00 |
| M. Bollwiller | 0,28 ± 0,00 | 2,68 ± 0,02 | 0,08 ± 0,00 | 17,20 ± 0,15 | 1,51 ± 0,02 | 0,02 ± 0,00 | 66,23 ± 0,16 | 9,66 ± 0,08 | 0,06 ± 0,01 | 2,23 ± 0,04 | 0,03 ± 0,00 |
| Morell | 0,24 ± 0,00 | 1,92 ± 0,03 | 0,08 ± 0,00 | 14,98 ± 0,23 | 1,54 ± 0,02 | 0,05 ± 0,00 | 65,80 ± 0,69 | 10,75 ± 0,10 | 0,13 ± 0,00 | 4,01 ± 0,01 | 0,11 ± 0,01 |
| Negreta | 0,31 ± 0,01 | 2,00 ± 0,03 | 0,08 ± 0,01 | 15,42 ± 0,12 | 1,39 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 66,85 ± 0,32 | 10,80 ± 0,12 | 0,09 ± 0,01 | 2,98 ± 0,05 | 0,07 ± 0,01 |
| Pauetet | 0,11 ± 0,01 | 1,45 ± 0,06 | 0,06 ± 0,00 | 14,28 ± 0,05 | 1,69 ± 0,02 | 0,03 ± 0,00 | 66,27 ± 0,22 | 13,08 ± 0,04 | 0,13 ± 0,01 | 2,83 ± 0,09 | 0,07 ± 0,00 |
| R. Piemont | 0,17 ± 0,00 | 1,72 ± 0,02 | 0,09 ± 0,01 | 14,98 ± 0,10 | 1,82 ± 0,04 | 0,03 ± 0,00 | 63,68 ± 0,26 | 13,02 ± 0,26 | 0,16 ± 0,00 | 3,80 ± 0,04 | 0,31 ± 0,01 |
| Segorbe | 0,14 ± 0,01 | 1,49 ± 0,04 | 0,05 ± 0,00 | 13,85 ± 0,08 | 1,31 ± 0,03 | 0,02 ± 0,00 | 68,84 ± 0,10 | 10,95 ± 0,11 | 0,08 ± 0,00 | 3,20 ± 0,05 | 0,06 ± 0,00 |
| St. M ^a Jesus | 0,10 ± 0,00 | 0,97 ± 0,09 | 0,04 ± 0,00 | 11,58 ± 0,19 | 1,06 ± 0,11 | 0,02 ± 0,00 | 70,54 ± 1,15 | 11,75 ± 0,43 | 0,10 ± 0,01 | 3,77 ± 0,28 | 0,08 ± 0,00 |
| T. de Giffoni | 0,26 ± 0,00 | 2,40 ± 0,17 | 0,09 ± 0,00 | 16,63 ± 0,02 | 1,54 ± 0,05 | 0,02 ± 0,00 | 65,96 ± 0,41 | 10,12 ± 0,20 | 0,06 ± 0,01 | 2,94 ± 0,38 | 0,07 ± 0,01 |
| Média | 0,22 | 1,76 | 0,08 | 14,51 | 1,46 | 0,03 | 66,61 | 11,34 | 0,10 | 3,74 | 0,12 |
| min - máx | 0,10 - 0,70 | 0,97 - 3,31 | 0,04 - 0,24 | 11,46 - 18,85 | 0,97 - 2,37 | 0,01 - 0,05 | 55,56 - 70,54 | 8,36 - 13,08 | 0,03 - 0,20 | 2,23 - 6,91 | 0,03 - 0,36 |

P: ácido palmítico; S: ácido esteárico; O: ácido oleico; L: ácido linoleico.

continuação da Tabela 4.2.

| | LLL | OLL | PLL | OOL | POL | PPL | OOO | POO | PPO | SOO | PSO |
|------------------|-------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------------|---------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| Ano: 2002 | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | Vila Real | | | | | |
| Butler | 0,12 ± 0,01 | 1,39 ± 0,04 | 0,05 ± 0,00 | 13,42 ± 0,08 | 1,32 ± 0,03 | 0,02 ± 0,00 | 67,93 ± 0,32 | 12,30 ± 0,18 | 0,10 ± 0,01 | 3,27 ± 0,05 | 0,08 ± 0,01 |
| Camponica | 0,07 ± 0,01 | 0,85 ± 0,06 | 0,04 ± 0,00 | 11,08 ± 0,24 | 0,96 ± 0,06 | 0,02 ± 0,00 | 73,49 ± 0,54 | 10,67 ± 0,15 | 0,07 ± 0,01 | 2,72 ± 0,07 | 0,04 ± 0,00 |
| Cosford | 0,28 ± 0,03 | 2,90 ± 0,19 | 0,12 ± 0,01 | 20,34 ± 0,20 | 1,98 ± 0,14 | 0,03 ± 0,00 | 62,31 ± 0,59 | 9,79 ± 0,23 | 0,05 ± 0,00 | 2,15 ± 0,20 | 0,05 ± 0,00 |
| Couplat | 0,13 ± 0,00 | 1,49 ± 0,02 | 0,08 ± 0,00 | 14,14 ± 0,14 | 1,76 ± 0,02 | 0,03 ± 0,00 | 64,92 ± 0,34 | 14,05 ± 0,22 | 0,17 ± 0,00 | 3,13 ± 0,05 | 0,10 ± 0,00 |
| Daviana | 0,25 ± 0,01 | 2,09 ± 0,03 | 0,09 ± 0,00 | 15,77 ± 0,17 | 1,64 ± 0,03 | 0,03 ± 0,00 | 64,68 ± 0,12 | 11,50 ± 0,09 | 0,12 ± 0,01 | 3,77 ± 0,06 | 0,10 ± 0,01 |
| Ennis | 0,40 ± 0,03 | 3,25 ± 0,13 | 0,19 ± 0,01 | 19,39 ± 0,22 | 2,77 ± 0,07 | 0,06 ± 0,00 | 58,29 ± 0,47 | 13,02 ± 0,08 | 0,19 ± 0,01 | 2,35 ± 0,03 | 0,08 ± 0,00 |
| F. de Coutard | 0,19 ± 0,01 | 2,25 ± 0,18 | 0,10 ± 0,01 | 16,90 ± 1,00 | 2,08 ± 0,11 | 0,04 ± 0,00 | 63,67 ± 1,28 | 11,67 ± 0,09 | 0,12 ± 0,00 | 2,89 ± 0,22 | 0,09 ± 0,00 |
| Grossal | 0,10 ± 0,00 | 1,23 ± 0,03 | 0,05 ± 0,00 | 13,49 ± 0,11 | 1,37 ± 0,02 | 0,02 ± 0,00 | 69,08 ± 0,41 | 12,26 ± 0,33 | 0,11 ± 0,00 | 2,25 ± 0,05 | 0,04 ± 0,00 |
| Gunslebert | 0,20 ± 0,00 | 1,84 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 15,76 ± 0,08 | 1,74 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 64,15 ± 0,10 | 12,27 ± 0,16 | 0,14 ± 0,00 | 3,61 ± 0,03 | 0,17 ± 0,00 |
| Lansing | 0,18 ± 0,02 | 2,21 ± 0,15 | 0,12 ± 0,01 | 16,74 ± 0,38 | 2,34 ± 0,09 | 0,04 ± 0,00 | 59,86 ± 0,51 | 13,66 ± 0,65 | 0,20 ± 0,02 | 4,34 ± 0,42 | 0,26 ± 0,02 |
| L. Espanha | 0,23 ± 0,03 | 2,71 ± 0,15 | 0,10 ± 0,01 | 19,56 ± 0,18 | 1,98 ± 0,12 | 0,03 ± 0,00 | 63,20 ± 0,55 | 10,15 ± 0,27 | 0,07 ± 0,01 | 1,90 ± 0,14 | 0,06 ± 0,01 |
| M. Bollwiller | 0,35 ± 0,02 | 3,24 ± 0,10 | 0,14 ± 0,01 | 20,06 ± 0,09 | 2,27 ± 0,06 | 0,04 ± 0,00 | 60,88 ± 0,35 | 10,54 ± 0,06 | 0,09 ± 0,01 | 2,28 ± 0,02 | 0,12 ± 0,00 |
| Morrell | 0,18 ± 0,00 | 2,14 ± 0,02 | 0,09 ± 0,00 | 16,78 ± 0,01 | 2,05 ± 0,03 | 0,04 ± 0,00 | 63,02 ± 0,16 | 12,10 ± 0,12 | 0,14 ± 0,00 | 3,35 ± 0,03 | 0,12 ± 0,01 |
| Negreta | 0,43 ± 0,03 | 3,40 ± 0,32 | 0,20 ± 0,02 | 20,08 ± 0,38 | 2,48 ± 0,28 | 0,02 ± 0,00 | 59,81 ± 1,36 | 10,99 ± 0,18 | 0,10 ± 0,01 | 2,20 ± 0,07 | 0,19 ± 0,01 |
| Paulet | 0,09 ± 0,00 | 1,47 ± 0,01 | 0,06 ± 0,00 | 14,98 ± 0,17 | 1,68 ± 0,03 | 0,02 ± 0,00 | 66,07 ± 0,01 | 13,00 ± 0,13 | 0,12 ± 0,01 | 2,36 ± 0,10 | 0,15 ± 0,02 |
| R. Piemont | 0,08 ± 0,00 | 0,81 ± 0,02 | 0,04 ± 0,00 | 10,85 ± 0,20 | 1,22 ± 0,06 | 0,02 ± 0,00 | 69,63 ± 0,38 | 14,13 ± 0,03 | 0,17 ± 0,01 | 2,97 ± 0,11 | 0,08 ± 0,01 |
| Segorbe | 0,25 ± 0,01 | 2,12 ± 0,05 | 0,12 ± 0,00 | 16,32 ± 0,09 | 1,89 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 64,14 ± 0,31 | 11,71 ± 0,20 | 0,13 ± 0,00 | 3,21 ± 0,06 | 0,09 ± 0,00 |
| St. Mª Jesus | 0,16 ± 0,01 | 1,49 ± 0,07 | 0,07 ± 0,00 | 13,62 ± 0,11 | 1,47 ± 0,06 | 0,03 ± 0,00 | 67,51 ± 0,72 | 12,36 ± 0,29 | 0,12 ± 0,01 | 3,10 ± 0,16 | 0,06 ± 0,01 |
| T. de Giffoni | 0,17 ± 0,00 | 1,60 ± 0,05 | 0,07 ± 0,00 | 13,36 ± 0,25 | 1,44 ± 0,05 | 0,03 ± 0,00 | 67,89 ± 0,36 | 11,69 ± 0,08 | 0,12 ± 0,00 | 3,56 ± 0,07 | 0,09 ± 0,00 |
| Média | 0,20 | 2,02 | 0,09 | 15,93 | 1,81 | 0,03 | 64,76 | 11,99 | 0,12 | 2,92 | 0,10 |
| min - máx | 0,07 - 0,43 | 0,81 - 3,40 | 0,04 - 0,20 | 10,85 - 20,34 | 0,96 - 2,77 | 0,02 - 0,06 | 58,29 - 73,49 | 9,79 - 14,13 | 0,05 - 0,20 | 1,90 - 4,34 | 0,04 - 0,26 |
| | | | | | | Felgueiras | | | | | |
| Butler | 0,28 ± 0,01 | 2,18 ± 0,07 | 0,10 ± 0,00 | 15,33 ± 0,22 | 1,59 ± 0,03 | 0,02 ± 0,00 | 62,41 ± 0,20 | 11,53 ± 0,14 | 0,08 ± 0,01 | 6,17 ± 0,12 | 0,31 ± 0,01 |
| Camponica | 0,26 ± 0,01 | 1,75 ± 0,01 | 0,07 ± 0,00 | 18,91 ± 0,08 | 1,05 ± 0,02 | 0,01 ± 0,00 | 66,82 ± 0,12 | 9,32 ± 0,11 | 0,05 ± 0,00 | 2,15 ± 0,04 | 0,06 ± 0,00 |
| Cosford | 0,17 ± 0,00 | 2,00 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | 16,83 ± 0,24 | 1,76 ± 0,02 | 0,03 ± 0,00 | 62,78 ± 0,24 | 11,43 ± 0,06 | 0,10 ± 0,01 | 4,66 ± 0,08 | 0,18 ± 0,00 |
| Couplat | 0,15 ± 0,00 | 1,56 ± 0,03 | 0,06 ± 0,00 | 13,52 ± 0,14 | 1,37 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 67,69 ± 0,23 | 11,65 ± 0,03 | 0,10 ± 0,00 | 3,77 ± 0,10 | 0,10 ± 0,00 |
| Ennis | 0,22 ± 0,01 | 1,63 ± 0,02 | 0,05 ± 0,00 | 16,20 ± 0,10 | 1,33 ± 0,02 | 0,03 ± 0,00 | 63,25 ± 0,71 | 12,81 ± 0,11 | 0,09 ± 0,00 | 4,23 ± 0,02 | 0,22 ± 0,00 |
| F. de Coutard | 0,37 ± 0,01 | 2,05 ± 0,03 | 0,26 ± 0,00 | 14,44 ± 0,05 | 1,99 ± 0,01 | 0,04 ± 0,00 | 64,48 ± 0,38 | 12,41 ± 0,16 | 0,15 ± 0,01 | 3,17 ± 0,06 | 0,14 ± 0,00 |
| M. Bollwiller | 0,81 ± 0,01 | 3,21 ± 0,04 | 0,13 ± 0,00 | 20,69 ± 0,31 | 2,00 ± 0,02 | 0,03 ± 0,00 | 62,77 ± 0,28 | 9,10 ± 0,06 | 0,06 ± 0,00 | 1,60 ± 0,14 | 0,04 ± 0,00 |
| Morell | 0,27 ± 0,01 | 2,09 ± 0,02 | 0,35 ± 0,01 | 25,09 ± 0,19 | 3,27 ± 0,03 | 0,05 ± 0,00 | 53,57 ± 0,12 | 9,58 ± 0,01 | 0,10 ± 0,00 | 1,30 ± 0,01 | 0,06 ± 0,00 |
| Paulet | 0,27 ± 0,01 | 2,09 ± 0,02 | 0,11 ± 0,01 | 15,73 ± 0,26 | 1,74 ± 0,04 | 0,03 ± 0,00 | 65,51 ± 0,25 | 11,44 ± 0,04 | 0,10 ± 0,01 | 2,89 ± 0,17 | 0,10 ± 0,00 |
| T. de Giffoni | 0,19 ± 0,01 | 2,10 ± 0,03 | 0,07 ± 0,00 | 15,83 ± 0,28 | 1,51 ± 0,02 | 0,03 ± 0,00 | 66,64 ± 0,40 | 10,53 ± 0,06 | 0,07 ± 0,00 | 2,95 ± 0,06 | 0,07 ± 0,01 |
| Média | 0,34 | 2,44 | 0,13 | 17,26 | 1,76 | 0,03 | 63,59 | 10,98 | 0,09 | 3,29 | 0,13 |
| min - máx | 0,15 - 0,81 | 1,56 - 5,83 | 0,05 - 0,35 | 13,52 - 25,09 | 1,05 - 3,27 | 0,01 - 0,05 | 53,57 - 67,69 | 9,10 - 12,81 | 0,05 - 0,15 | 1,30 - 6,17 | 0,04 - 0,31 |

continuação da Tabela 4.2.

| | LLL | OLL | PLL | OOL | POL | PPL | OOO | POO | PPO | SOO | PSO |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|---------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| Ano: 2003 | | | | | | | | | | | |
| Vila Real | | | | | | | | | | | |
| Butler | 0,15 ± 0,00 | 1,31 ± 0,01 | 0,05 ± 0,00 | 11,02 ± 0,13 | 1,02 ± 0,01 | 0,01 ± 0,00 | 67,62 ± 0,31 | 12,30 ± 0,13 | 0,11 ± 0,01 | 6,21 ± 0,06 | 0,21 ± 0,00 |
| Camponica | 0,28 ± 0,03 | 3,81 ± 0,20 | 0,11 ± 0,01 | 24,40 ± 0,02 | 1,80 ± 0,16 | 0,01 ± 0,00 | 61,18 ± 0,61 | 7,44 ± 0,31 | 0,02 ± 0,00 | 0,80 ± 0,10 | 0,02 ± 0,00 |
| Cosford | 0,19 ± 0,01 | 1,44 ± 0,01 | 0,07 ± 0,00 | 12,72 ± 0,05 | 1,31 ± 0,02 | 0,02 ± 0,00 | 67,49 ± 0,16 | 12,94 ± 0,08 | 0,12 ± 0,01 | 3,59 ± 0,08 | 0,10 ± 0,00 |
| Couplat | 0,18 ± 0,00 | 1,04 ± 0,02 | 0,06 ± 0,00 | 9,84 ± 0,10 | 1,03 ± 0,03 | 0,02 ± 0,00 | 68,83 ± 0,38 | 13,75 ± 0,22 | 0,18 ± 0,00 | 4,92 ± 0,05 | 0,15 ± 0,01 |
| Ennis | 0,31 ± 0,01 | 2,10 ± 0,05 | 0,12 ± 0,01 | 14,17 ± 0,24 | 1,72 ± 0,06 | 0,03 ± 0,00 | 63,54 ± 0,69 | 13,99 ± 0,17 | 0,20 ± 0,01 | 3,66 ± 0,13 | 0,14 ± 0,00 |
| F. de Coutard | 0,17 ± 0,01 | 1,95 ± 0,15 | 0,17 ± 0,01 | 20,04 ± 0,19 | 1,85 ± 0,07 | 0,04 ± 0,00 | 60,74 ± 0,72 | 11,54 ± 0,07 | 0,15 ± 0,02 | 3,27 ± 0,02 | 0,14 ± 0,00 |
| Grossal | 0,07 ± 0,00 | 0,83 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 10,84 ± 0,16 | 1,11 ± 0,04 | 0,02 ± 0,00 | 69,26 ± 0,11 | 13,00 ± 0,23 | 0,12 ± 0,00 | 4,58 ± 0,38 | 0,15 ± 0,01 |
| Gunslebert | 0,57 ± 0,02 | 4,83 ± 0,03 | 0,24 ± 0,01 | 23,61 ± 0,16 | 2,76 ± 0,02 | 0,02 ± 0,00 | 55,89 ± 0,17 | 10,27 ± 0,09 | 0,08 ± 0,00 | 1,65 ± 0,06 | 0,07 ± 0,00 |
| Lansing | 0,19 ± 0,00 | 1,51 ± 0,02 | 0,10 ± 0,00 | 13,67 ± 0,12 | 1,90 ± 0,03 | 0,02 ± 0,00 | 62,84 ± 0,21 | 15,89 ± 0,12 | 0,24 ± 0,00 | 3,50 ± 0,02 | 0,14 ± 0,00 |
| L. Espanha | 0,17 ± 0,00 | 1,31 ± 0,01 | 0,07 ± 0,00 | 11,80 ± 0,08 | 1,24 ± 0,02 | 0,02 ± 0,00 | 68,68 ± 0,04 | 11,93 ± 0,08 | 0,13 ± 0,01 | 4,52 ± 0,03 | 0,13 ± 0,01 |
| M. Bollwiller | 0,43 ± 0,01 | 4,38 ± 0,01 | 0,15 ± 0,01 | 22,18 ± 0,28 | 2,09 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 58,03 ± 0,07 | 9,37 ± 0,07 | 0,07 ± 0,01 | 3,17 ± 0,31 | 0,11 ± 0,00 |
| Morell | 0,12 ± 0,00 | 1,38 ± 0,11 | 0,05 ± 0,00 | 12,77 ± 0,21 | 1,30 ± 0,10 | 0,02 ± 0,00 | 68,16 ± 0,93 | 12,71 ± 0,34 | 0,15 ± 0,01 | 3,21 ± 0,42 | 0,10 ± 0,01 |
| Negreta | 0,30 ± 0,01 | 3,00 ± 0,11 | 0,13 ± 0,01 | 18,98 ± 0,48 | 2,21 ± 0,04 | 0,03 ± 0,00 | 61,45 ± 0,75 | 11,21 ± 0,18 | 0,11 ± 0,01 | 2,53 ± 0,02 | 0,06 ± 0,00 |
| Pauetet | 0,16 ± 0,01 | 1,51 ± 0,04 | 0,06 ± 0,00 | 13,67 ± 0,22 | 1,37 ± 0,02 | 0,02 ± 0,00 | 67,98 ± 0,31 | 11,57 ± 0,09 | 0,11 ± 0,00 | 3,48 ± 0,05 | 0,07 ± 0,00 |
| R. Piemont | 0,10 ± 0,00 | 1,12 ± 0,02 | 0,04 ± 0,00 | 11,53 ± 0,08 | 1,24 ± 0,02 | 0,02 ± 0,00 | 67,71 ± 0,02 | 13,41 ± 0,20 | 0,15 ± 0,01 | 4,53 ± 0,19 | 0,17 ± 0,01 |
| Segorbe | 0,15 ± 0,00 | 1,39 ± 0,02 | 0,07 ± 0,00 | 12,59 ± 0,17 | 1,36 ± 0,02 | 0,02 ± 0,00 | 68,40 ± 0,31 | 11,97 ± 0,08 | 0,12 ± 0,00 | 3,84 ± 0,04 | 0,09 ± 0,01 |
| St. M ^o Jesus | 0,17 ± 0,00 | 1,35 ± 0,02 | 0,06 ± 0,00 | 11,60 ± 0,13 | 1,12 ± 0,03 | 0,02 ± 0,00 | 68,43 ± 0,23 | 11,29 ± 0,15 | 0,10 ± 0,00 | 5,69 ± 0,04 | 0,15 ± 0,00 |
| T. de Giffoni | 0,05 ± 0,01 | 0,85 ± 0,02 | 0,03 ± 0,00 | 11,18 ± 0,36 | 0,99 ± 0,05 | 0,01 ± 0,00 | 69,97 ± 0,69 | 11,78 ± 0,42 | 0,08 ± 0,01 | 4,14 ± 0,28 | 0,32 ± 0,01 |
| Média | 0,21 | 1,95 | 0,09 | 14,81 | 1,52 | 0,02 | 65,34 | 12,02 | 0,12 | 3,74 | 0,13 |
| min - máx | 0,05 - 0,57 | 0,83 - 4,83 | 0,03 - 0,24 | 9,84 - 24,40 | 0,99 - 2,76 | 0,01 - 0,04 | 55,89 - 69,97 | 7,44 - 15,89 | 0,02 - 0,24 | 0,80 - 6,21 | 0,02 - 0,32 |
| Felgueiras | | | | | | | | | | | |
| Butler | 0,12 ± 0,01 | 1,09 ± 0,02 | 0,03 ± 0,00 | 10,22 ± 0,04 | 0,83 ± 0,01 | 0,01 ± 0,00 | 69,52 ± 0,22 | 11,04 ± 0,15 | 0,07 ± 0,00 | 6,82 ± 0,06 | 0,26 ± 0,00 |
| Camponica | 0,20 ± 0,00 | 1,70 ± 0,01 | 0,07 ± 0,00 | 13,80 ± 0,08 | 1,44 ± 0,03 | 0,03 ± 0,00 | 66,04 ± 0,16 | 11,43 ± 0,02 | 0,09 ± 0,00 | 5,02 ± 0,09 | 0,17 ± 0,01 |
| Cosford | 0,26 ± 0,01 | 2,10 ± 0,09 | 0,08 ± 0,01 | 12,92 ± 0,16 | 1,27 ± 0,03 | 0,02 ± 0,00 | 63,84 ± 0,37 | 12,54 ± 0,13 | 0,13 ± 0,00 | 6,56 ± 0,45 | 0,29 ± 0,02 |
| Couplat | 0,08 ± 0,00 | 0,67 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 9,43 ± 0,07 | 0,61 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 70,08 ± 0,07 | 10,18 ± 0,05 | 0,05 ± 0,00 | 8,56 ± 0,06 | 0,31 ± 0,01 |
| Ennis | 0,17 ± 0,00 | 1,27 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 10,93 ± 0,25 | 0,89 ± 0,09 | 0,01 ± 0,00 | 69,04 ± 0,44 | 12,16 ± 0,20 | 0,08 ± 0,01 | 5,22 ± 0,06 | 0,20 ± 0,00 |
| F. de Coutard | 0,34 ± 0,03 | 2,31 ± 0,07 | 0,11 ± 0,01 | 15,53 ± 0,14 | 1,49 ± 0,03 | 0,03 ± 0,00 | 66,91 ± 0,49 | 10,24 ± 0,16 | 0,08 ± 0,00 | 2,89 ± 0,21 | 0,08 ± 0,01 |
| L. Espanha | 0,25 ± 0,01 | 2,45 ± 0,03 | 0,09 ± 0,00 | 17,73 ± 0,05 | 1,65 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 65,34 ± 0,03 | 9,72 ± 0,04 | 0,07 ± 0,00 | 2,59 ± 0,05 | 0,08 ± 0,00 |
| M. Bollwiller | 0,31 ± 0,01 | 3,27 ± 0,01 | 0,07 ± 0,00 | 21,12 ± 0,30 | 1,52 ± 0,03 | 0,01 ± 0,00 | 61,35 ± 0,24 | 7,85 ± 0,11 | 0,02 ± 0,00 | 4,36 ± 0,11 | 0,13 ± 0,01 |
| Morell | 0,18 ± 0,02 | 2,05 ± 0,08 | 0,09 ± 0,01 | 15,84 ± 0,06 | 1,93 ± 0,08 | 0,04 ± 0,01 | 63,66 ± 0,62 | 12,42 ± 0,24 | 0,16 ± 0,02 | 3,49 ± 0,17 | 0,14 ± 0,02 |
| Negreta | 0,17 ± 0,00 | 1,65 ± 0,04 | 0,06 ± 0,00 | 14,14 ± 0,23 | 1,18 ± 0,03 | 0,02 ± 0,00 | 66,77 ± 0,60 | 10,37 ± 0,20 | 0,07 ± 0,01 | 5,84 ± 0,29 | 0,27 ± 0,01 |
| Pauetet | 0,13 ± 0,00 | 1,93 ± 0,05 | 0,09 ± 0,01 | 16,73 ± 0,22 | 2,09 ± 0,05 | 0,03 ± 0,00 | 62,20 ± 0,76 | 12,87 ± 0,13 | 0,14 ± 0,01 | 3,51 ± 0,30 | 0,27 ± 0,01 |
| Segorbe | 0,16 ± 0,01 | 1,38 ± 0,06 | 0,05 ± 0,00 | 12,56 ± 0,44 | 1,06 ± 0,04 | 0,02 ± 0,00 | 68,31 ± 0,15 | 10,80 ± 0,68 | 0,07 ± 0,01 | 5,43 ± 0,08 | 0,16 ± 0,00 |
| T. de Giffoni | 0,13 ± 0,01 | 1,61 ± 0,05 | 0,04 ± 0,00 | 15,02 ± 0,22 | 1,13 ± 0,03 | 0,01 ± 0,00 | 68,82 ± 0,24 | 9,08 ± 0,08 | 0,03 ± 0,00 | 4,02 ± 0,09 | 0,10 ± 0,00 |
| Média | 0,19 | 1,81 | 0,06 | 14,31 | 1,31 | 0,02 | 66,30 | 10,82 | 0,08 | 4,95 | 0,19 |
| min - máx | 0,08 - 0,34 | 0,67 - 3,27 | 0,02 - 0,11 | 9,43 - 21,12 | 0,61 - 2,09 | 0,01 - 0,04 | 61,35 - 70,08 | 7,85 - 12,87 | 0,02 - 0,16 | 2,59 - 8,56 | 0,08 - 0,31 |

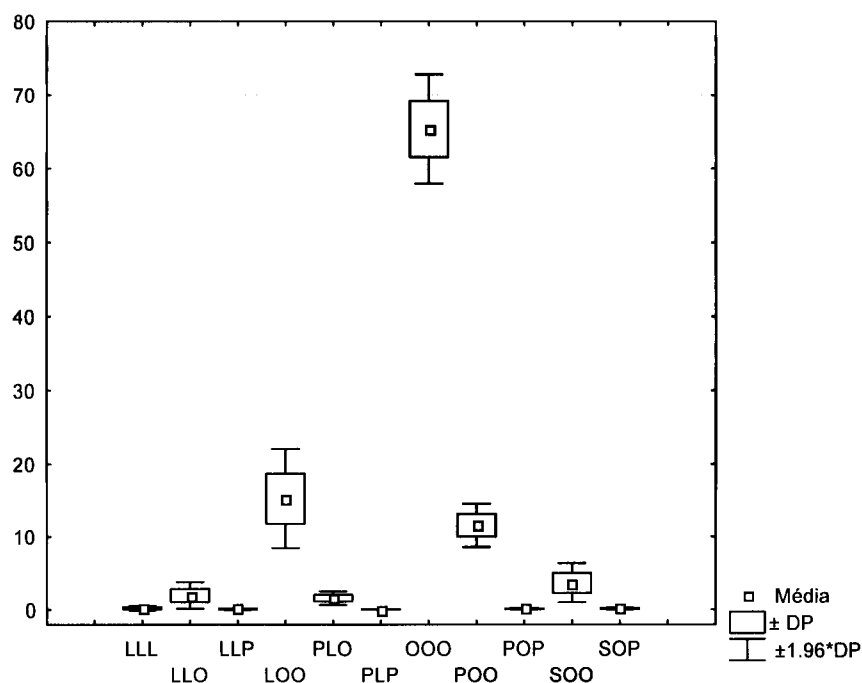


FIGURA 4.2. Diagrama de caixas e bigodes para os TAG determinados nas amostras de avelã (% relativa).

Encontram-se disponíveis na literatura outros trabalhos realizados anteriormente, relativos ao estudo da composição em TAG (% relativa) do óleo de avelã. Parcerisa *et al.* (1994, 1995a) em estudos realizados com detecção de Índice de Refracção (RI) e de espectrometria de massa (MS) (2000) referiu a obtenção de valores superiores de LLL (0,5 a 3,6%), OLL (1,8 a 10,8%), POL (2,7 a 6,5%) e PPO (0,7 a 2,4%), e valores substancialmente inferiores de OOO (32,5 a 57,0%) comparativamente aos valores obtidos neste trabalho. No entanto os valores apresentados na Tabela 4.2 são coerentes com os resultados relativos a outro trabalho realizado pelos mesmos autores (Parcerisa *et al.*, 1999), no qual a detecção dos compostos foi feita por ELSD. As diferenças encontradas podem ser devidas não só à diferente metodologia utilizada, como também ser decorrente da utilização de amostras diferentes. Os resultados obtidos neste trabalho são contudo coerentes com os referidos por Bernardo-Gil *et al.* (2002).

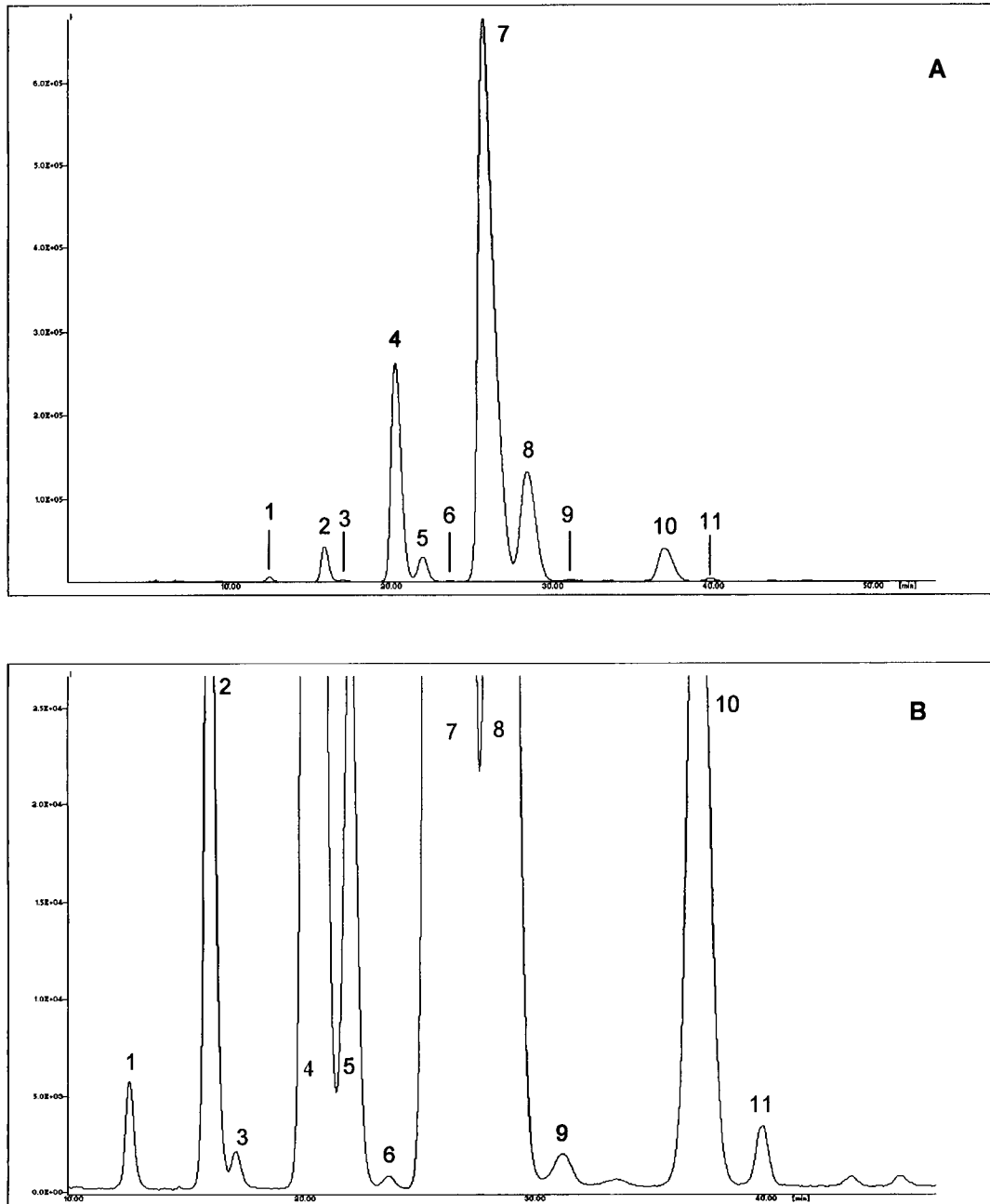


FIGURA 4.3. Cromatograma representativo do perfil de TAG de uma amostra de avelã (**A**: perspectiva global, **B**: ampliação da imagem A). Picos: **1**: LLL; **2**: OLL; **3**: PLL; **4**: OOL; **5**: POL; **6**: PPL; **7**: OOO; **8**: POO; **9**: PPO; **10**: SOO; **11**: PSO. (P: ácido palmítico; S: ácido esteárico; O: ácido oleico; L: ácido linoleico).

Atendendo às variações quantitativas verificadas para a maioria dos compostos, por exemplo os valores de OOL variaram entre 9,8% e 24,4%, procedeu-se à análise estatística dos resultados obtidos, de forma a verificar diferenças significativas relacionadas com os factores estudados.

Para avaliar a influência do ano de produção, efectuaram-se testes MANOVA e Hotelling T^2 , considerando apenas os resultados obtidos ao longo dos três anos de estudo para as cultivares provenientes de Vila Real, e tendo como factor agrupante o ano de produção. Uma vez que os resultados obtidos nos testes referidos demonstraram diferenças significativas entre todos os grupos comparados, efectuaram-se testes *t*-Student de forma a determinar quais os compostos responsáveis pelas referidas diferenças (Tabela 4.3).

TABELA 4.3. Testes MANOVA, Hotelling T^2 e *t*-Student relativos às diferenças entre anos de produção em termos da composição em TAG da fracção lipídica da avelã.

| RESUMO DO TESTE MANOVA | | | |
|---|--|---|--------------------|
| Wilks' Lambda = 0,27168; F(22.310) = 12,943; p<0,0000 | | | |
| RESUMO DOS TESTES HOTELLING T^2 E <i>t</i> -STUDENT | | | |
| | 2001 | 2002 | 2003 |
| 2001 | ----- | OLL, PLL, OOL, POL, PPL, OOO, POO, PPO, SOO | PPL, POO, PPO |
| 2002 | $T^2 = 88,4642$; F(11.102) = 7,3241 p< 0,00000 | ----- | POL, PPL, SOO, SPO |
| 2003 | $T^2 = 212,599$; F(11.99) =17,554 p<0,0000 | $T^2 =212,860$; F(11.99) = 17,576 p<0,00000 | ----- |

Triângulo inferior: valores de F_{obs} (Hotelling T^2) e nível de significância; triângulo superior: TAG para os quais os valores de t_{obs} são significativos (p<0,05). P: ácido palmítico; S: ácido esteárico; O: ácido oleico; L: ácido linoleico.

A influência da cultivar, do ano de produção e da localidade geográfica, foi já estudada por Parcerisa *et al.* (1994, 1995a), envolvendo contudo um número inferior de cultivares do que as utilizadas neste trabalho. Em ambos os estudos (Parcerisa *et al.* 1994, 1995a), a avaliação de diferenças significativas foi feita através a realização de “two-way ANOVAs”. Os autores referiram a existência de diferenças significativas relativamente à maioria dos TAG, relacionadas com o ano de produção e a localidade geográfica, apesar de poucas diferenças terem sido encontradas entre as cultivares. No entanto, sabe-se actualmente que este tipo de abordagem estatística pode levar a resultados demasiado optimistas, uma vez que não entram em consideração com os efeitos indesejáveis de colinearidades (Naes e Indhal, 1998; Alves e Oliveira, 2004; Alves *et al.*, 2005). Neste trabalho, realizou-se a análise estatística multivariada dos dados, com o objectivo de obter uma imagem global das diferenças entre as cultivares e analisar as influências do ano de produção e da localização geográfica, por forma a concluir se existem, ou não, diferenças significativas em termos da composição de TAG.

De forma a avaliar a influência do ano de produção, procedeu-se à análise discriminante (DA) dos dados obtidos durante 3 anos consecutivos em Vila Real, tendo-se seleccionados 5 TAG como os mais discriminantes. Seguidamente, fez-se uma análise de variáveis canónicas (CVA) com base nos TAG seleccionados; e as diferenças obtidas entre grupos foram representadas num gráfico de variáveis canónicas (Figura 4.4), no qual a primeira dimensão representa 69,5% da informação contida nos dados. A Figura 4.4 permite verificar que, apesar de um considerável número de amostras apresentar composições em TAG similares, podem ser apontadas algumas diferenças entre grupos de amostras pertencentes a cada um dos três anos. Nomeadamente, observa-se que um grupo de amostras colhidas em 2003 se separa das restantes ao longo da primeira dimensão do gráfico, reflectindo o facto de estas avelãs apresentarem, regra geral, teores superiores em SOO e inferiores em PLO comparativamente às amostras de 2001 e 2002. A segunda dimensão descreve as diferenças em termos da composição em POO, PLL e OOL e permite verificar a existência de um grupo de amostras pertencentes a 2001 que se diferenciam das restantes por apresentarem teores inferiores em OOL, PLL e POO.

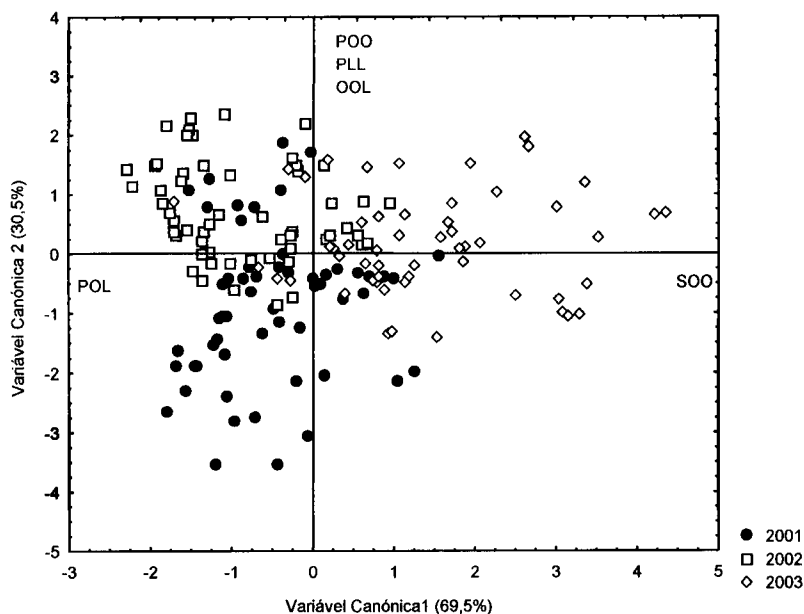


FIGURA 4.4. Resultados da CVA relativos à composição em TAG da avelã, tendo o ano como factor agrupante e realizada com base nas variáveis seleccionadas mediante a DA (as percentagens referem o total da informação explicada por cada dimensão canónica).

Tal como referido no capítulo anterior, as diferenças entre anos de produção poderão estar ligadas à existência de diferenças climáticas entre os anos estudados, sugerindo desta forma que, tal como a composição em AG, a composição em TAG pode ser influenciada por factores climáticos.

A influência de factores genéticos foi avaliada de forma idêntica à referida no capítulo anterior (Perfil em Ácidos Gordos), isto é, procedeu-se à análise estatística dos dados de

forma a verificar diferenças relativamente à origem das cultivares. Para tal, utilizou-se a origem das cultivares como factor agrupante tendo-se considerado os quatro grupos descritos no Capítulo 3. Para facilidade de consulta, descrevem-se novamente os grupos formados: USA (cvs. Butler, Ennis e Lansing), Itália (cvs. Campanica, Round du Piemont, Santa Maria de Jesus e Tonda di Giffoni), Espanha (cvs. Couplat, Grossal, Morell, Negreta e Pauetet) e um grupo denominado “Outras”, compreendendo uma cultivar de origem Francesa (cv. Fertile de Coutard), cultivares Inglesas (cvs. Cosford, Daviana, Longue d’Espanha) e Alemãs (cvs. Gunslebert e Merveille de Bollwiller).

Após selecção dos TAG com maior poder discriminante, realizou-se uma CVA, obtendo-se o gráfico da Figura 4.5A, o qual condensou 80% da informação contida nos dados. Apesar de se visualizarem algumas diferenças, conclui-se ser difícil explicar com detalhe as diferenças entre cultivares, pois as variações existentes dentro de um mesmo grupo, (possivelmente devidas à variação inerente aos anos de produção), fazem aumentar a variabilidade dentro dos grupos e, conseqüentemente, minimizam e/ou mascaram as diferenças entre grupos. Assim, optou-se pela realização de DA “forward stepwise” individualmente para cada ano de produção, almejando a separação do efeito “ano de produção” daquele relacionado com a “origem das cultivares”. As Figuras 4.5B, 4.5C e 4.5D mostram, respectivamente, os resultados obtidos relativamente aos anos 2001, 2002 e 2003.

Em geral, apesar das cultivares Italianas apresentarem uma maior dispersão de resultados, e as cultivares Espanholas estarem bastante próximas de outros grupos, as diferenças entre os quatro grupos considerados tornaram-se mais evidentes. Em 2001, o grupo “Outras” apresentou teores superiores de LLL e OOL, e teores inferiores de POO e SOO, enquanto que o oposto se verificou para o grupo “USA”. Em 2002, o grupo “Outras” apresentou teores superiores de OOL, OLL e LLL, e teores inferiores de POO e POL; o grupo das cultivares Italianas apresentou teores superiores de POO e, regra geral, as cultivares Americanas e Espanholas eram mais ricas em POL. Em 2003, na generalidade, o grupo “Outras” apresentou teores mais elevados de PLL e OOL; o grupo “USA” apresentou teores superiores de POL e algumas das suas cultivares apresentaram ainda teores superiores de PPO e PSO; o grupo “Espanha”, parece apresentar características intermédias das dos restantes grupos, uma vez que se dispõe no centro do gráfico; as cultivares Italianas apresentaram resultados mais dispersos, isto é, menos homogéneos, tendo alguns teores superiores de OOO, enquanto que outras foram superiores em PPO e PSO. Comparativamente com os restantes grupos, o grupo “Outras” apresentou teores superiores de TAG com moléculas de ácido linoleico na sua composição. Os resultados parecem ainda indicar que as cultivares americanas tendencialmente apresentam teores superiores de TAG com moléculas de AG saturados na sua composição. Estes resultados vão de encontro aos obtidos na análise estatística dos dados referentes à composição em AG, apresentada no capítulo anterior.

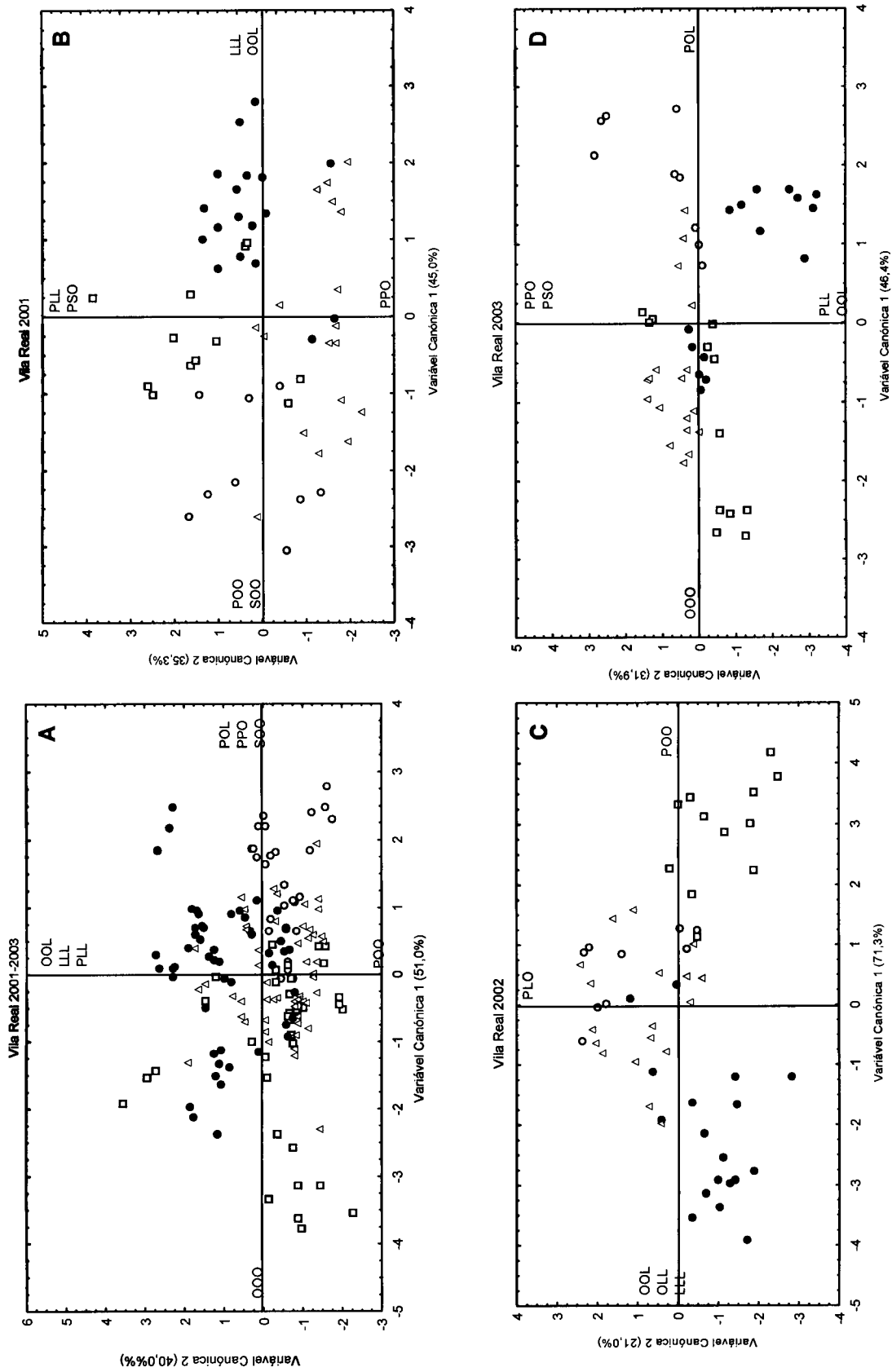


FIGURA 4.5. Resultados da CVA relativa à composição em TAG da avelã tendo a origem das cultivares como factor agrupante. **A:** CVA considerando simultaneamente os três anos de amostragem em Vila Real; **B:** CVA considerando apenas os dados de 2001; **C:** CVA considerando apenas os dados de 2002; **D:** CVA considerando os dados de 2003. Símbolos: ○:USA; □: Itália; △: Espanha; ●: "Outras".

As diferentes cultivares podem ser enquadradas em três grupos com base em determinadas características, tais como o tamanho, a forma, o aspecto do “miolo” e da casca: avelãs de mesa, de indústria ou de dupla aptidão (Bergougnoux *et al.*, 1978; Projecto AGRO 162, *in press*). As avelãs de mesa destinam-se a ser consumidas cruas, ao passo que as avelãs de indústria são usadas como ingrediente na produção de vários produtos como bolos, cereais, “snacks”, gelados, cremes para barrar e chocolates. As avelãs de dupla aptidão, como o nome indica, podem ser utilizadas de ambas as formas. As avelãs para a indústria são usualmente submetidas a um processo de torra, com o objectivo de melhorar o seu aroma e sabor. Consequentemente, este processo permite mascarar possíveis sabores a ranço. Pelo contrário, este tipo de sabores é mais facilmente detectados em avelãs de mesa, uma vez que estas se destinam a ser consumidas cruas.

Considerando que a composição em AG, bem como a sua distribuição nos TAG, pode afectar a estabilidade lipolítica e oxidativa dos óleos e gorduras (Cichon, 2003), os dados obtidos parecem indicar que as cultivares de origem Americana, poderão ser menos susceptíveis a fenómenos de ranço, uma vez que, na generalidade, foram as cultivares com menor teor em TAG com ácido linoleico e com maior teor em TAG com AG saturados. De forma idêntica, no capítulo anterior, vimos que as cultivares americanas apresentavam tendencialmente teores de ácido palmítico superiores aos valores médios das restantes cultivares. Consequentemente, segundo os resultados obtidos, estas cultivares seriam as mais adequadas a serem consumidas cruas, o que está de acordo com a sua utilização comum, uma vez que as cultivares Butler, Ennis e Lansing são consideradas avelãs de mesa. Pelo contrário, a composição em TAG apresentada pela maioria das amostras pertencentes ao grupo “Outras”, parece apontar para a sua maior susceptibilidade a desenvolver fenómenos de ranço. Novamente os resultados obtidos são coerentes com o uso destas cultivares, muitas vezes originário de conhecimentos empíricos, uma vez que estas cultivares, sendo por vezes utilizadas como avelãs de mesa, são contudo maioritariamente consideradas como avelãs de dupla aptidão, e como tal frequentemente destinadas a uso industrial.

De forma a avaliar possíveis diferenças relacionadas com a localização geográfica procedeu-se à análise estatística, mediante a realização de uma análise DA “forward-stepwise” seguida de uma CVA, dos dados obtidos para as cultivares comuns às duas localizações (Felgueiras e Vila Real) nos anos 2002 e 2003. O gráfico obtido encontra-se representado na Figura 4.6. Constata-se que existe um número considerável de amostras provenientes das duas localizações geográficas cujas composições em TAG são similares. Apesar de um grupo de amostras pertencentes a Vila Real se diferenciar devido ao seu teor superior em PPO e inferior em LLL e SOO, estas diferenças estatísticas são pouco significativas, de um ponto de vista prático. Apesar de SOO existir em quantidades moderadas, LLL e PPO existem em quantidades quase vestigiais nas amostras, e por essa

razão compreende-se que diferenças quantitativas mínimas entre as amostras se tornem estatisticamente muito relevantes.

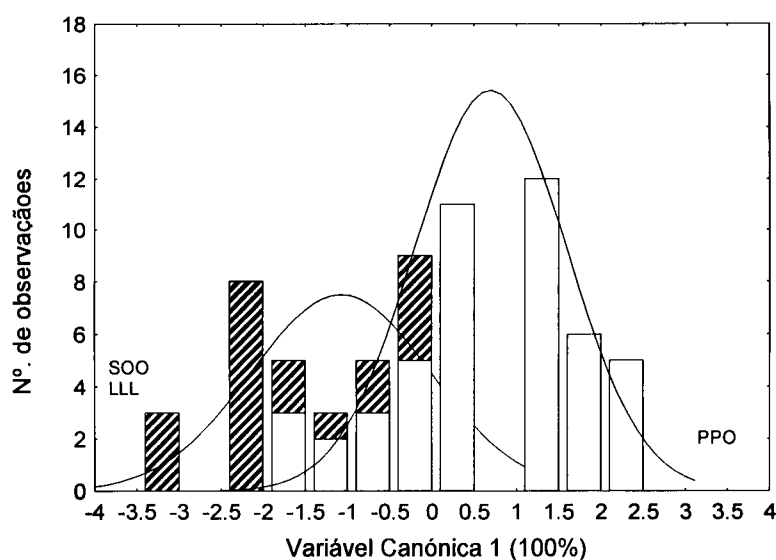


FIGURA 4.6. Resultados da análise CVA tendo a localização geográfica como factor agrupante.

▨: Felgueiras; □: Vila Real.

5.2 Nogueira

Apesar de existirem diversos estudos sobre outros componentes da fracção lipídica da noz, são escassos os trabalhos realizados referentes à sua composição em TAG, e tanto quanto é permitido saber, até à data, apenas foi estudado o seu perfil qualitativo (Ayorinde *et al.*, 1999).

Na matriz noz foram identificados e quantificados nove TAG: LLnLn, LLLn, LLL, OLLn, PLLn, OLL, PLL, OOL e POL (P: ácido palmítico; O: ácido oleico; L: ácido linoleico; Ln: ácido α -linolénico). Também foi detectada a presença de PLnLn em algumas amostras, mas apenas em quantidades vestigiais, não tendo sido por isso quantificado. Apesar de detectado na maioria das amostras, não se procedeu à quantificação de OOO devido a efeitos frequentes de "peak broadening". Com base no perfil de ácidos gordos obtido para as mesmas amostras, pode-se inferir da existência provável de SLL. No entanto, devido ao facto de ter ECN idêntico a POL pode ter ocorrido co-eluição destes dois compostos. Saliente-se neste ponto, a separação, apesar de não ser completa, conseguida para os compostos LLL e OLLn, uma vez que, como é descrito por Andrikopoulos (2002) num artigo de revisão, estes dois compostos frequentemente co-eluem devido ao facto de serem um par crítico, isto é, terem o mesmo ECN.

A Figura 4.7 mostra um cromatograma típico de uma amostra de noz obtido pela aplicação das condições experimentais anteriormente descritas. O perfil qualitativo obtido neste trabalho é consistente com o perfil descrito por Ayorinde *et al.* (1999) no seu estudo realizado com espectrometria de massa MALDI-TOF.

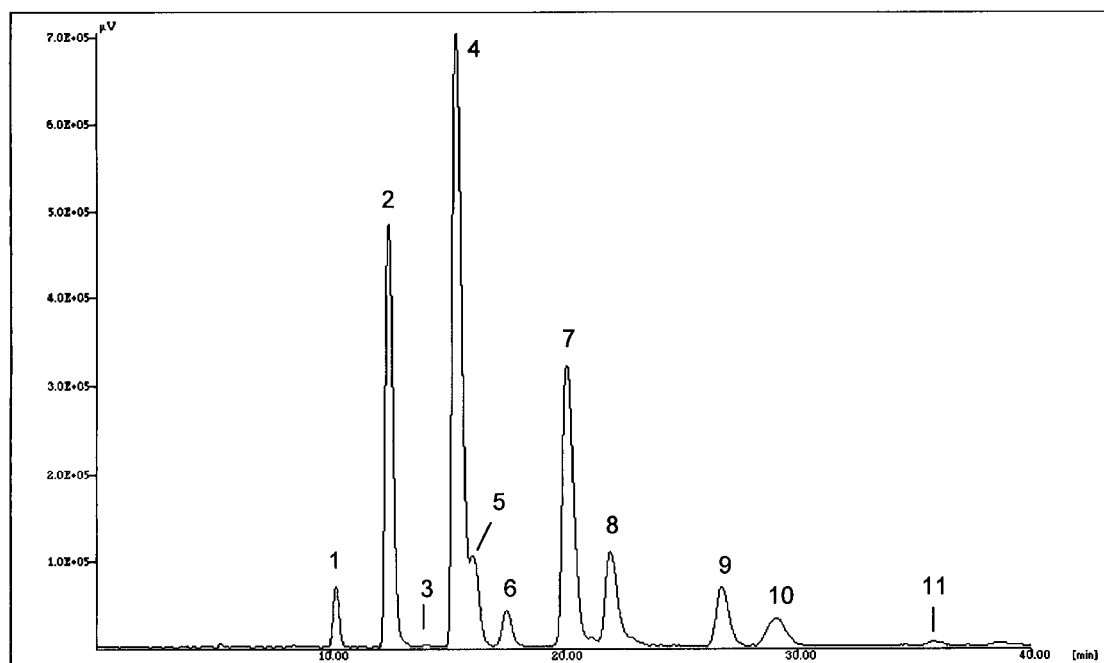


FIGURA 4.7. Cromatograma representativo do perfil de triacilgliceróis de uma amostra de noz. 1: LLnLn; 2: LLn; 3: PLnLn; 4: LLL; 5: OLLn; 6: PLLn; 7: OLL; 8: PLL; 9: OOL; 10: POL; 11: OOO.

Os valores médios obtidos para cada cultivar, ano de produção e localização geográfica, apresentam-se na Tabela 4.4. Como anteriormente foi referido, todas as amostras apresentaram um perfil qualitativo característico, composto por nove compostos.

Em todas as amostras analisadas, LLL foi o TAG maioritário (32,2 a 44,3%; 37,7% valor médio), seguindo-se o OLL (13,7 a 27,6%; 18,5% valor médio) e o LLLn (12,1 a 23,5%; 18,4 % valor médio). Em algumas amostras o segundo TAG maioritário foi o OLL, ao passo que em outras foi o LLLn. Considerando os TAG quantificados, é de salientar que todos eles incluem pelo menos uma molécula de ácido linoleico na sua composição. Os dados obtidos para a composição em TAG da matriz noz, são por isso consistentes com a composição em AG obtida para as mesmas amostras, na qual o ácido linoleico perfaz, em média, cerca de 60% do teor total de AG (ver Capítulo 3).

TABELA 4.4. Composição em triacilgliceróis (% relativa) das cultivares de nozes estudadas, por ano de produção e localização geográfica.

| Cultivar | Triacilgliceróis | | | | | | | | |
|------------------|------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| | LLnLn | LLLn | LLL | OLLn | PLLn | OLL | PLL | OOL | PLO |
| Ano: 2001 | | | | | | | | | |
| Bragança | | | | | | | | | |
| Franquette | 2,09 ± 0,07 | 19,99 ± 0,17 | 34,64 ± 0,13 | 4,64 ± 0,20 | 3,14 ± 0,17 | 17,19 ± 0,24 | 10,62 ± 0,37 | 3,06 ± 0,11 | 4,22 ± 0,04 |
| Lara | 1,85 ± 0,04 | 20,79 ± 0,69 | 39,15 ± 0,58 | 4,72 ± 0,44 | 2,10 ± 0,09 | 16,65 ± 0,28 | 9,13 ± 0,18 | 2,54 ± 0,07 | 2,80 ± 0,20 |
| Marbot | 1,74 ± 0,16 | 18,85 ± 0,22 | 39,00 ± 0,36 | 4,43 ± 0,03 | 2,38 ± 0,11 | 17,88 ± 0,28 | 9,58 ± 0,16 | 2,58 ± 0,01 | 3,45 ± 0,04 |
| Mayette | 2,69 ± 0,04 | 23,46 ± 0,35 | 39,24 ± 0,39 | 4,23 ± 0,35 | 3,00 ± 0,17 | 14,11 ± 0,18 | 8,91 ± 0,27 | 1,61 ± 0,08 | 2,56 ± 0,04 |
| Mellanaise | 0,86 ± 0,01 | 13,64 ± 0,51 | 38,42 ± 0,45 | 4,60 ± 0,35 | 1,47 ± 0,04 | 22,76 ± 0,62 | 8,25 ± 0,15 | 5,72 ± 0,16 | 4,07 ± 0,22 |
| Parisienne | 1,24 ± 0,04 | 16,44 ± 0,36 | 44,26 ± 0,12 | 3,74 ± 0,23 | 1,48 ± 0,07 | 18,82 ± 0,38 | 7,80 ± 0,34 | 2,99 ± 0,07 | 3,19 ± 0,07 |
| Ano: 2002 | | | | | | | | | |
| Bragança | | | | | | | | | |
| Franquette | 2,12 ± 0,15 | 19,00 ± 0,30 | 35,37 ± 0,28 | 5,62 ± 0,37 | 2,00 ± 0,06 | 19,81 ± 0,44 | 7,48 ± 0,07 | 4,63 ± 0,10 | 3,27 ± 0,09 |
| Lara | 1,00 ± 0,01 | 16,36 ± 0,49 | 41,38 ± 0,98 | 4,42 ± 0,23 | 1,30 ± 0,10 | 20,52 ± 0,86 | 6,82 ± 0,58 | 4,48 ± 0,03 | 3,56 ± 0,09 |
| Marbot | 0,82 ± 0,11 | 12,67 ± 0,15 | 38,46 ± 0,06 | 3,87 ± 0,22 | 1,28 ± 0,15 | 23,35 ± 0,19 | 7,94 ± 0,01 | 6,24 ± 0,05 | 4,32 ± 0,16 |
| Mayette | 0,98 ± 0,07 | 13,65 ± 1,21 | 38,33 ± 1,04 | 4,57 ± 0,20 | 1,09 ± 0,01 | 22,93 ± 0,93 | 6,51 ± 0,26 | 7,59 ± 0,44 | 3,48 ± 0,31 |
| Mellanaise | 0,93 ± 0,02 | 15,18 ± 0,46 | 39,62 ± 0,41 | 4,03 ± 0,12 | 1,44 ± 0,01 | 20,91 ± 0,14 | 7,87 ± 0,20 | 4,87 ± 0,19 | 4,47 ± 0,49 |
| Parisienne | 0,61 ± 0,03 | 12,10 ± 0,05 | 32,15 ± 0,29 | 5,32 ± 0,12 | 0,71 ± 0,08 | 27,57 ± 0,36 | 4,83 ± 0,10 | 11,49 ± 0,25 | 3,61 ± 0,02 |
| Ano: 2003 | | | | | | | | | |
| Bragança | | | | | | | | | |
| Franquette | 1,85 ± 0,08 | 17,32 ± 0,27 | 33,21 ± 0,55 | 5,56 ± 0,28 | 3,18 ± 0,20 | 18,36 ± 0,17 | 11,04 ± 0,12 | 4,24 ± 0,23 | 4,53 ± 0,31 |
| Lara | 2,56 ± 0,05 | 22,74 ± 0,93 | 40,85 ± 1,06 | 3,69 ± 0,24 | 2,70 ± 0,24 | 13,73 ± 0,27 | 8,77 ± 0,60 | 1,75 ± 0,22 | 2,96 ± 0,22 |
| Marbot | 1,81 ± 0,07 | 20,49 ± 2,64 | 37,79 ± 1,91 | 5,59 ± 0,58 | 2,40 ± 0,19 | 16,03 ± 0,58 | 9,42 ± 0,02 | 2,61 ± 0,18 | 3,64 ± 0,30 |
| Mayette | 2,44 ± 0,14 | 20,77 ± 0,14 | 35,77 ± 0,43 | 5,24 ± 0,30 | 3,47 ± 0,12 | 14,94 ± 0,27 | 11,00 ± 0,12 | 2,44 ± 0,12 | 3,67 ± 0,39 |
| Mellanaise | 1,80 ± 0,12 | 18,14 ± 0,32 | 36,98 ± 0,58 | 4,74 ± 0,55 | 2,54 ± 0,16 | 18,26 ± 0,07 | 9,34 ± 0,33 | 4,29 ± 0,14 | 3,50 ± 0,29 |
| Parisienne | 1,01 ± 0,10 | 14,00 ± 0,24 | 34,91 ± 0,35 | 5,05 ± 0,06 | 2,01 ± 0,13 | 21,69 ± 0,37 | 10,25 ± 0,12 | 5,78 ± 0,39 | 4,60 ± 0,14 |
| Coimbra | | | | | | | | | |
| Arco | 2,60 ± 0,27 | 22,64 ± 0,69 | 36,70 ± 0,18 | 5,33 ± 0,49 | 2,86 ± 0,26 | 15,84 ± 0,46 | 7,98 ± 0,13 | 2,66 ± 0,16 | 3,13 ± 0,24 |
| Franquette | 1,14 ± 0,03 | 16,28 ± 0,16 | 40,43 ± 0,75 | 5,81 ± 0,30 | 1,46 ± 0,08 | 19,89 ± 0,62 | 7,51 ± 0,70 | 4,26 ± 0,31 | 3,20 ± 0,13 |
| Hartley | 1,93 ± 0,18 | 19,77 ± 0,63 | 34,70 ± 0,99 | 6,07 ± 0,15 | 2,60 ± 0,17 | 17,83 ± 0,43 | 9,72 ± 0,29 | 3,33 ± 0,33 | 3,76 ± 0,28 |
| Lara | 2,03 ± 0,08 | 21,47 ± 0,53 | 40,23 ± 0,64 | 4,70 ± 0,24 | 2,23 ± 0,16 | 14,76 ± 0,33 | 9,15 ± 0,52 | 1,98 ± 0,12 | 3,31 ± 0,14 |
| Mayette | 2,02 ± 0,06 | 20,20 ± 0,73 | 37,15 ± 0,67 | 5,39 ± 0,32 | 2,66 ± 0,10 | 16,48 ± 0,32 | 10,20 ± 0,64 | 2,53 ± 0,15 | 3,32 ± 0,27 |
| Mellanaise | 1,44 ± 0,05 | 17,32 ± 0,42 | 35,83 ± 0,61 | 5,65 ± 0,13 | 2,05 ± 0,13 | 20,02 ± 0,03 | 9,47 ± 0,23 | 3,68 ± 0,29 | 4,31 ± 0,38 |
| Parisienne | 1,65 ± 0,12 | 18,71 ± 0,64 | 35,81 ± 0,09 | 5,64 ± 0,26 | 2,15 ± 0,17 | 18,60 ± 0,45 | 9,21 ± 0,57 | 3,96 ± 0,20 | 3,96 ± 0,28 |
| Rego | 2,71 ± 0,19 | 23,11 ± 0,63 | 38,87 ± 0,53 | 5,35 ± 0,03 | 1,96 ± 0,14 | 14,55 ± 0,52 | 7,42 ± 0,18 | 2,71 ± 0,18 | 2,66 ± 0,31 |

Com o objectivo de avaliar as possíveis influências exercidas por factores genéticos, climáticos e geográficos, procedeu-se à análise estatística dos dados obtidos.

Inicialmente averiguou-se a existência de diferenças significativas, em termos da composição em TAG, que pudessem estar associadas a factores climáticos. Para tal, numa primeira abordagem, realizou-se uma análise de variância (MANOVA) com os resultados de amostras provenientes da mesma localidade (Bragança), considerando as mesmas cultivares, provenientes do mesmo campo, recolhidas das mesmas árvores em três anos de colheita consecutivos e utilizando como factor agrupante o ano de produção. Os resultados obtidos evidenciam diferenças significativas entre os grupos (Tabela 4.5). Subsequentemente, realizaram-se sucessivos testes Hotelling T^2 comparando os anos de produção dois-a-dois (Tabela 4.5). Os resultados revelaram que todos os grupos considerados, isto é, os anos de produção, são estatisticamente diferentes.

TABELA 4.5. Resultados relativos aos testes MANOVA e Hotelling T^2 para determinação da significância das diferenças observadas entre anos relativas à composição em TAG das nozes.

| RESUMO DO TESTE MANOVA | | | |
|---|--|---|-------------------------------------|
| Wilks' Lambda = 0,12486; $F_{(18,86)} = 8,7436$; $p < 0,0000$ | | | |
| RESUMO DOS TESTES HOTELLING T^2 E t-STUDENT | | | |
| | 2001 | 2002 | 2003 |
| 2001 | ----- | LLnLn, LLLn, PLLn, OLL, PLL, OOL, PLO | LLL, OLLn, PLLn, PLL, PLO |
| 2002 | $T^2 = 135,421$; $F_{(9,26)} = 11,506$ $p < 0,00000$ | ----- | LLnLn, LLLn, PLLn, OLL, PLL, OOL |
| 2003 | $T^2 = 112,196$; $F_{(9,26)} = 9,5330$ $p < 0,00000$ | $T^2 = 250,139$; $F_{(9,26)} = 21,254$ $p < 0,0000$ | ----- |

Triângulo inferior: valores de F_{obs} (Hotelling T^2) e nível de significância; triângulo superior: TAG para os quais os valores de t_{obs} são significativos ($p < 0,05$).

Numa segunda abordagem, de modo a ter uma imagem global das diferenças existentes, efectuou-se uma DA “forward stepwise” de modo a seleccionar os TAG mais discriminantes. Com base nos TAG seleccionados, realizou-se uma análise CVA de forma a permitir a visualização das diferenças entre os grupos considerados. A Figura 4.8 mostra o gráfico obtido, o qual condensa as informações das MANOVAs, DA e CVA, sendo que 81,7% das informações contidas nos dados encontra-se representada na primeira dimensão (CV_1), e os restantes 18,3% são representados na segunda dimensão (CV_2). Constata-se que o ano

2002 se separa ligeiramente dos restantes na primeira dimensão, reflectindo o facto de as amostras de nozes colhidas em 2002 apresentarem simultaneamente teores superiores de OLL e OOL, e inferiores em LLnLn e PLL. A segunda dimensão expressa o facto de que, na maioria dos casos, as nozes colhidas em 2001 apresentaram teores inferiores de OLLn, PLO e OOL quando comparadas com as nozes obtidas em 2003. A grande dispersão de resultados dentro de cada grupo dificulta a análise dos dados, uma vez que poderá mascarar possíveis diferenças existentes entre grupos. Como se pode verificar na Figura 4.8, apesar de os três grupos não estarem perfeitamente separados, existe alguma distinção entre eles, o que sugere a influência de factores climáticos, se bem que pouco intensa, relativamente à composição em TAG das nozes.

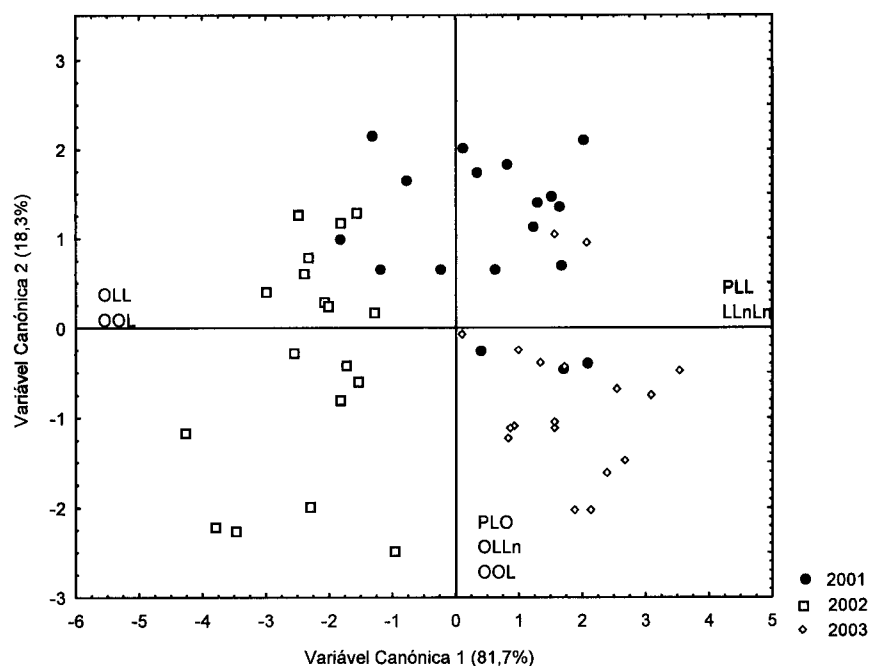


FIGURA 4.8. Resultados da CVA relativamente à composição em TAG da fracção lípida da noz, tendo o ano como factor agrupante.

De forma a avaliar a influência da cultivar relativamente à composição em TAG, procedeu-se a uma abordagem estatística semelhante à descrita anteriormente, tendo as cultivares como factor agrupante. A Tabela 4.6 mostra os resultados relativos aos testes MANOVA, Hotelling T^2 e t -Student, os quais demonstram que várias das cultivares estudadas apresentam diferenças significativas no que respeita à sua composição em TAG. É o caso das cvs. Franquette e Lara, que se diferenciam da maioria das restantes cultivares, enquanto que outras (principalmente as cultivares Marbot, Mayette, Mellanaise e Parisienne) parecem ser mais idênticas entre si. Apesar da variabilidade de resultados dentro de cada grupo (Figura 4.8) poder indiciar a existência de diferenças entre as cultivares verificou-se que, de facto existem diferenças entre as cultivares dentro de um mesmo ano, mas que não são lineares de ano para ano. Quando os resultados globais (2001-2003) são analisados estatisticamente, verifica-se que a composição média em TAG do óleo da cv. Parisienne

parece ser similar à das cvs. Marbot, Mayette e Mellanaise, assim como a cv. Mellanaise parece ser ainda idêntica às cvs. Marbot e Mayette.

TABELA 4.6. Resultados dos teste Hotelling T^2 e t -Student para determinação do nível de significância das diferenças em termos da composição de TAG observadas entre cultivares de noz.

| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 |
|-----------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|---|
| C1 | ---- | LLL, OLLn, PLLN, PLL, OOL, POL | LLnLn, LLL, PLLn | LLnLn, LLLn, LLL | LLL, OLLn | LLnLn, LLLn, PLLn, OLL, PLL, OOL, POL |
| C2 | $F_{(9,8)} = 44,743$ $p < 0,00001$ | ---- | LLL, POL | LLn, LLL, OOLn, OOL, POL | LLL | LLnLn, LLLn, PLLn, OLL, OOL, POL |
| C3 | $F_{(9,8)} = 29,912$ $p < 0,00003$ | $F_{(9,8)} = 7,2325$ $p < 0,00524$ | ---- | - | - | LLnLn, LLLn, PLLn, OLL |
| C4 | $F_{(9,8)} = 4,7261$ $p < 0,01973$ | $F_{(9,8)} = 15,557$ $p < 0,00037$ | $F_{(9,8)} = 8,2646$ $p < 0,00337$ | ---- | OLLn | - |
| C5 | $F_{(9,8)} = 25,148$ $p < 0,00006$ | $F_{(9,8)} = 2,2208$ $p < 0,1375$ | $F_{(9,8)} = 2,3582$ $p < 0,12062$ | $F_{(9,8)} = 1,8165$ $p < 0,20635$ | ---- | LLnLn, LLLn, PLLn, OLL, OOL |
| C6 | $F_{(9,8)} = 94,314$ $p < 0,00000$ | $F_{(9,8)} = 13,113$ $p < 0,00063$ | $F_{(9,8)} = 3,0804$ $p < 0,06392$ | $F_{(9,8)} = 0,50041$ $p < 0,83870$ | $F_{(9,8)} = 2,6280$ $p < 0,09417$ | ---- |

Triângulo inferior: valores de F_{obs} (Hotelling T^2) e nível de significância; triângulo superior: TAG para os quais os valores de t_{obs} são significativos ($p < 0,05$).

De forma a não considerar demasiados factores de variação simultaneamente, a análise anterior realizou-se apenas com os dados relativos às cultivares provenientes de Bragança, durante os três anos consecutivos, explicando-se assim a ausência das cultivares Arco, Hartley e Rego na Tabela 4.6, uma vez que estas cultivares são provenientes de Coimbra. Por outro lado, apenas se obtiveram dados destas amostras no ano 2003, o que dificulta a comparação estatística destas amostras com as restantes. A realização de testes ANOVA, bem como a observação dos dados da Tabela 4.4 sugerem que as cultivares Arco e Rego se diferenciam das demais, o que poderá estar relacionado com o facto destas cultivares serem Portuguesas, enquanto que as demais são maioritariamente Francesas (com excepção da cv. Hartley que é Americana). Comparativamente às restantes amostras de Coimbra, estas cultivares apresentaram teores de LLnLn cerca de 1% superiores, e valores de LLLn cerca de 2 a 6% superiores, o que se poderá traduzir em teores superiores de ácido α -linolénico na ordem de 1 a 2,4%. No entanto, uma vez que só foram obtidas amostras destas cultivares relativas a um ano de produção (2003), aconselha-se a realização de mais estudos de modo a comprovar se este padrão diferencial relativamente às restantes cultivares se mantém. A cv. Hartley apresentou semelhanças com as cvs. com as cvs. Mayette, Mellanaise e Parisienne ($p > 0,05$).

A Figura 4.9, expressa os resultados apresentados na Tabela 4.6, permitindo uma visualização global dos resultados. Os TAG representados junto aos eixos são importantes para a compreensão dos resultados, pois sendo os mais discriminantes, representam as principais fontes de variação quando as cultivares são consideradas em conjunto.

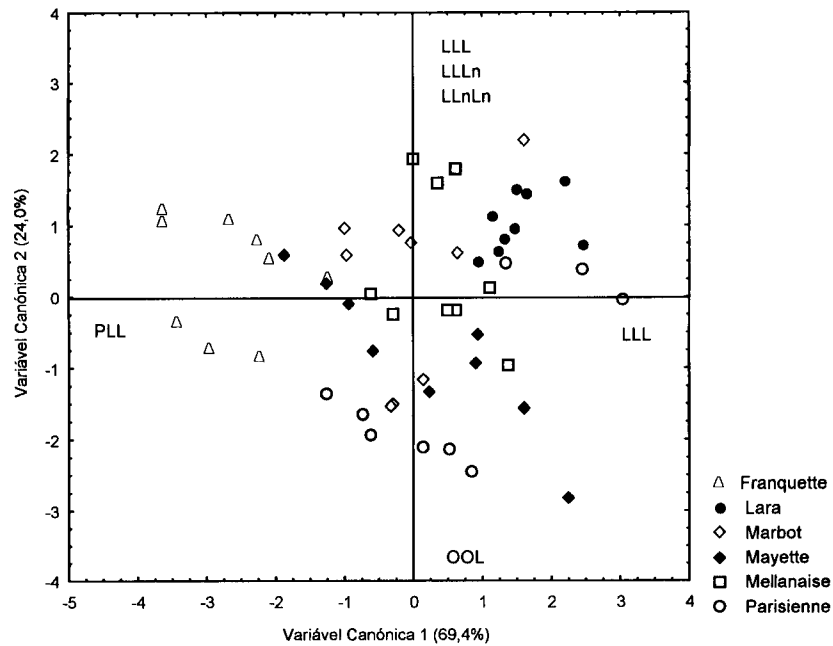


FIGURA 4.9. Resultados da CVA relativamente à composição em TAG da fracção lipídica da noz, tendo a cultivar como factor agrupante.

Comparando os resultados obtidos em 2003 para as mesmas cultivares provenientes de Bragança e de Coimbra, verifica-se a existência de diferenças significativas entre os dois grupos de amostras. As amostras colhidas em Bragança apresentam valores mais elevados de PLLn e OOL enquanto que as de Coimbra caracterizam-se por teores superiores de OLLn (Figura 4.10).

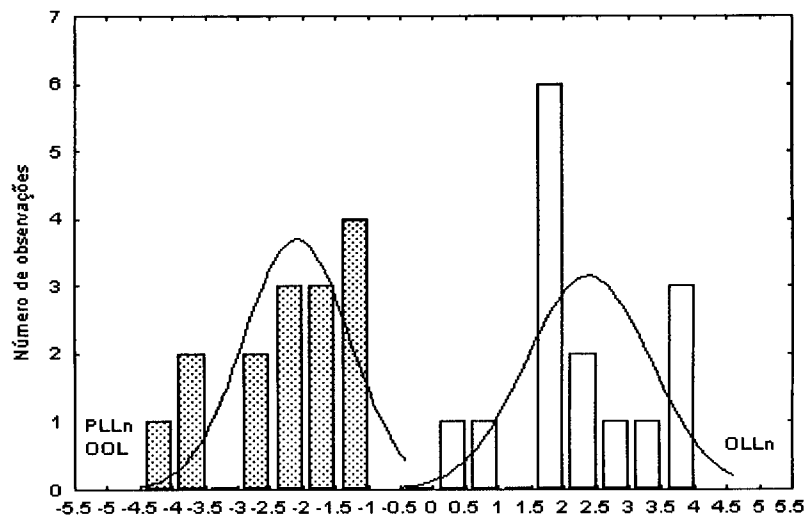


FIGURA 4.10. Resultados da CVA relativa à composição em TAG da fracção lipídica da noz, tendo a localização geográfica como factor agrupante. ■: Bragança; □: Coimbra

6. CONCLUSÕES

Relativamente às amostras de óleo de avelã estudadas:

- Foram determinados onze TAG: LLL, OLL, PLL, OOL, POL, PPL, OOO, POO, PPO, SOO e PSO definindo um “fingerprint” químico que poderá ser útil na avaliação da identidade e qualidade dos óleos de avelã.
- O factor “ano de produção” parece ser de menor importância no que diz respeito à variabilidade da composição em TAG de avelãs de diferentes colheitas. Considerando os valores médios de cada grupo, a maioria das amostras dos três anos estudados apresentaram composições similares. Estes resultados sugerem que, no geral, o óleo de avelã, em termos da sua composição em TAG, não parece ser muito susceptível às variações climáticas que naturalmente ocorrem de ano para ano.
- Pelo contrário, os factores genéticos parecem influenciar a composição em TAG do óleo das diferentes cultivares. As cultivares de origem Alemã, Francesa e Inglesa apresentam, regra geral, teores superiores de TAG com moléculas de ácido linoleico, o que poderá indicar uma menor resistência a processos de oxidação lípica. A composição química destas cultivares confirma, de alguma forma, o seu uso como avelãs de dupla aptidão. Os resultados obtidos sugerem que, caso estas avelãs não se destinem a ser consumidas num curto espaço de tempo após a colheita, é desaconselhado o seu uso como avelã de mesa, sendo preferível utilizá-las a nível industrial. As cultivares americanas apresentaram teores tendencialmente superiores de TAG com moléculas de AG saturados, o que poderá indicar uma menor susceptibilidade ao ranço; este facto coaduna-se com a sua utilização como avelã de mesa.
- O factor “localização geográfica” parece induzir apenas ligeiras diferenças na composição de TAG.

Relativamente às amostras de óleo de noz estudadas:

- Foram identificados e quantificados nove TAG, tratando-se provavelmente do primeiro estudo quantitativo da composição em TAG do óleo de noz.
- Apesar de não existir uma clara diferenciação das amostras por ano de produção, verificaram-se diferenças entre os grupos, o que poderá indiciar a influência deste factor, embora de forma pouco intensa.

- De igual forma, o factor genético parece não influenciar significativa e consistentemente a composição em TAG das avelãs. Considerando isoladamente os anos de produção, verificam-se diferenças significativas na composição em TAG das diferentes cultivares, que, contudo, não são consistentes ao longo dos três anos estudados. Esta variabilidade suporta a ideia de que o estudo da composição química, no caso específico de alimentos vegetais, deverá ser realizada no mínimo durante três anos consecutivos.

Verificou-se bastante semelhança entre algumas cultivares, mas razoáveis diferenças entre outras. Por exemplo as cultivares Portuguesas Arco e Rego apresentam algumas diferenças das restantes, nomeadamente no que concerne a TAG com moléculas de ácido α -linolénico. Atendendo aos benefícios deste AG, estas cultivares poderão mostrar-se mais interessantes sob o ponto de vista nutricional, devendo contudo ser referido que, apesar das diferenças serem significativas, são pouco expressivas a nível quantitativo.

- Verificaram-se diferenças significativas na composição das amostras colhidas em Bragança e em Coimbra. Como estes resultados dizem respeito apenas a um ano de amostragem, deverão ser realizados mais estudos com o propósito de confirmar estes resultados pois as diferenças podem ser devidas a mero acaso.

CAPÍTULO 5

PERFIL DE FITOSTERÓIS

I – FITOSTERÓIS. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são uma das causas principais de mortalidade nos países Ocidentais, facto este que determinou a realização de inúmeros estudos, implícita ou explicitamente relacionados com este assunto. Ao longo das últimas décadas, vários factores considerados de risco para o desenvolvimento de DCV têm sido identificados, sendo os teores elevados de colesterol (total e das partículas LDL) um dos mais referidos. Deste modo, justifica-se todo o interesse devotado à procura de soluções que contribuam para o decréscimo dos referidos teores.

Foi na década de 50 que, pela primeira vez, foram descritas as propriedades hipocolesterolémicas dos fitosteróis, chegando mesmo a ser utilizados a nível farmacológico. Porém, na década de 70, o interesse por estes compostos diminuiu devido à obtenção de resultados inconsistentes em estudos clínicos (Moreau *et al.*, 2002). Mais tarde, estes resultados controversos viriam a ser explicados pela pouca solubilidade e, conseqüente, baixa biodisponibilidade dos fitosteróis usados em alguns desses estudos. Durante alguns anos foram, então, considerados de pouco interesse prático, tendo quase caído no esquecimento. Contudo, à medida que novos dados foram surgindo, não só referentes à sua acção mas também relativamente à sua presença em quantidades apreciáveis em diversos alimentos, começou a crescer o interesse nestes compostos, bem como nos alimentos que os contêm. Na década de 90 surge a ideia de que, para além do consumo de fitosteróis naturalmente presentes na dieta, se poderia utilizar alimentos intencionalmente suplementados como modo de administração destes compostos, surgindo em 1995 o primeiro produto fortificado com ésteres de estanois à venda no mercado (Kritchevsky e Chen, 2005). Actualmente continua a assistir-se a um interesse crescente neste tipo de alimentos, uma vez que, para a maioria dos consumidores, são uma abordagem mais apelativa do que o uso de medicamentos ou a prática de dietas especiais.

2. ESTRUTURA QUÍMICA

O colesterol é talvez o mais conhecido de todos os esteróis, sendo o esterois predominante nos animais, onde desempenha funções importantes a nível membranar. As membranas das plantas contêm pouco ou nenhum colesterol, contendo outros compostos de estrutura idêntica à deste, designados por fitosteróis. Sendo componentes estruturais das membranas vegetais, pensa-se que estes compostos intervêm na estabilização das bicamadas fosfolipídicas, à semelhança da função exercida pelo colesterol nas membranas das células animais. Há também evidências de que poderão desempenhar um papel importante na divisão celular das plantas (Moreau *et al.*, 2002).

Os fitosteróis podem ser divididos em três grupos principais, segundo o número de grupos metilo em C₄: 4,4-dimetil (2 grupos), 4- α -metil (um grupo) ou 4-desmetil (nenhum grupo). Os 4,4-dimetil e 4-metilesteróis são precursores biossintéticos de outros esteróis e, por esta razão, regra geral existem em quantidades muito inferiores às dos 4-desmetilesteróis (Piironen *et al.*, 2000). Na Figura 5.1 encontra-se a numeração aplicada a estes compostos, segundo as mais recentes normas da IUPAC-IUB. No âmbito deste trabalho, apenas os 4-desmetilesteróis foram estudados e serão, doravante, designados simplesmente por fitosteróis.

Os fitosteróis pertencem à família dos compostos triterpénicos, diferindo do colesterol essencialmente na cadeia lateral ligada em C₁₇ (Figura 5.1). Regra geral, contêm um total de 28 ou 29 átomos de carbono e uma ou duas ligações duplas (Figura 5.1). A maioria dos fitosteróis apresenta uma ligação dupla entre C₅ e C₆, designando-se Δ^5 -fitosteróis, ou entre C₇ e C₈, designando-se neste caso por Δ^7 -fitosteróis. Quando estes compostos se apresentam na sua forma saturada, denominam-se estanois.

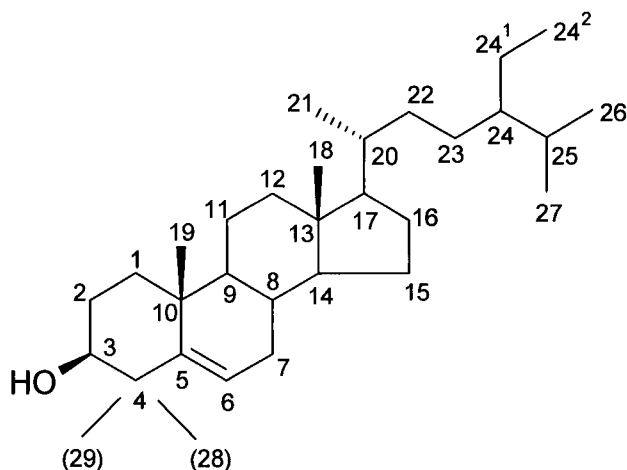


FIGURA 5.1. Estrutura tipo evidenciando a numeração usada nestes compostos.

Os fitosteróis podem existir como esteróis livres (na forma de álcool) ou podem estabelecer ligações éster, através do hidroxilo existente em C₃, com AG, açúcares ou, mais raramente, com ácidos hidroxicinâmicos (Phillips *et al.*, 2002). No entanto, ocorrem geralmente na forma livre ou esterificada com AG, sendo a ocorrência das outras formas de menor significado, à excepção do que acontece em certos alimentos, como os cereais, que podem apresentar teores consideráveis de esteróis glicosilados (Määttä *et al.*, 1999). No caso particular dos óleos vegetais, uma das fontes principais destes compostos na dieta, ocorrem na forma livre ou esterificada com ácidos gordos, em especial com os ácidos oleico ou linoleico (Piironen *et al.*, 2000).

Os fitosteróis presentes nas plantas com maior frequência são o β -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol. Na Figura 5.2 encontram-se representadas as estruturas dos compostos analisados neste trabalho.

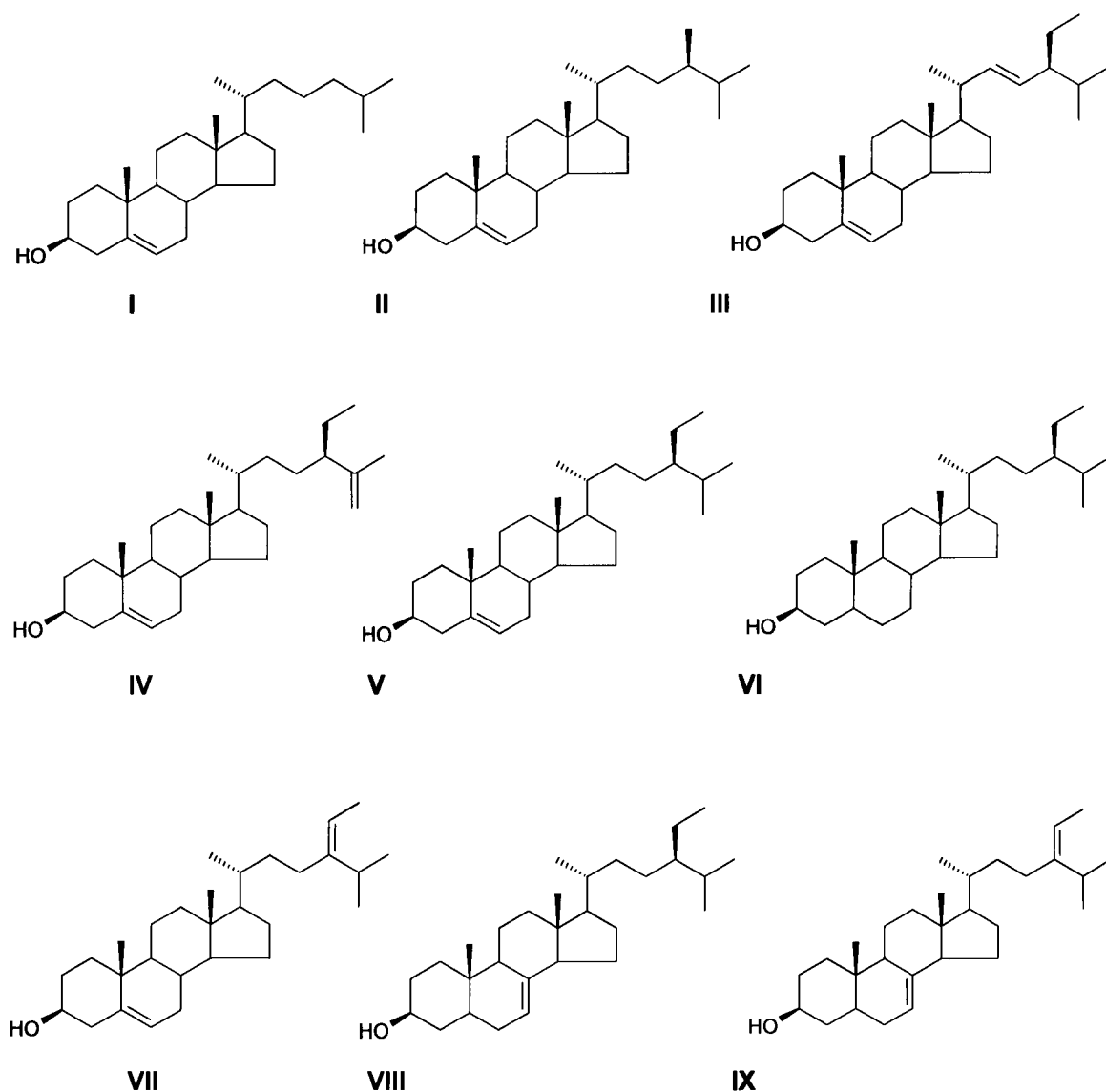


FIGURA 5.2. Estruturas dos compostos analisados. I: colesterol; II: campesterol; III: estigmasterol; IV: clerosterol; V: β-sitosterol; VI: β-sitostanol ; VII: Δ⁵-avenasterol; VIII: Δ⁷-estigmasterol; IX: Δ⁷-avenasterol.

3. FONTES E CONSUMO

Os seres humanos não possuem a capacidade de sintetizar fitosteróis, sendo estes compostos obtidos através da alimentação. Uma vez que os fitosteróis formam um grupo de compostos ubiqüitariamente distribuídos nas plantas, encontram-se naturalmente presentes na nossa dieta. Têm sido realizados vários estudos sobre as estimativas médias do seu consumo, nomeadamente em dietas Britânicas (contendo em média 158 mg/dia de fitosteróis), em dietas vegetarianas Escandinavas (em média 513 mg/dia), em dietas Japonesas (em média 373 mg/dia) e em dietas Gregas (cerca de 358 mg/dia) (FDA, 2000). Relativamente à população americana, existem estudos sobre dietas de trabalhadores ferroviários (cerca de 170 mg/dia) e sobre habitantes de uma área de Los Angeles (78

mg/dia, aumentando para 344 mg/dia em grupos lacto-vegetarianos) (deVries *et al.*, 1997). Os valores mais frequentemente encontrados na literatura referentes às dietas ocidentais, referem estimativas de consumo médio que variam entre 170 mg/dia (deVries *et al.*, 1997) e 250 mg/dia (Moreau *et al.*, 2002). Os estanois, regra geral, existem em muito menor quantidade nos alimentos e conseqüentemente os teores consumidos são menores, estimando-se um consumo de 20 a 50 mg/dia nas dietas ocidentais (FDA, 2000). Saliente-se que todos os valores citados são estimativas que dependem muito dos hábitos alimentares das diferentes populações. Note-se, igualmente, que até ao momento não existem quaisquer valores considerados normais para os níveis séricos de fitosteróis.

Os fitosteróis estão presentes em variados óleos vegetais, cereais, frutos secos e diversas frutas e vegetais, sendo os três primeiros alimentos considerados as fontes naturais mais ricas nestes compostos (Piironen *et al.*, 2000). Os teores totais são muito variáveis, atingindo valores bastante elevados em óleos vegetais, como por exemplo no óleo de milho (até 22150 mg/kg) e valores inferiores em determinados frutos e vegetais (como por exemplo 38 mg/kg na batata) (Firestone e Reina, 1996; Piironen *et al.*, 2000). No entanto, pensa-se que cada espécie vegetal é caracterizada por proporções relativamente constantes entre os vários fitosteróis, proporções essas que podem contudo ser influenciadas por factores genéticos, mas também por factores agronómicos e climáticos (Piironen *et al.*, 2000).

Como já foi referido, assiste-se actualmente a um aumento da comercialização de produtos alimentares suplementados com fitosteróis/estanois. Os compostos utilizados para fortificação de produtos alimentares provêm principalmente do processo de desodorização de óleos vegetais, de óleos obtidos de subprodutos como a fibra de milho, e do “tall-oil” (fracção lipofílica do hidrolisado obtido durante o processo de polpagem das árvores durante a extracção da celulose) (Moghadasian, 2000). Uma vez que os fitostanois são menos abundantes na natureza comparativamente com os fitosteróis, são muitas vezes produzidos por hidrogenação dos últimos, o que acarreta um maior custo financeiro na sua obtenção.

4. ACTIVIDADE BIOLÓGICA

4.1 Redução dos níveis de colesterol

4.1.1 Eficácia hipocolesterolémica

Há mais de 50 anos que os fitosteróis são conhecidos pelo seu potencial em reduzir os níveis de colesterol em humanos. Em 1953, num estudo abrangendo 26 pessoas saudáveis ingerindo doses diárias de fitosteróis de 5 a 10 g/dia, durante duas semanas, observou-se a redução dos níveis de colesterol plasmático em cerca de 28 % demonstrando, pela primeira vez, que os fitosteróis poderiam contribuir eficazmente para a redução do colesterol (Kritchevsky e Chen, 2005). Desde então e até à presente data, foi realizado um vasto leque

de estudos clínicos. Para além de realizados em grande número, estes estudos foram muito abrangentes, quer no que diz respeito ao tipo de composto utilizado, quer nas características das populações em estudo. Os estudos incluíram a ingestão de fitosteróis e estanois, livres ou esterificados, individualmente ou em misturas, administrados em formas farmacêuticas ou como suplemento alimentar. Considerando a totalidade dos trabalhos realizados, foram alvo de estudo homens e mulheres, normo e hipercolesterolémicos, recebendo simultaneamente tratamento farmacológico hipocolesterolémico (geralmente com estatinas) ou não, em dietas normais ou alteradas (geralmente hipocalóricas com baixo teor de gorduras saturadas). Inclusivamente, foram já realizados estudos com crianças. Actualmente encontram-se publicados artigos onde é feita a revisão dos vários estudos clínicos realizados (Ling e Jones, 1995; Moghadasian e Frohlich, 1999; Moreau *et al.*, 2002; Quílez *et al.*, 2003). Todos eles são unânimes em confirmar os resultados que demonstram a eficácia dos fitosteróis na redução dos níveis de colesterol total e LDL, sem afectar os níveis das partículas HDL e dos triacilgliceróis (TAG).

Inicialmente e até finais da década de 90, pensava-se que os fitosteróis na sua forma saturada (estanois) seriam os mais eficazes na redução do colesterol, pelo que a grande maioria dos estudos realizados até essa data utilizou estanois. Os resultados demonstraram a eficácia dos ésteres de estanois na redução em cerca de 10% a 14% dos níveis do colesterol-LDL, sem alteração dos níveis do colesterol-HDL e dos TAG. Recentemente, vários estudos demonstraram eficácias similares com ésteres de fitosteróis (Vanstone *et al.*, 2002). Relativamente ao uso de formas livres ou esterificadas, os resultados de vários estudos foram inconsistentes. Actualmente considera-se que a ineficácia obtida em determinados trabalhos seria consequência de dificuldades de administração dos compostos na forma livre. Um estudo clínico realizado recentemente revelou eficácias idênticas para ambas as formas, desde que administradas em formulações com biodisponibilidades intestinais similares entre si (Vanstone *et al.*, 2002).

Pela análise de dados provenientes de vários estudos, preconizou-se como dose ideal para a redução dos níveis de colesterol, teores de aproximadamente 2 g/dia de fitosteróis ou estanois, obtendo-se níveis de redução na ordem dos 10%; doses mais elevadas apenas proporcionariam pequenas melhorias (Wester, 2000; Kritchevsky e Chen, 2005).

4.1.2 Mecanismo de acção

Sendo um dado adquirido que efectivamente os fitosteróis contribuem para a diminuição dos teores de colesterol (total e LDL), têm sido feitos muitos estudos relativamente ao seu modo de acção. Até à presente data, o mecanismo pelo qual os fitosteróis diminuem os níveis de colesterol sérico ainda não é completamente conhecido, tendo sido propostas

várias teorias. Actualmente pensa-se que, muito provavelmente, não existirá um mecanismo único, mas uma conjugação de diferentes acções por parte destes compostos.

Para que o colesterol seja absorvido no intestino tem que, previamente, ser incorporado em micelas compostas por ácidos gordos, mono e diacilgliceróis, fosfolípidos e sais biliares. A absorção ocorre fundamentalmente a nível dos enterócitos do duodeno e jejuno. Esta absorção parece não ocorrer por difusão passiva, mas através de um processo mediado por proteínas transportadoras. O colesterol entra nos enterócitos na forma livre e é depois esterificado por acção enzimática. Seguidamente, é secretado para a linfa integrado nas quilomicra, entrando depois na circulação sanguínea. À medida que os TAG presentes nas quilomicra são captados pelas células, formam-se as quilomicra remanescentes, que são removidas pelo fígado. Aí são formadas partículas VLDL, contendo sobretudo TAG e colesterol, que irão dar origem às LDL, ricas em colesterol. As LDL podem ser retiradas da circulação através de receptores específicos. Para além da formação das partículas descritas, o colesterol existente no fígado é usado na síntese de ácidos biliares e também excretado na bÍlis sob a forma de colesterol livre.

Consensualmente, pensa-se que a diminuição dos níveis séricos de colesterol resulta da inibição intestinal da sua absorção. Têm sido sugeridos diferentes mecanismos pelos quais esta inibição pode ocorrer:

- Co-cristalização com o colesterol;
Um dos mecanismos sugeridos envolve a co-cristalização de fitosteróis e colesterol formando cristais dificilmente absorvíveis (Moreau *et al.*, 2002; Trautwein *et al.*, 2003).
- Mecanismos de competição;
Colesterol e fitosteróis presentes no intestino competem pela incorporação nas micelas. Foi ainda sugerido que as proteínas transportadoras que permitem a entrada nos enterócitos sejam comuns podendo, também a este nível, existir competição entre ambos os grupos de compostos (Trautwein *et al.*, 2003).
- Actuação a nível enzimático;
Estudos *in vitro* demonstraram uma menor eficiência enzimática na esterificação dos fitosteróis comparativamente com o colesterol, sendo sugerido que os fitosteróis poderão actuar por inibição enzimática, diminuindo a velocidade de esterificação do colesterol e, conseqüentemente, a sua absorção (Jong *et al.*, 2003; Trautwein *et al.*, 2003).
- Interferência no processo de excreção para o lúmen intestinal;

Da observação de que o efeito destes compostos permanece para além do período das refeições e de que efeitos semelhantes são obtidos com o consumo da mesma quantidade, ingerida de uma só vez ou repartida três vezes ao dia, sugeriu-se a actuação pela estimulação da produção de proteínas específicas que executam o transporte do colesterol dos enterócitos para o lúmen intestinal (Jong *et al.*, 2003; Trautwein *et al.*, 2003).

4.2 Redução do risco de doenças cardiovasculares

As DCV, para além de serem uma das principais causas de morte prematura, principalmente nos países ocidentais, são ainda responsáveis por uma elevada taxa de morbilidade, resultando, conseqüentemente, em elevados custos de saúde, quer directos devido a internamentos, medicação e afins, quer indirectamente por diminuição da produtividade da população afectada.

Após consideração de uma quantidade substancial de dados clínicos e epidemiológicos, é hoje em dia consensual que os níveis de colesterol total e das partículas LDL são considerados importantes factores de risco no desenvolvimento de DCV. Assim sendo, é aceitável concluir que os factores dietéticos que intervêm na redução dos níveis de colesterol contribuirão igualmente para a redução do desenvolvimento de DCV.

Igual atenção deve ser dada aos efeitos que a dieta pode exercer nos níveis do colesterol-HDL, considerado protector contra o desenvolvimento de DCV, pois os efeitos benéficos de redução dos níveis de colesterol total e/ou das partículas LDL, não deverá ser acompanhado por reduções potencialmente adversas dos teores do colesterol-HDL.

Em estudos recentes, foi estimado que o consumo diário de 2 g de fitosteróis ou estanois poderiam reduzir o risco de doenças cardíacas em cerca de 25% (Moreau *et al.*, 2002). O efeito antiaterosclerótico dos fitosteróis está documentado em outros estudos, nomeadamente em trabalhos realizados com ratos apo-E-KO (Moghadasian *et al.*, 1997; Moghadasian, 2000). Baseada nas evidências científicas disponíveis até à data, a FDA concluiu existir uma relação entre o consumo de ésteres de esteróis/estanois de plantas e o risco de DCV. Em Setembro de 2000, a FDA permitiu que fosse lançada uma alegação de saúde ("health claim") relativa à redução do risco de DCV para alimentos contendo uma determinada quantidade de ésteres de fitosteróis/fitostanois.

4.3 Propriedades anticancerígenas e outros potenciais benefícios

Vários estudos, experimentais e epidemiológicos, têm também relacionado os fitosteróis com uma possível acção anticancerígena (Ling e Jones, 1995; Moghadasian e Frohlich, 1999; Moreau *et al.*, 2002; Quilez *et al.*, 2003). Em alguns desses estudos foi sugerido que

os fitosteróis poderiam actuar como protectores contra os cancros do cólon, mama e próstata (Quilez *et al.*, 2003). Foram também descritas propriedades anti-inflamatórias, funções imunomoduladoras e actividade antioxidante (Moreau *et al.*, 2002) para estes compostos (Quilez *et al.*, 2003). Há ainda estudos que indicam que os fitosteróis que contêm um grupo etilideno em C₂₄, à semelhança do Δ^5 -avenasterol, possuem propriedades antioxidantes e antipolimerizantes, que poderão ser uma mais valia durante o processamento de alimentos (Akintayo, 2004).

4.4 Efeitos adversos

Organismos como a FDA e o Comité Científico da União Europeia, dispendo dos dados de inúmeros estudos científicos relativos a estes compostos, consideraram-nos seguros e autorizaram o seu uso como aditivos em determinados alimentos (Kritchevsky e Chen, 2005). Nos Estados Unidos estes compostos são considerados GRAS, "Generally Recognized as Safe" (Moreau *et al.*, 2002).

Estudos específicos conduzidos com fitosteróis/estanois não registaram efeitos estrogénicos nem quaisquer efeitos adversos em estudos de reprodução com ratos Wistar (Moghadasian, 2000; Kritchevsky e Chen, 2005). Todos os estudos toxicológicos de rotina, realizados em ratos, foram negativos (Kritchevsky e Chen, 2005). Igualmente, não revelaram qualquer evidência de actividade mutagénica *in vitro*, ou de toxicidade subcrónica em animais (Hepburn *et al.*, 1999; Quilez *et al.*, 2003).

4.4.1 Absorção de vitaminas lipossolúveis

Tendo sido referida a possibilidade destes compostos provocarem uma diminuição dos teores sanguíneos de vitaminas lipossolúveis, foram realizados estudos no sentido de verificar o facto, tendo-se concluído não haver qualquer tipo de interferência no que diz respeito às vitaminas A, D e K (Wester, 2000; Jong *et al.*, 2003). Relativamente à vitamina E, pró-vitamina A (β -caroteno) e licopeno têm surgido resultados diversos, uns apontando para o decréscimo outros para a manutenção dos teores destes compostos (Piironen *et al.*, 2000; Wester, 2000; Kritchevsky e Chen, 2005). Sendo os carotenóides e tocoferóis transportados na corrente sanguínea sobretudo pelas LDL, os factores que afectam estas partículas poderão possivelmente afectar os teores daqueles compostos. Alguns estudos concluíram que, apesar do decréscimo dos níveis de vitamina E não ser significativo, existe uma redução significativa dos níveis de β -caroteno plasmático (Hallikainen e Uusitupa, 1999; Moreau *et al.*, 2002). Por esta razão, a FDA e o Comité Científico da União Europeia, ao mesmo tempo que aprovaram a introdução de produtos fortificados com fitosteróis/estanois, tornaram claro que os níveis de β -caroteno poderiam ser afectados (Kritchevsky e Chen, 2005). Foi sugerido aos consumidores de produtos suplementados com estes compostos que, por precaução,

deverão aumentar o consumo de alimentos ricos em carotenóides, até que mais estudos sejam realizados.

4.4.2 Outros possíveis efeitos adversos

Os doentes fitosterolémicos representam um caso específico. A fitosterolémia, ou sitosterolémia, é uma doença autossómica recessiva muito rara, caracterizada pela elevada absorção e diminuta excreção de fitosteróis, resultando em concentrações plasmáticas muito elevadas (Moghadasian e Frohlich, 1999; Kritchevsky e Chen, 2005). Estão associados a esta doença episódios hemolíticos, xantomas e arteriosclerose acelerada. Desta forma os doentes sitosterolémicos deverão ter cuidados redobrados com a sua alimentação e deverão evitar os produtos fortificados com estes compostos.

A possível associação entre os níveis plasmáticos de fitosteróis e o risco de DCV foi também alvo de estudo. De facto, em quatro estudos epidemiológicos esta associação, se bem que remota, foi sugerida (Kritchevsky e Chen, 2005). Numa publicação recente, Wilund e co-autores (2004), tendo em conta resultados obtidos em humanos e em ratos, verificaram a inexistência da referida associação. Poder-se-á pensar que, se de facto os fitosteróis apresentam propriedades aterogénicas, provavelmente esse facto já se teria reflectido em populações vegetarianas, o que é, até ao momento, desconhecido.

5. PARÂMETRO NA AVALIAÇÃO DA AUTENTICIDADE

Apesar de serem constituintes minoritários da fracção lipídica, os fitosteróis constituem uma parte importante da fracção insaponificável da maioria dos óleos vegetais, existindo quer na forma livre quer na forma esterificada (Firestone e Reina, 1996). Vários autores consideram a determinação do teor total e do perfil em fitosteróis como uma ferramenta útil na avaliação da autenticidade de produtos alimentares, especialmente aplicável na avaliação da adulteração de óleos vegetais (Firestone e Reina, 1996; Kamm *et al.*, 2001; Aparicio e Aparicio-Ruiz, 2000). Os teores totais de fitosteróis nos diversos óleos vegetais brutos abrangem uma vasta gama, estando descritos valores que variam entre 376 mg/kg no óleo de palma até 22150 mg/kg no óleo de milho (Firestone e Reina, 1996; Kamm *et al.*, 2001). Também o perfil qualitativo e a proporção dos diferentes compostos entre si, apresentam variações entre os diferentes óleos vegetais. Desta forma, o perfil qualitativo e quantitativo dos fitosteróis pode ser útil como factor diferenciador entre diversos óleos vegetais (Abidi, 2001), auxiliando na detecção de adulterações. A título de exemplo, refira-se o azeite, caracterizado por elevados teores de β -sitosterol e baixos teores de campesterol e de estigmasterol, alvo de frequentes adulterações devido ao seu elevado valor económico.

Segundo alguns autores, os fitosteróis podem ainda ser úteis como indicadores de maturação de determinados frutos (Kamm *et al.*, 2001). Outros trabalhos referem o seu uso como indicadores de determinados processamentos, como é o caso da refinação de óleos vegetais, pois apesar de serem relativamente estáveis ao calor, as temperaturas atingidas durante o processo de refinação podem afectar a sua composição e o seu teor total (Firestone e Reina, 1996).

6. METODOLOGIAS ANALÍTICAS – BREVE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Dada a importância da sua determinação na avaliação da autenticidade de certos produtos alimentares, existem vários métodos descritos na literatura para a determinação dos fitosteróis, inclusivamente métodos normativos. Estas determinações baseiam-se essencialmente em metodologias cromatográficas, frequentemente após procedimentos morosos de extracção, enriquecimento dos compostos e de purificação da amostra (Abidi, 2001).

Apesar de existirem metodologias desenvolvidas para a determinação diferenciada de fitosteróis livres, esterificados ou glicosilados (Breinholder *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2002), a generalidade dos métodos reporta-se à determinação do teor total de fitosteróis quantificados após hidrólise e subsequente análise dos fitosteróis livres gerados. Embora seja necessária uma hidrólise ácida para a quebra das ligações glicosídicas, regra geral apenas se procede a uma hidrólise alcalina, considerando que em determinadas matrizes, como é o caso dos óleos vegetais, a quase totalidade dos fitosteróis se encontra livre ou esterificada com AG.

Estão descritas metodologias por GC e por HPLC, embora as primeiras sejam as mais frequentemente utilizadas (Abidi, 2001). O FID é referido como sendo o detector mais utilizado, embora tenha o inconveniente de requerer um pré-tratamento de purificação da fracção insaponificável para eliminação de possíveis interferentes, de modo a aumentar a selectividade e especificidade. Os métodos de GC-MS são mais importantes quando da elucidação estrutural dos compostos. Outros detectores, como o de captura electrónica, foram também utilizados, mas o FID apresenta melhor sensibilidade e linearidade de resposta (Moreau *et al.*, 2002)

A maioria dos métodos por cromatografia gasosa obriga a derivatização dos fitosteróis na forma de éteres trimetilsilílicos e ao uso de um padrão interno, como a betulina ou o 5- α -colestano-3 β -ol.

Uma listagem de diversas metodologias publicadas, organizada por método cromatográfico (GC ou HPLC), detalhando a matriz, fase estacionária e método de detecção utilizado, bem como os compostos determinados, foi feita por Abidi (2001).

II – FITOSTERÓIS. PARTE EXPERIMENTAL

A determinação do perfil em esteróis foi feita por GLC-FID, baseada na norma NP EN ISO 12228 (1999).

1. REAGENTES E PADRÕES

Os padrões de colestanol, colesterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol, β -sitostanol e a betulina foram adquiridos à Sigma (St. Louis, MO, USA). Os reagentes de derivatização, 1-metilimidazol e *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)-heptafluorobutiramida (MSHFBA) foram fornecidos pela Sigma e Macherey-Nagel (Düren, Germany), respectivamente. As placas de sílica e o óxido de alumínio 90 padronizado foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Germany). Os restantes reagentes utilizados tinham grau de pureza "Pro analysi".

2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Inicialmente, procedeu-se à extracção do óleo como descrito no capítulo 3 (Perfil em ácidos gordos), secção II.2 (Preparação da amostra, página 92).

Após adição de 1000 μ l do padrão interno (solução de betulina, 1 mg/ml, em acetona) a aproximadamente 250 mg de amostra de óleo, procedeu-se à sua saponificação com uma solução etanólica de hidróxido de potássio (0,5 M, 10 ml). A fracção insaponificável foi obtida por extracção em fase sólida com uma coluna de óxido de alumínio. Após eluição com etanol (5 ml) e éter etílico (30 ml), procedeu-se à concentração do extracto. A fracção esteroídica foi depois isolada por cromatografia em camada fina, utilizando placas de sílica e *n*-hexano/éter dietílico (1:1, v/v) como eluente. As bandas assim separadas, foram visualizadas e marcadas após aspensão com metanol, e os compostos foram extraídos (3 vezes) da sílica removida com álcool (1ml) seguido de éter dietílico (5 ml). O extracto foi transferido para um pequeno frasco com fundo cónico, levado à secura em corrente de azoto e procedeu-se em seguida à sua derivatização. Para tal adicionou-se 100 μ l da mistura de 1-metilimidazol e MSHFBA (50 μ l + 1 ml, respectivamente), selaram-se os frascos. e aqueceu-se a 105 °C durante 15 min. O conteúdo dos frascos foi depois analisado por GC/FID.

Os padrões foram preparados em acetona e uma alíquota de cada um transferida para um frasco de fundo cónico, procedendo-se em seguida como descrito para as amostras.

3. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Utilizou-se o mesmo sistema cromatográfico (GC-FID) descrito na análise de AG, com uma coluna capilar DB-5MS, 30 m x 0,25 mm d.i. (J&W Scientific, Folsom, CA, USA).

Utilizaram-se as seguintes condições analíticas:

- Temperatura do injector: 320 °C;
- Temperatura do detector: 320 °C;
- Temperatura da coluna: programada para aumentar de 250 °C até 300 °C à velocidade de 2 °C/min, e permanecer a 300 °C durante 12 min;
- Relação de "split": 1:50;
- Gás vector: hélio, à pressão interna inicial de 100 kPa;
- Volume de injeção: 1,5 µl.

O teor em esteróis foi calculado segundo a norma NP EN ISO 12228 (1999). A identificação dos compostos foi feita por comparação com os tempos de retenção obtidos para os padrões. O clerosterol, Δ^5 -avenasterol, Δ^7 -estigmastenol e Δ^7 -avenasterol, foram tentativamente identificados com base em dados bibliográficos (NP EN ISO 12228, 1999; Firestone e Reina, 1996) e em dados obtidos com amostras de óleos descritos na literatura com elevados teores destes compostos (óleos de girassol e de palma). Tendo-se concluído que os compostos β -sitostanol e Δ^5 -avenasterol co-eluíam no mesmo pico, e estando descrita a existência do primeiro no óleo de avelã em quantidades inferiores às do segundo, (Bernardo-Gil *et al.*, 2002), a soma dos dois compostos foi quantificada como Δ^5 -avenasterol.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para ambas as espécies, aveleira e noqueira, a análise estatística foi realizada utilizando o programa "Statistica for Windows" (Statistica for Windows, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) e os resultados obtidos comentados com base em literatura existente (Naes e Indhal, 1998; Alves e Oliveira, 2003; Alves e Oliveira, 2004; Alves *et al.*, 2005).

A análise estatística envolveu a realização de testes MANOVA, Hotelling T^2 e t -Student. Para cada uma das matrizes, realizou-se ainda uma análise discriminante "forward stepwise" (DA) de modo a seleccionar os esteróis mais discriminantes e, seguidamente, uma análise de variáveis canónicas (CVA) baseada nos compostos seleccionados, de forma a analisar as diferenças entre grupos e permitir a sua visualização em gráficos apropriados.

Na matriz noz, realizou-se ainda uma análise de componentes principais (PCA), de forma a mostrar em gráfico os agrupamentos/similaridades entre as amostras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. 1. Avelleira

No óleo extraído de avelã foram quantificados nove fitosteróis: colesterol, campesterol, estigmasterol, clerosterol, β -sitosterol, β -sitostanol, Δ^5 -avenasterol, Δ^7 -estigmasterol e Δ^7 -avenasterol. Como referido na página anterior (ponto II.3 – Análise cromatográfica), dada a co-eluição do β -sitostanol com o Δ^5 -avenasterol, procedeu-se à sua quantificação conjunta sob a designação de Δ^5 -avenasterol, designação esta que será utilizada doravante significando a soma dos dois compostos. A separação dos compostos referidos pode ser observada na Figura 5.3, a qual mostra um cromatograma típico obtido segundo a metodologia descrita, para uma mistura de padrões, e na Figura 5.4, que representa um cromatograma típico, em diferentes ampliações, relativo a uma amostra de óleo de avelã.

A Tabela 4.1 apresenta os valores médios para cada composto quantificado, segundo a cultivar, ano de produção e localização geográfica.

Exceptuando algumas diferenças qualitativas em termos dos compostos minoritários, Δ^7 -estigmasterol e Δ^7 -avenasterol, não detectados em algumas das amostras, verifica-se, de uma forma geral, a existência de um perfil qualitativo semelhante, constituído pelos nove esteróis referidos.

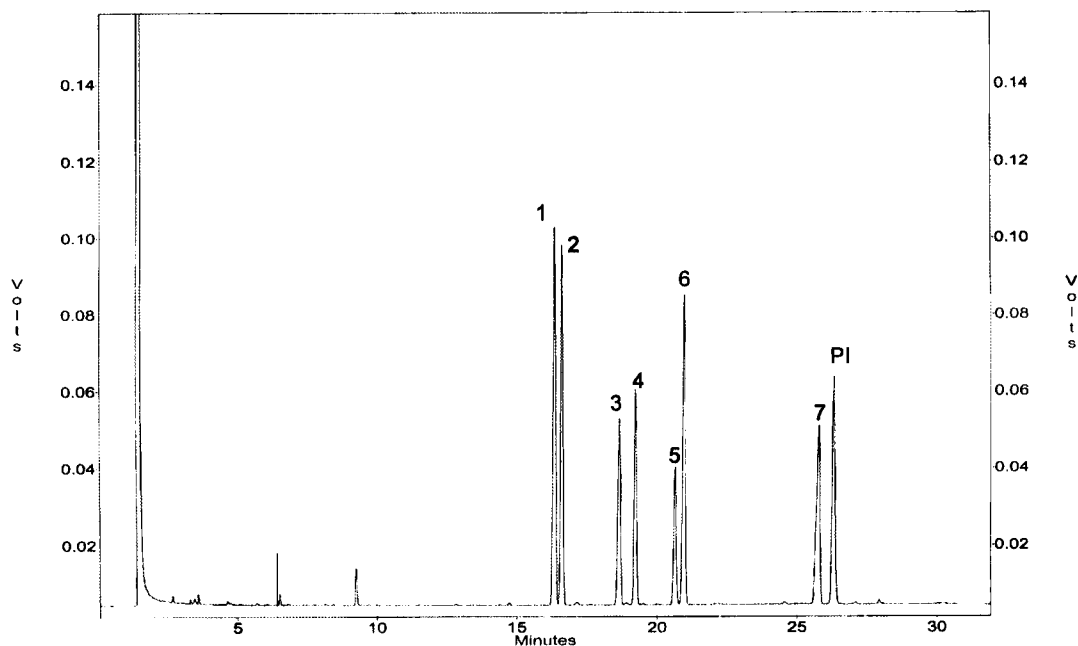


FIGURA 5.3. Cromatograma obtido por GC/FID segundo a metodologia descrita, para uma mistura de padrões. Picos: 1: colesterol, 2: colestanol, 3: campesterol, 4: estigmasterol, 5: β -sitosterol, 6: β -sitostanol, 7: uvaol, PI: betulina.

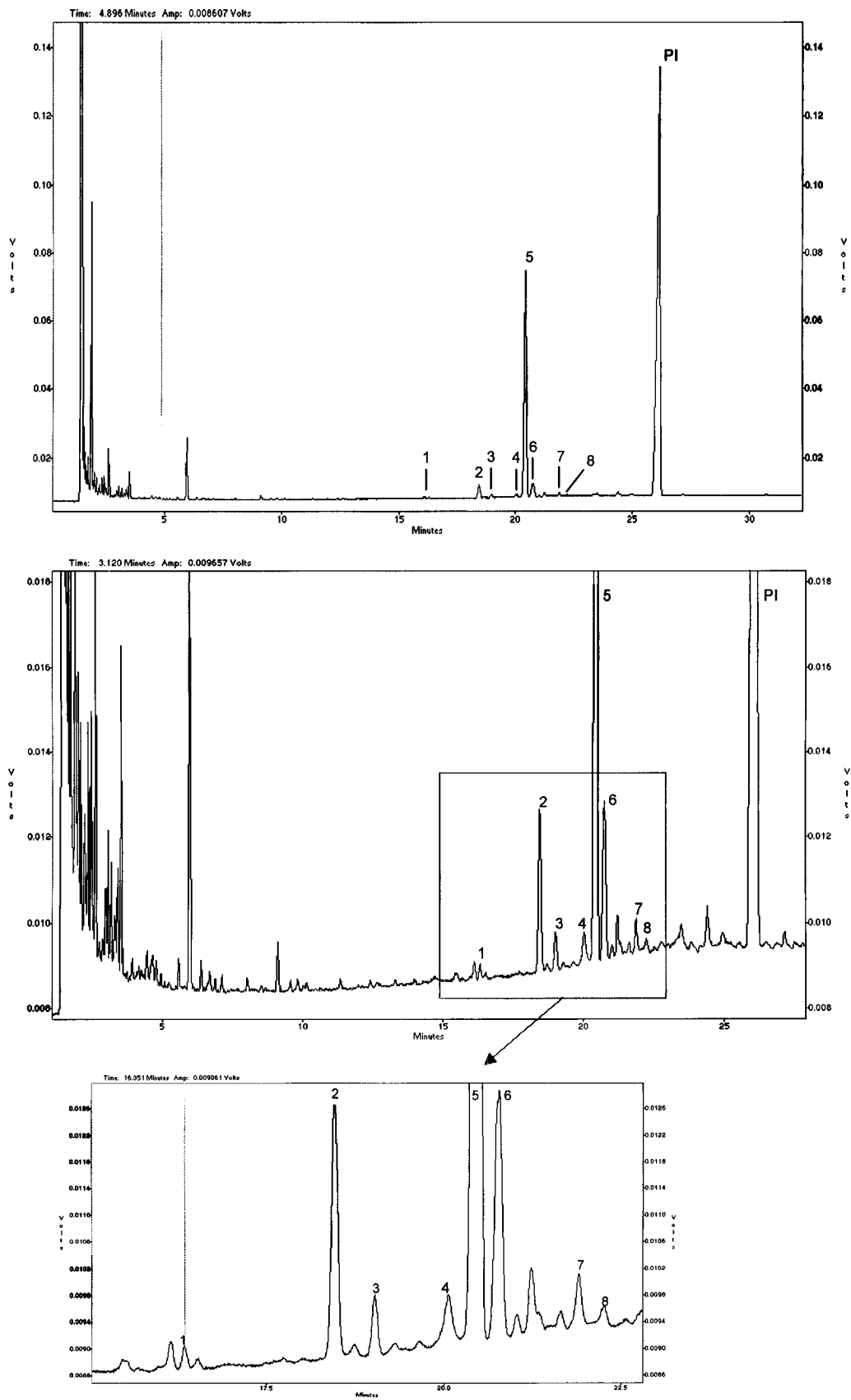


FIGURA 5.4. Cromatograma obtido por GC/FID segundo a metodologia descrita, e respectivas ampliações, de uma amostra de óleo de aveleira. Picos: 1: colesterol, 2: campesterol, 3: estigmasterol, 4: cleroesterol, 5: β -sitosterol, 6: Δ^5 -avenasterol + β -sitostanol, 7: Δ^7 -estigmasterol, 8: Δ^7 -avenasterol, PI: betulina.

TABELA 5.1. Composição em fitosteróis (mg/100 g de óleo) das cultivares de avelã estudadas, por ano de produção e localização geográfica.

| Cultivar | FITOESTERÓIS | | | | | | | Total | |
|------------------|--------------|--------------|---------------|-------------|---------------------|--------------------------|----------------------------|-------------|-------------------------|
| | Coolesterol | Campesterol | Estigmasterol | Clerosterol | β -Sitosterol | Δ^5 -Avenasterol* | Δ^7 -Estigmasterol* | | Δ^7 -Avenasterol |
| Ano: 2001 | | | | | | | | | |
| Vila Real | | | | | | | | | |
| Butler | 0,91 ± 0,01 | 7,83 ± 0,12 | 1,41 ± 0,01 | 1,50 ± 0,01 | 132,05 ± 0,14 | 10,23 ± 0,10 | 0,96 ± 0,02 | 0,66 ± 0,04 | 155,5 |
| Campanica | 1,02 ± 0,02 | 7,54 ± 0,02 | 1,57 ± 0,04 | 2,29 ± 0,02 | 120,82 ± 0,13 | 8,32 ± 0,05 | 2,17 ± 0,02 | 0,87 ± 0,01 | 144,6 |
| Cosford | 2,38 ± 0,01 | 15,97 ± 0,03 | 2,32 ± 0,01 | 1,87 ± 0,03 | 170,41 ± 0,11 | 12,54 ± 0,02 | nd** | 0,82 ± 0,06 | 206,3 |
| Couplat | 1,40 ± 0,06 | 9,63 ± 0,04 | 2,04 ± 0,04 | 1,85 ± 0,04 | 151,86 ± 0,47 | 11,82 ± 0,01 | 1,07 ± 0,03 | 4,44 ± 0,04 | 184,1 |
| Daviana | 1,24 ± 0,05 | 16,36 ± 0,03 | 2,50 ± 0,03 | 2,99 ± 0,08 | 219,60 ± 0,04 | 18,22 ± 0,02 | 1,03 ± 0,06 | 1,10 ± 0,02 | 263,0 |
| Ennis | 1,42 ± 0,01 | 8,07 ± 0,06 | 1,99 ± 0,02 | 1,62 ± 0,03 | 152,36 ± 0,09 | 12,14 ± 0,02 | nd | 0,47 ± 0,02 | 178,1 |
| F. Coutard | 2,86 ± 0,01 | 9,47 ± 0,05 | 1,64 ± 0,06 | 1,74 ± 0,06 | 135,85 ± 0,10 | 9,41 ± 0,11 | 1,19 ± 0,00 | 0,87 ± 0,03 | 163,0 |
| Grossal | 0,65 ± 0,02 | 7,72 ± 0,01 | 1,21 ± 0,01 | 1,59 ± 0,06 | 112,90 ± 0,10 | 7,77 ± 0,01 | 1,40 ± 0,05 | 0,51 ± 0,02 | 133,8 |
| Gunslebert | 1,01 ± 0,04 | 10,54 ± 0,04 | 1,68 ± 0,01 | 1,93 ± 0,05 | 146,21 ± 0,27 | 10,57 ± 0,03 | 1,42 ± 0,02 | 2,94 ± 0,01 | 176,3 |
| Lansing | 2,17 ± 0,03 | 8,27 ± 0,10 | 2,26 ± 0,03 | 2,48 ± 0,07 | 149,84 ± 0,08 | 11,03 ± 0,01 | nd | 1,16 ± 0,04 | 177,2 |
| L. Espanha | 1,71 ± 0,01 | 9,94 ± 0,07 | 2,06 ± 0,02 | 1,45 ± 0,05 | 149,92 ± 0,14 | 7,47 ± 0,02 | 0,53 ± 0,03 | 1,08 ± 0,03 | 174,2 |
| M. Bollwiller | 1,69 ± 0,01 | 12,98 ± 0,03 | 1,93 ± 0,01 | 2,05 ± 0,04 | 156,62 ± 0,11 | 12,36 ± 0,05 | nd | 0,75 ± 0,03 | 188,4 |
| Morell | 1,83 ± 0,02 | 12,45 ± 0,02 | 1,54 ± 0,02 | 1,79 ± 0,02 | 155,50 ± 0,06 | 11,85 ± 0,07 | 2,96 ± 0,03 | 1,42 ± 0,03 | 189,3 |
| Negreta | 1,51 ± 0,01 | 9,89 ± 0,02 | 1,67 ± 0,01 | 1,50 ± 0,07 | 152,53 ± 0,27 | 9,31 ± 0,03 | 1,50 ± 0,04 | 0,87 ± 0,01 | 178,8 |
| Pauetet | 1,65 ± 0,03 | 10,95 ± 0,15 | 2,33 ± 0,06 | 2,27 ± 0,10 | 152,62 ± 0,14 | 11,84 ± 0,07 | 1,58 ± 0,01 | 2,72 ± 0,00 | 186,0 |
| R. Piemont | 1,02 ± 0,02 | 7,21 ± 0,03 | 1,36 ± 0,02 | 1,77 ± 0,04 | 107,98 ± 0,25 | 9,73 ± 0,02 | 3,61 ± 0,09 | 1,48 ± 0,03 | 134,2 |
| Segorbe | 1,16 ± 0,02 | 12,35 ± 0,03 | 1,59 ± 0,04 | 1,97 ± 0,02 | 148,86 ± 0,20 | 13,15 ± 0,00 | 0,98 ± 0,07 | 1,28 ± 0,01 | 181,3 |
| St. M. Jesus | 1,17 ± 0,01 | 8,04 ± 0,01 | 1,62 ± 0,01 | 1,56 ± 0,05 | 123,39 ± 0,02 | 7,97 ± 0,03 | 1,83 ± 0,02 | 0,67 ± 0,03 | 146,3 |
| T. Giffoni | 1,49 ± 0,05 | 9,72 ± 0,06 | 1,79 ± 0,03 | 2,03 ± 0,16 | 162,89 ± 0,18 | 10,95 ± 0,06 | 1,29 ± 0,11 | 1,19 ± 0,06 | 191,3 |
| Média | 1,49 | 10,26 | 1,82 | 1,91 | 147,48 | 10,88 | 1,57 | 1,33 | 176,4 |
| Variação | 0,65 - 2,86 | 7,21 - 16,36 | 1,21 - 2,50 | 1,45 - 2,99 | 107,98 - 219,60 | 7,47 - 18,22 | nd - 3,61 | 0,47 - 4,44 | 133,8 - 263,0 |

* : Δ^5 -avenasterol; β -sitosterol + Δ^5 -avenasterol; **: nd, não detectado.

continuação da Tabela 5.1.

| Cultivar | Coolesterol | Campesterol | Estigmasterol | Colesterol | β -Sitosterol | Δ^5 -Avenasterol* | Δ^7 -Estigmasterol | Δ^7 -Avenasterol | Total |
|-------------------|-------------|--------------|---------------|-------------|---------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------|
| Ano: 2002 | | | | | | | | | |
| Butler | 3,31 ± 0,11 | 7,87 ± 0,06 | 2,33 ± 0,03 | 1,98 ± 0,02 | 127,95 ± 0,34 | 11,62 ± 0,05 | 0,65 ± 0,04 | 1,36 ± 0,02 | 157,1 |
| Campanica | 1,56 ± 0,01 | 11,23 ± 0,05 | 1,80 ± 0,02 | 2,22 ± 0,01 | 172,52 ± 0,66 | 13,28 ± 0,03 | 3,15 ± 0,01 | 1,16 ± 0,01 | 206,9 |
| Cosford | 1,97 ± 0,01 | 11,40 ± 0,04 | 1,83 ± 0,01 | 2,06 ± 0,00 | 155,17 ± 0,48 | 11,83 ± 0,01 | nd | 0,60 ± 0,01 | 184,7 |
| Couplat | 2,11 ± 0,01 | 9,77 ± 0,02 | 2,57 ± 0,03 | 2,56 ± 0,03 | 167,79 ± 0,13 | 12,76 ± 0,00 | 2,25 ± 0,02 | 1,21 ± 0,03 | 201,0 |
| Daviana | 1,37 ± 0,05 | 11,22 ± 0,07 | 2,11 ± 0,02 | 2,25 ± 0,12 | 146,26 ± 0,40 | 8,97 ± 0,05 | 0,59 ± 0,03 | 0,76 ± 0,02 | 170,2 |
| Ennis | 1,95 ± 0,13 | 9,23 ± 0,08 | 2,79 ± 0,01 | 3,45 ± 0,04 | 178,97 ± 0,60 | 12,88 ± 0,07 | nd | 0,65 ± 0,07 | 209,9 |
| F. Coutard | 2,07 ± 0,09 | 8,45 ± 0,04 | 1,85 ± 0,01 | 1,94 ± 0,02 | 145,56 ± 0,35 | 10,63 ± 0,04 | 0,71 ± 0,03 | 0,77 ± 0,01 | 171,9 |
| Grossal | 1,06 ± 0,01 | 8,97 ± 0,33 | 1,62 ± 0,05 | 1,60 ± 0,16 | 132,84 ± 0,32 | 7,80 ± 0,06 | 1,71 ± 0,02 | 1,35 ± 0,06 | 157,0 |
| Gunslebert | 1,03 ± 0,04 | 11,44 ± 0,06 | 1,94 ± 0,03 | 1,90 ± 0,04 | 155,68 ± 1,13 | 11,15 ± 0,10 | nd | 0,55 ± 0,01 | 183,7 |
| Lansing | 0,95 ± 0,00 | 8,39 ± 0,06 | 2,35 ± 0,01 | 1,94 ± 0,01 | 158,88 ± 0,47 | 9,40 ± 0,05 | 0,60 ± 0,01 | 0,78 ± 0,05 | 183,3 |
| L. Espanha | 1,47 ± 0,01 | 9,25 ± 0,04 | 2,46 ± 0,04 | 1,96 ± 0,02 | 161,29 ± 0,25 | 10,98 ± 0,01 | 0,66 ± 0,03 | 0,67 ± 0,04 | 188,7 |
| M. Bollwiller | 1,07 ± 0,02 | 11,51 ± 0,06 | 2,02 ± 0,01 | 2,01 ± 0,01 | 157,81 ± 0,53 | 11,35 ± 0,04 | nd | 0,52 ± 0,08 | 186,3 |
| Morell | 1,02 ± 0,10 | 7,79 ± 0,01 | 1,73 ± 0,01 | 1,96 ± 0,02 | 141,95 ± 0,34 | 9,89 ± 0,04 | 3,29 ± 0,01 | 0,72 ± 0,00 | 168,4 |
| Negreta | 0,88 ± 0,01 | 9,56 ± 0,05 | 1,55 ± 0,01 | 1,99 ± 0,04 | 145,48 ± 0,38 | 10,71 ± 0,03 | 1,83 ± 0,03 | 2,83 ± 0,02 | 174,8 |
| Paulet | 1,09 ± 0,07 | 8,72 ± 0,01 | 2,29 ± 0,04 | 2,00 ± 0,03 | 146,07 ± 0,33 | 11,60 ± 0,05 | 1,82 ± 0,02 | 3,19 ± 0,04 | 176,8 |
| R. Piemont | 1,59 ± 0,10 | 8,00 ± 0,33 | 1,62 ± 0,12 | 1,54 ± 0,06 | 119,94 ± 0,58 | 10,40 ± 0,06 | 4,22 ± 0,03 | 1,09 ± 0,02 | 148,4 |
| Segorbe | 1,51 ± 0,02 | 10,64 ± 0,04 | 1,74 ± 0,05 | 2,63 ± 0,01 | 141,97 ± 0,15 | 13,89 ± 0,02 | 1,59 ± 0,04 | 0,82 ± 0,00 | 174,8 |
| St. M. Jesus | 1,57 ± 0,01 | 6,66 ± 0,07 | 1,86 ± 0,00 | 1,84 ± 0,03 | 127,45 ± 0,10 | 10,61 ± 0,07 | 4,35 ± 0,04 | 1,75 ± 0,05 | 156,1 |
| T. Giffoni | 1,81 ± 0,02 | 8,41 ± 0,05 | 1,82 ± 0,00 | 2,00 ± 0,16 | 163,04 ± 0,64 | 10,40 ± 0,04 | 2,97 ± 0,02 | 0,82 ± 0,00 | 191,3 |
| Média | 1,55 | 9,39 | 2,01 | 2,10 | 149,82 | 11,06 | 2,02 | 1,14 | 178,5 |
| Variação | 0,88 - 3,31 | 6,66 - 11,51 | 1,55 - 2,79 | 1,54 - 3,45 | 119,94 - 178,97 | 7,80 - 13,89 | nd - 4,35 | 0,52 - 3,19 | 148,4 - 209,9 |
| Felgueiras | | | | | | | | | |
| Butler | 0,73 ± 0,10 | 9,24 ± 0,08 | 1,82 ± 0,01 | 2,00 ± 0,01 | 166,98 ± 0,86 | 10,26 ± 0,06 | 0,97 ± 0,05 | 0,48 ± 0,03 | 192,5 |
| Campanica | 0,92 ± 0,07 | 9,34 ± 0,05 | 1,90 ± 0,02 | 1,84 ± 0,02 | 158,71 ± 0,42 | 13,69 ± 0,02 | 1,69 ± 0,03 | 1,05 ± 0,09 | 189,2 |
| Cosford | 1,67 ± 0,17 | 12,00 ± 0,08 | 1,71 ± 0,04 | 1,91 ± 0,04 | 174,68 ± 0,81 | 9,40 ± 0,05 | nd | 0,76 ± 0,08 | 202,1 |
| Couplat | 1,41 ± 0,11 | 8,43 ± 0,01 | 1,52 ± 0,01 | 1,87 ± 0,11 | 140,84 ± 0,17 | 10,65 ± 0,02 | 1,88 ± 0,19 | 1,05 ± 0,03 | 167,6 |
| Ennis | 1,42 ± 0,03 | 7,24 ± 0,08 | 1,74 ± 0,02 | 1,62 ± 0,15 | 140,56 ± 0,38 | 8,39 ± 0,05 | nd | 0,35 ± 0,03 | 161,3 |
| F. Coutard | 1,02 ± 0,11 | 7,48 ± 0,03 | 2,28 ± 0,11 | 1,15 ± 0,08 | 118,97 ± 0,42 | 8,75 ± 0,09 | 1,33 ± 0,08 | 0,69 ± 0,11 | 140,7 |
| M. Bollwiller | 1,25 ± 0,02 | 14,08 ± 0,17 | 1,60 ± 0,03 | 1,76 ± 0,06 | 165,06 ± 1,00 | 9,31 ± 0,08 | nd | 0,50 ± 0,06 | 194,1 |
| Morell | 0,95 ± 0,02 | 10,58 ± 0,08 | 1,60 ± 0,01 | 1,76 ± 0,03 | 154,60 ± 0,38 | 11,00 ± 0,41 | 1,89 ± 0,04 | 0,49 ± 0,04 | 182,9 |
| Paulet | 0,69 ± 0,07 | 8,08 ± 0,15 | 1,68 ± 0,02 | 1,87 ± 0,06 | 141,10 ± 1,36 | 7,59 ± 0,06 | 1,57 ± 0,02 | nd | 162,6 |
| T. Giffoni | 1,27 ± 0,08 | 8,54 ± 0,04 | 1,93 ± 0,05 | 1,82 ± 0,15 | 158,01 ± 0,40 | 11,86 ± 0,02 | 0,95 ± 0,01 | 1,70 ± 0,18 | 186,1 |
| Média | 1,13 | 9,50 | 1,73 | 1,76 | 151,95 | 10,09 | 1,47 | 0,79 | 177,9 |
| Variação | 0,69 - 1,67 | 7,24 - 14,08 | 1,29 - 2,18 | 1,15 - 2,00 | 118,97 - 174,68 | 7,59 - 13,69 | nd - 1,89 | nd - 1,70 | 140,7 - 202,1 |

continuação da Tabela 5.1.

| Cultivar | Colesterol | Campesterol | Estigmasterol | Clerosterol | β -Sitosterol | Δ^5 -Avenasterol* | Δ^7 -Estigmasterol* | Δ^7 -Avenasterol | Total |
|-------------------|-------------|--------------|---------------|-------------|---------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------|
| Ano: 2003 | | | | | | | | | |
| Butler | 0,80 ± 0,02 | 7,93 ± 0,00 | 1,76 ± 0,04 | 1,93 ± 0,20 | 136,84 ± 0,20 | 11,85 ± 0,04 | 3,45 ± 0,12 | 1,45 ± 0,04 | 166,0 |
| Campanica | 0,79 ± 0,02 | 6,70 ± 0,02 | 1,48 ± 0,02 | 1,28 ± 0,35 | 112,81 ± 0,35 | 9,98 ± 0,11 | 3,88 ± 0,03 | 1,17 ± 0,03 | 138,1 |
| Cosford | 1,78 ± 0,05 | 11,86 ± 0,08 | 2,41 ± 0,13 | 1,95 ± 0,47 | 177,48 ± 0,47 | 17,58 ± 0,01 | nd | 1,30 ± 0,05 | 214,4 |
| Couplat | 0,98 ± 0,05 | 7,06 ± 0,08 | 1,64 ± 0,04 | 1,56 ± 0,34 | 126,96 ± 0,34 | 9,89 ± 0,45 | 1,89 ± 0,11 | 0,93 ± 0,03 | 150,9 |
| Ennis | 0,57 ± 0,01 | 7,55 ± 0,00 | 2,55 ± 0,01 | 2,11 ± 0,29 | 161,40 ± 0,29 | 17,64 ± 0,11 | nd | 0,87 ± 0,02 | 192,7 |
| F. Coutard | 1,08 ± 0,16 | 6,43 ± 0,10 | 1,33 ± 0,03 | 1,49 ± 0,99 | 113,74 ± 0,99 | 11,44 ± 0,10 | 1,10 ± 0,04 | 0,71 ± 0,07 | 137,3 |
| Grossal | 0,70 ± 0,01 | 8,78 ± 0,29 | 1,62 ± 0,07 | 1,56 ± 0,26 | 123,59 ± 0,26 | 11,06 ± 0,26 | 2,17 ± 0,08 | 1,29 ± 0,01 | 150,8 |
| Gunslebert | 1,12 ± 0,01 | 11,42 ± 0,02 | 2,22 ± 0,01 | 2,20 ± 0,58 | 181,14 ± 0,58 | 16,00 ± 0,04 | nd | 0,86 ± 0,04 | 215,0 |
| Lansing | 1,24 ± 0,02 | 7,36 ± 0,14 | 2,46 ± 0,05 | 2,19 ± 1,48 | 155,88 ± 1,48 | 15,30 ± 0,10 | 0,81 ± 0,08 | 1,54 ± 0,01 | 186,8 |
| L. Espanha | 0,61 ± 0,02 | 11,34 ± 0,09 | 3,13 ± 0,03 | 2,88 ± 0,68 | 192,67 ± 0,68 | 16,18 ± 0,03 | 0,50 ± 0,03 | 0,60 ± 0,06 | 227,9 |
| M. Bollwiller | 0,53 ± 0,02 | 10,64 ± 0,01 | 1,87 ± 0,02 | 1,70 ± 0,14 | 142,17 ± 0,14 | 16,61 ± 0,02 | nd | 1,09 ± 0,06 | 174,6 |
| Morell | 2,81 ± 0,04 | 9,75 ± 0,07 | 1,56 ± 0,04 | 1,56 ± 0,59 | 141,91 ± 0,59 | 13,18 ± 0,11 | 2,06 ± 0,14 | 1,42 ± 0,05 | 174,3 |
| Negreta | 0,96 ± 0,09 | 9,69 ± 0,05 | 1,50 ± 0,01 | 1,76 ± 0,47 | 154,77 ± 0,47 | 15,87 ± 0,03 | 0,83 ± 0,07 | 1,14 ± 0,03 | 186,5 |
| Paulet | 1,67 ± 0,07 | 7,46 ± 0,14 | 1,88 ± 0,05 | 1,73 ± 0,48 | 125,01 ± 0,48 | 12,92 ± 0,05 | 1,81 ± 0,06 | 1,39 ± 0,05 | 153,9 |
| R. Piemont | 1,27 ± 0,03 | 7,07 ± 0,01 | 1,42 ± 0,03 | 1,64 ± 0,23 | 115,47 ± 0,23 | 10,93 ± 0,06 | 4,92 ± 0,10 | 2,31 ± 0,04 | 145,0 |
| Segorbe | 0,64 ± 0,02 | 11,27 ± 0,08 | 1,58 ± 0,07 | 2,20 ± 0,68 | 148,57 ± 0,68 | 14,27 ± 0,06 | 1,15 ± 0,05 | 0,57 ± 0,00 | 180,2 |
| St. M. Jesus | 0,92 ± 0,03 | 6,70 ± 0,07 | 1,74 ± 0,02 | 1,93 ± 0,40 | 145,88 ± 0,40 | 14,48 ± 0,11 | 4,46 ± 0,00 | 1,49 ± 0,02 | 177,6 |
| T. Giffoni | 1,76 ± 0,09 | 6,16 ± 0,05 | 1,43 ± 0,02 | 1,73 ± 1,41 | 134,11 ± 1,41 | 11,65 ± 0,17 | 2,85 ± 0,06 | 1,68 ± 0,11 | 161,4 |
| Média | 1,12 | 8,62 | 1,86 | 1,86 | 143,91 | 13,71 | 2,28 | 1,21 | 174,1 |
| Varição | 0,53 - 2,81 | 6,16 - 11,86 | 1,22 - 3,13 | 1,28 - 2,88 | 112,81 - 192,67 | 9,89 - 17,64 | nd - 4,92 | 0,57 - 2,31 | 137,3 - 227,9 |
| Felgueiras | | | | | | | | | |
| Butler | 1,04 ± 0,03 | 6,37 ± 0,07 | 1,56 ± 0,02 | 1,54 ± 0,01 | 124,80 ± 0,91 | 10,78 ± 0,13 | 1,94 ± 0,18 | 1,39 ± 0,01 | 149,4 |
| Campanica | 0,69 ± 0,04 | 9,13 ± 0,01 | 1,94 ± 0,03 | 2,17 ± 0,06 | 152,49 ± 0,83 | 12,98 ± 0,06 | 2,24 ± 0,02 | 1,29 ± 0,02 | 182,9 |
| Cosford | 0,34 ± 0,01 | 11,96 ± 0,16 | 1,83 ± 0,02 | 1,74 ± 0,10 | 172,41 ± 0,37 | 12,26 ± 0,08 | nd | 1,26 ± 0,03 | 201,8 |
| Couplat | 0,58 ± 0,04 | 7,55 ± 0,23 | 1,64 ± 0,03 | 1,76 ± 0,29 | 156,82 ± 0,99 | 10,42 ± 0,07 | 1,37 ± 0,04 | 1,03 ± 0,08 | 181,2 |
| Ennis | 1,69 ± 0,02 | 8,56 ± 0,04 | 2,50 ± 0,02 | 1,81 ± 0,03 | 150,30 ± 0,58 | 11,86 ± 0,06 | nd | 0,56 ± 0,03 | 177,3 |
| F. Coutard | 1,05 ± 0,00 | 7,42 ± 0,09 | 1,48 ± 0,03 | 1,32 ± 0,04 | 120,79 ± 0,16 | 11,56 ± 0,12 | 1,21 ± 0,03 | 0,71 ± 0,04 | 146,0 |
| L. Espanha | 0,98 ± 0,02 | 8,00 ± 0,04 | 1,64 ± 0,01 | 1,50 ± 0,03 | 136,47 ± 0,39 | 9,17 ± 0,04 | 1,18 ± 0,04 | 0,86 ± 0,02 | 160,1 |
| M. Bollwiller | 1,74 ± 0,06 | 13,70 ± 0,05 | 1,88 ± 0,01 | 1,46 ± 0,04 | 150,72 ± 0,30 | 10,14 ± 0,06 | nd | 1,08 ± 0,02 | 180,7 |
| Morell | 0,83 ± 0,02 | 9,37 ± 0,05 | 1,18 ± 0,16 | 1,35 ± 0,05 | 129,63 ± 0,21 | 8,52 ± 0,04 | 3,53 ± 0,25 | 2,64 ± 0,23 | 157,4 |
| Negreta | 2,49 ± 0,01 | 11,05 ± 0,13 | 1,63 ± 0,04 | 1,66 ± 0,07 | 146,69 ± 1,70 | 11,26 ± 0,16 | 3,48 ± 0,14 | 2,48 ± 0,03 | 180,7 |
| Paulet | 1,01 ± 0,08 | 7,85 ± 0,08 | 1,61 ± 0,01 | 1,38 ± 0,09 | 137,15 ± 0,43 | 10,45 ± 0,04 | 2,37 ± 0,09 | 1,88 ± 0,04 | 164,0 |
| Segorbe | 0,92 ± 0,03 | 9,78 ± 0,07 | 1,31 ± 0,01 | 1,84 ± 0,19 | 130,25 ± 0,59 | 12,83 ± 0,06 | 0,89 ± 0,03 | 1,21 ± 0,09 | 159,5 |
| T. Giffoni | 2,42 ± 0,04 | 8,76 ± 0,09 | 1,98 ± 0,04 | 1,54 ± 0,10 | 168,28 ± 0,80 | 10,54 ± 0,16 | 1,16 ± 0,08 | 0,66 ± 0,04 | 195,4 |
| Média | 1,21 | 9,19 | 1,71 | 1,62 | 144,37 | 10,98 | 1,94 | 1,31 | 172,0 |
| Varição | 0,34 - 2,49 | 6,37 - 13,70 | 1,18 - 2,50 | 1,32 - 2,17 | 120,79 - 172,41 | 8,52 - 12,98 | nd - 3,53 | 0,56 - 2,64 | 146,0 - 201,8 |

Em todas as cultivares, o β -sitosterol foi o composto maioritário, seguido pelo Δ^5 -avenasterol e pelo campesterol, estes últimos ocorrendo com magnitudes semelhantes entre si, para a generalidade das amostras. Este facto aponta para uma certa consistência no que diz respeito ao perfil quantitativo das amostras de óleo de avelã estudadas. Pela observação dos valores apresentados na Tabela 4.1, pode-se verificar a presença de colesterol, se bem que em quantidades diminutas em todas as amostras estudadas. De facto, a ideia de que os alimentos de origem vegetal são isentos de colesterol é errónea, sendo que este composto frequentemente representa entre 1 a 2% do teor total de esteróis de várias plantas (Moreau et al., 2002).

Os teores totais de fitosteróis estão de acordo com os valores médios tabelados disponíveis (Firestone e Reina, 1996; Kamm et al., 2001). Na literatura pode-se ainda encontrar referências a valores de fitosteróis em óleos de avelã obtidos em trabalhos prévios, com indicação das cultivares em estudo e da proveniência das amostras. Parcerisa e co-autores (1998) detectaram e quantificaram quatro fitosteróis em dezassete cultivares de avelã, incluindo as cvs. de origem Espanhola, Italiana, Americana e Turca, todas elas cultivadas no mesmo campo em Oregon, USA. Das dezassete cultivares analisadas, 7 são comuns às estudadas neste trabalho, nomeadamente as cvs. Butler, Daviana, Ennis, Fertille de Coutard, Negreta, Segorbe e Tonda di Giffoni. No geral, as cultivares comuns cultivadas no Oregon apresentaram teores inferiores em compostos individuais e, conseqüentemente, teor total em fitosteróis igualmente inferior (variando entre 93,9 e 153,9 mg/100 g de óleo) comparativamente aos valores obtidos para as mesmas cultivares cultivadas em Portugal (entre 137,3 e 263 mg/100 g de óleo). Comparando os resultados em termos de percentagens relativas dos compostos identificados, verifica-se que as cultivares estudadas por Parcerisa et al. (1998) têm teores superiores em β -sitosterol (85,3 a 90,8%) comparativamente às cultivadas em Portugal (82,1 a 85,6%). Esta diferença poder-se-á dever ao facto de, no trabalho executado pelos referidos autores, apenas quatro fitosteróis serem quantificados, mas também a diferenças nas metodologias analíticas utilizadas.

Como referido na introdução, a determinação do teor total de fitosteróis, bem como o estudo do perfil qualitativo e quantitativo, pode ser uma ferramenta útil na avaliação da qualidade e/ou autenticidade de diversos óleos vegetais (Firestone e Reina, 1996; Aparicio e Aparicio-Ruiz, 2000; Parcerisa et al., 2000; Ulberth e Buchgraber, 2000; Kamm et al., 2001; Benitez-Sánchez et al., 2003; Cercaci et al., 2003; Álamo et al., 2004; Casas et al., 2004). Segundo alguns autores, pode ser um método de grande auxílio para a detecção de adulterações de azeite com óleo de avelã (Parcerisa et al., 2000; Cercaci et al., 2003). No caso de adulterações de azeite com elevadas quantidades de óleo de avelã, a avaliação deste parâmetro *per se* poderá ser de grande utilidade. O contributo fornecido pela análise dos perfis qualitativo e quantitativo de fitosteróis para a avaliação de adulterações é menor

quando a quantidade de adulterante é baixa, principalmente se esta for <10%, continuando no entanto a ser útil conjugado com outros parâmetros (Parcerisa *et al.*, 2000). De facto, comparando os perfis em termos de fitosteróis de azeite e óleo de avelã, observam-se diferenças qualitativas e quantitativas entre ambos, diferenças estas que possibilitam a diferenciação de amostras estremes pela análise deste parâmetro. Curiosamente, segundo a legislação estabelecida no Regulamento CEE nº. 2568/91 relativo à composição química do azeite, a maioria das amostras estudadas (à excepção das cvs. Ennis, Lansing, Santa Maria de Jesus e Tonda di Giffoni, provenientes de Vila Real, 2002) excederam o limite máximo de 4% de campesterol imposto para o azeite; à excepção da cvs. Ennis (Vila Real 2001, 2002, 2003 e Felgueiras 2002), Butler (Felgueiras 2003) e Couplat (Felgueiras 2003), nenhuma cultivar cumpre o limite mínimo ($\geq 93\%$) de β -sitosterol aparente (soma de clerosterol, β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol, β -sitostanol e $\Delta^{5,24}$ - estigmastenol) imposto para o azeite. A maioria das cultivares apresenta percentagens de Δ^7 -estigmastenol superiores às permitidas para o azeite ($\leq 0,5\%$). Como excepções mais relevantes citam-se as cvs. Cosford, Ennis e Merveille de Bollwiller, para as quais o referido composto não é detectado, qualquer que seja o ano e a localização geográfica considerada, e as cvs. Daviana, Lansing e Longa d' Espanha, todas elas com valores de Δ^7 -estigmastenol caracteristicamente mais baixos comparativamente às restantes cultivares estudadas. A maioria das amostras apresenta também teores de colesterol ligeiramente superiores ao máximo estipulado para o azeite (0,5%). Os valores apresentados na Tabela 5.2 permitem fazer a comparação entre os resultados obtidos para os diferentes compostos no óleo de avelã e os valores médios descritos na literatura referentes ao azeite.

TABELA 5.2. Valores médios (mínimo - máximo) da composição em fitosteróis (mg/100 g de óleo) de azeites com diversas proveniências, reportados na literatura.

| Proveniência | Col | Camp | Estg | Cler | β -sit | Δ^5 -aven | Δ^7 -estig | Δ^7 -aven | Total |
|------------------------------|-----------|------------|-----------|-----------|---------------|------------------|-------------------|------------------|------------|
| Europa ^a | nr | 2,5 - 11,4 | 0,5 - 6,7 | nr | 68,3 - 261,0 | 3,4 - 26,6 | nr | nr | ≥ 100 |
| Norte de Africa ^a | nr | 5,9 - 6,4 | 1,6 - 2,6 | nr | 154,5 - 185,1 | 15,8 - 21,4 | 0,1 - 0,4 | 0,8 - 1,4 | 180-230 |
| Turquia ^a | nr | 3,3 - 7,4 | 1,5 - 1,7 | nr | 100,0 - 202,5 | 3,0 - 21,8 | 0,2 - 0,9 | 0,5 - 3,0 | 110-170 |
| Espanha ^b | 0,5 - 1,0 | 2,9 - 8,1 | 0,7 - 1,5 | 1,1 - 2,3 | 89,8 - 177,2 | 8,8* - 21,9 | 0,2 - 0,5 | 0,2 - 0,7 | 111- 203 |

a: adaptado de Benitez-Sánchez *et al.*, 2003; b: adaptado de Salvador *et al.*, 2003 e de Casas *et al.*, 2004; nr. não referido; *: β -sitostanol+ Δ^5 -avenasterol.

Para avaliar diferenças associadas aos factores estudados, nomeadamente ano de produção, cultivar e localização geográfica, procedeu-se à análise estatística dos resultados obtidos seguindo um procedimento idêntico ao referido nos capítulos anteriores.

De forma a verificar a influência do ano, efectuaram-se testes MANOVA e Hotelling T^2 , considerando os dados obtidos para as 18 cultivares comuns aos três anos de estudo,

provenientes de Vila Real, e tendo como factor agrupante o ano de produção. Uma vez que os resultados obtidos demonstraram diferenças significativas entre todos os grupos comparados (Tabela 5.3), procedeu-se à realização de testes *t*-Student de forma a verificar os compostos responsáveis pelas referidas diferenças. Os resultados apresentados na Tabela 5.3 indicam que, em termos da composição em fitosteróis, as avelãs colhidas em 2001 e 2002 parecem ser mais similares entre si, ao passo que as colhidas em 2003 parecem diferenciar-se mais das restantes. Verificam-se diferenças significativas em termos do teor de campesterol, qualquer que seja o par de grupos comparado. No que respeita ao composto maioritário (β -sitosterol) não se observa a existência de diferenças significativas, quaisquer que sejam os grupos comparados.

TABELA 5.3. Testes MANOVA, Hotelling T^2 e *t*-Student relativos às diferenças entre anos de produção em termos da composição em fitosteróis de avelãs.

| RESUMO DO TESTE MANOVA | | | |
|--|---|--|---|
| Wilks'Lambda = 0,29132; $F_{(16,316)} = 16,842$; $p < 0,0000$ | | | |
| RESUMO DOS TESTES HOTELLING T^2 E <i>t</i> -STUDENT | | | |
| | 2001 | 2002 | 2003 |
| 2001 | ----- | campesterol, estigmasterol, clerosterol | colesterol, campesterol, Δ^5 -avenasterol, Δ^7 -estigmasterol |
| 2002 | $T^2 = 40,2281$; $F_{(8,105)} = 4,7142$ $p < 0,00006$ | ----- | colesterol, campesterol, clerosterol, Δ^5 -avenasterol |
| 2003 | $T^2 = 274,128$; $F_{(8,102)} = 32,065$ $p < 0,0000$ | $T^2 = 221,090$; $F_{(8,102)} = 25,861$ $p < 0,0000$ | ----- |

Triângulo inferior: valores de F_{obs} (Hotelling T^2) e nível de significância; triângulo superior: esteróis para os quais os valores de t_{obs} são significativos ($p < 0,05$).

Subsequentemente, efectuou-se uma DA “forward-stepwise”, tendo-se seleccionado três compostos como os mais discriminantes, nomeadamente o campesterol, Δ^5 -avenasterol e clerosterol, com base nos quais se procedeu a uma CVA, que originou o gráfico representado na Figura 5.5. As variáveis seleccionadas por este processo estão de acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.4.

Observando a Figura 5.5 constata-se que 92,1% da informação contida nos dados se encontra representada na primeira dimensão, ao passo que a segunda dimensão representa apenas 7,9% da variância dos dados.

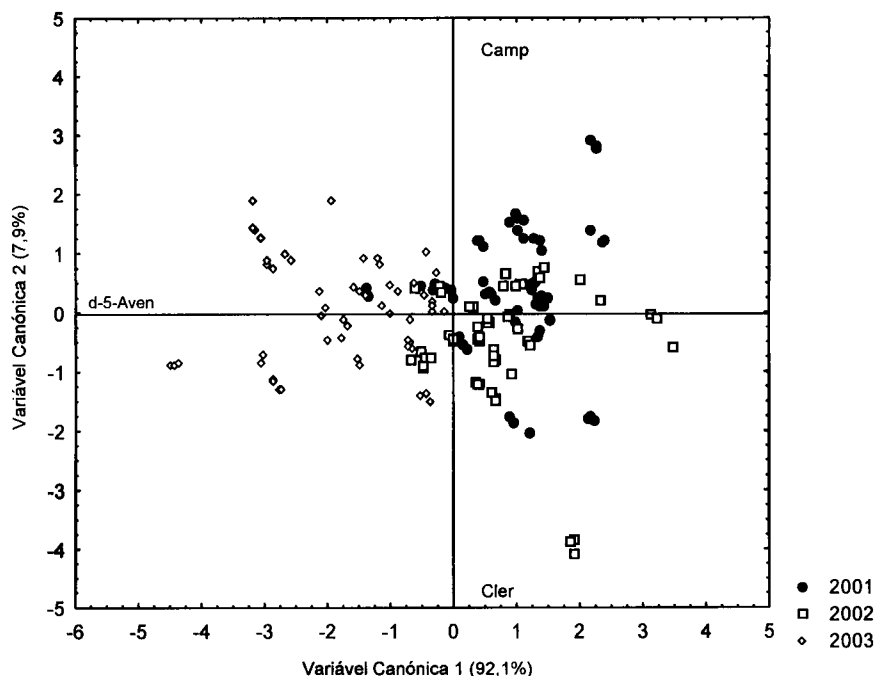


FIGURA 5.5. Resultados da CVA relativa à composição em fitosteróis do óleo de avelã, tendo o ano como factor agrupante e realizada com base nas variáveis seleccionadas pela análise DA. d-5-Aven: Δ^5 -avenasterol; Camp: campesterol; Cler: clerosterol.

Pode-se constatar que, apesar de existirem algumas diferenças entre as amostras, não se verifica a formação de grupos distintos. No entanto, os resultados parecem sugerir que as amostras colhidas em 2003 se diferenciam mais das restantes (2001 e 2002), enquanto que as amostras de 2001 e 2002 parecem ser mais semelhantes entre si, o que se coaduna com os resultados apresentados na Tabela 5.3. O ano de 2003 diferencia-se de 2001 e 2002 em termos do teor em Δ^5 -avenasterol, o segundo composto maioritário, o qual, em 2003, é superior ao registado nos restantes anos.

De um forma geral, os resultados da análise estatística indicam que uma reduzida influência do factor “ano de produção” na composição de fitosteróis do óleo de avelã.

Uma vez que os resultados obtidos sugerem a existência de diferenças entre cultivares, procedeu-se de forma similar à descrita na análise anterior, de forma a avaliar a existência de possíveis diferenças entre cultivares. Considerando o elevado número de cultivares, optou-se por uma abordagem semelhante à descrita nos capítulos 3 e 4, isto é, agrupar as diferentes cultivares segundo a sua origem, tendo sido formados quatro grupos: Espanha, Itália, USA e um grupo que integra Alemanha, França e Inglaterra, denominado como “Outras”.

Os resultados obtidos nos testes MANOVA, Hotelling T^2 e t -Student, apresentam-se na Tabela 5.4. Verifica-se que as diferenças entre grupos são, regra geral, explicadas por vários

compostos, à excepção do que acontece para os grupos “USA” e “Outras”, os quais parecem ser muito similares, apresentando diferenças significativas apenas no que respeita aos teores de campesterol. Consta-se que o teor em β -sitosterol do grupo de cultivares Italianas é significativamente diferente quando comparado com os restantes grupos. De forma idêntica, o grupo de cultivares Espanholas diferencia-se dos demais grupos em termos de campesterol, estigmasterol e Δ^7 -estigmasterol. Na Tabela 5.4, pode-se ainda observar que o colesterol não parece ser importante para a diferenciação de grupos, quaisquer que sejam os pares comparados.

A DA “forward stepwise” realizada com os mesmos dados, agrupados segundo as origens referidas, permitiu seleccionar 3 variáveis (Δ^7 -estigmasterol, campesterol e estigmasterol) com base nas quais se realizou uma CVA que possibilitou obter o gráfico representado na Figura 5.6. No gráfico da Figura 5.6 encontra-se representada 99,4% da variância dos dados, sendo que a primeira dimensão representa 78,9% ao passo que a segunda dimensão representa apenas 20,5%. Verifica-se a existência de algumas diferenças entre os grupos considerados sendo, no entanto, evidente a dispersão de resultados dentro de cada um dos grupos.

TABELA 5.4. Testes MANOVA, Hotelling T^2 e t-Student relativos às diferenças dos grupos considerados, em termos da sua composição em fitosteróis e segundo as origens das cultivares.

| RESUMO DO TESTE MANOVA | | | | |
|---|---|---|--|---|
| Wilks' Lambda = 0,21667, $F_{(24,445)} = 13,192$; $p < 0,0000$ | | | | |
| RESUMO DOS TESTES HOTELLING T^2 E t-STUDENT | | | | |
| | USA | ITÁLIA | ESPANHA | OUTRAS |
| USA | ----- | estig, clero, β -sit, Δ^5 -aven, Δ^7 -estig, Δ^7 -aven | camp, estig, Δ^7 -estig, Δ^7 -aven | camp |
| ITÁLIA | $T^2 = 95,3397$ $F_{(8,45)} = 10,313$ $p < 0,00000$ | ----- | camp, estig, β -sit, Δ^5 -aven, Δ^7 -estig, | camp, estig, clero, β -sit, Δ^5 -aven, Δ^7 -estig, Δ^7 -aven |
| ESPANHA | $T^2 = 69,2445$ $F_{(8,63)} = 7,7900$ $p < 0,00000$ | $T^2 = 115,411$ $F_{(8,81)} = 9,4484$ $p < 0,00000$ | ----- | camp, estig, clero, β -sit, Δ^7 -estig, Δ^7 -aven |
| OUTRAS | $T^2 = 437,952$ $F_{(8,87)} = 50,667$ $p < 0,0000$ | $T^2 = 437,952$ $F_{(8,87)} = 50,667$ $p < 0,0000$ | $T^2 = 238,119$ $F_{(8,105)} = 27,905$ $p < 0,0000$ | ----- |

Triângulo inferior: testes Hotelling T^2 e t-Student, valores de F_{obs} (Hotelling T^2) e nível de significância; triângulo superior: compostos para os quais os valores de t_{obs} são significantes ($p < 0,05$); camp: campesterol, estig: estigmasterol, clero: cleroesterol, β -sit: β -sitosterol, Δ^5 -aven: Δ^5 -avenasterol, Δ^7 -estig: Δ^7 -estigmasterol, Δ^7 -aven: Δ^7 -avenasterol.

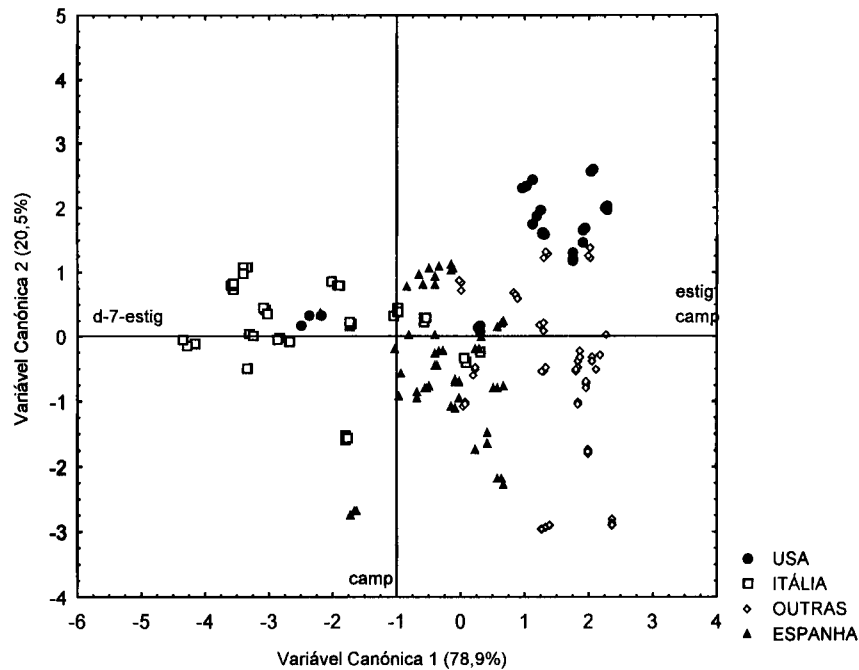


FIGURA 5.6. Resultados da análise CVA relativa à composição em fitosteróis, tendo a origem das cultivares como factor agrupante e realizada com base nas variáveis seleccionadas mediante a análise DA. d-7-estig: Δ^7 -estigmastenol; camp: campesterol, estig: estigmasterol.

Na generalidade, as cultivares Italianas diferenciam-se pelos seus teores caracteristicamente superiores em Δ^7 -estigmastenol, embora a cultivar Tonda di Giffoni apresente, tendencialmente, valores inferiores que as restantes cultivares Italianas, provocando uma certa dispersão de resultados dentro do grupo. Refira-se que a importância das variáveis estigmasterol e campesterol na primeira dimensão, é inferior à da variável Δ^7 -estigmastenol, contribuindo contudo para a explicação dos resultados. Desta forma pode ainda inferir-se que, regra geral, as cultivares Italianas apresentam, em média, valores inferiores de campesterol e estigmasterol comparativamente às restantes cultivares estudadas. O grupo USA, salvo algumas excepções, caracteriza-se por valores inferiores de Δ^7 -estigmastenol, apresentando ainda teores de estigmasterol tendencialmente elevados relativamente aos valores médios apresentados pelos restantes grupos de cultivares. De forma idêntica à referida para a cv. T. Giffoni, a cv. Butler provoca alguma dispersão de resultados dentro do grupo USA, uma vez que apresenta um comportamento variável em termos de Δ^7 -estigmastenol. Pelo contrário, durante os três anos de estudo, a cv. Lansing apresentou valores baixos do referido composto, o qual não foi detectado na cv. Ennis, o que poderá traduzir uma característica desta cultivar.

O grupo denominado "Outras", à semelhança das cultivares Americanas, apresenta teores caracteristicamente baixos de Δ^7 -estigmastenol, não se tendo detectado este composto nas cvs. Cosford e Merveille de Bollwiller, qualquer que seja o ano ou localização

geográfica considerados. O mesmo composto não foi detectado na cv. Gunslebert em dois dos anos estudados (2002 e 2003) e foi detectado nas cvs. Daviana e Longa d' Espanha em valores inferiores aos apresentados pela generalidade das cultivares Italianas e Espanholas. À semelhança do referido nos grupos anteriores, a cv. Fertile de Coutard apresentou valores algo variáveis, por vezes superiores aos apresentados pelas restantes cultivares do grupo, provocando alguma dispersão de resultados dentro do grupo. Na generalidade, pode ainda dizer-se que este grupo, comparativamente aos restantes, apresenta valores tendencialmente superiores em estigmasterol e campesterol. Relativamente a este último composto, a maioria das cultivares apresenta teores elevados, apresentando inclusivamente os valores máximos obtidos, considerando a globalidade das cultivares estudadas (Tabela 5.1). Existem contudo algumas cultivares pertencentes a este grupo que apresentam valores inferiores, provocando um aumento das diferenças dentro do grupo conduzindo a uma maior dispersão de resultados no mesmo.

Comparativamente aos restantes grupos, o grupo “Espanha” parece apresentar características intermédias, uma vez que se aproxima bastante da intersecção dos eixos das duas dimensões. Para além de se verificar que algumas amostras se afastam da média das restantes cvs. Espanholas, observa-se ainda alguma similaridade entre cvs. Espanholas e cvs. pertencentes a outros grupos, o que provoca uma sobreposição entre grupos distintos.

As possíveis diferenças relacionadas com a localização geográfica das amostras foram estudadas mediante a realização de uma DA “forward-stepwise”, utilizando a localização geográfica como factor agrupante. Foram seleccionadas 5 variáveis, nomeadamente Δ^5 -avenasterol, colesterol, Δ^7 -estigmastenol, clerosterol e β -sitosterol, com base nos quais se realizou uma CVA, obtendo-se o gráfico da Figura 5.7.

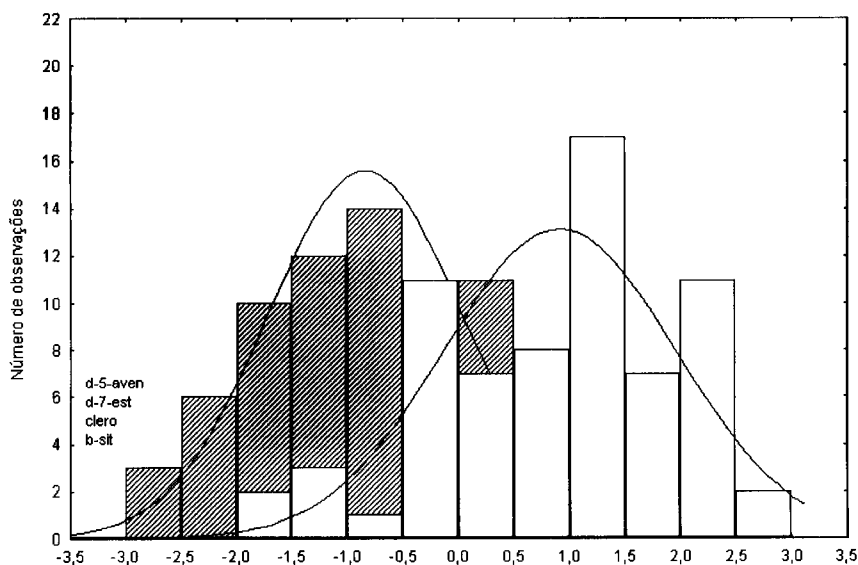


FIGURA 5.7. Resultados da CVA relativa à composição em fitosteróis do óleo de avelã, tendo a localização geográfica como factor agrupante. : Felgueiras; : Vila Real.

Refira-se que aumentando o valor de “F-to-enter” de forma a diminuir o número de variáveis seleccionadas, passa-se de quatro variáveis directamente para apenas uma variável (Δ^5 -avenasterol), o que não permite a realização da CVA. Este facto indica que a referida variável é a mais importante na discriminação das localizações geográficas e que a restante informação utilizada para a diferenciação dos grupos provém do conjunto das outras três variáveis. A análise foi efectuada com os dados obtidos para as cultivares comuns às duas localizações (Felgueiras e Vila Real) nos anos 2002 e 2003. Como se pode verificar na Figura 5.7, apesar de existirem algumas diferenças, sobretudo em termos de teor em Δ^5 -avenasterol que é superior nas amostras provenientes de Vila Real, existe uma considerável sobreposição de resultados. Estes resultados parecem indicar que a localização geográfica poderá exercer alguma influência em termos da composição em fitosteróis, a qual, contudo, não parece ser muito significativa, traduzindo-se sobretudo nos teores de Δ^5 -avenasterol.

5. 2. Nogueira

No óleo extraído de noz foram quantificados nove fitosteróis: colesterol, campesterol, estigmasterol, clerosterol, β -sitosterol, β -sitostanol, Δ^5 -avenasterol, Δ^7 -estigmasterol e Δ^7 -avenasterol. A separação dos compostos pode ser observada na Figura 5.8, a qual mostra um cromatograma típico obtido segundo a metodologia descrita, em diferentes ampliações.

A Tabela 5.5 apresenta os valores médios referentes a cada composto quantificado, por cultivar, ano de produção e localização geográfica.

Observando os valores da Tabela 5.5, verificam-se algumas diferenças qualitativas entre as diversas amostras estudadas, nomeadamente no que diz respeito aos compostos minoritários estigmasterol, Δ^7 -estigmasterol e Δ^7 -avenasterol, os quais não foram detectados em algumas das amostras estudadas.

Em todas as amostras o composto maioritário foi o β -sitosterol, seguido pelo campesterol e Δ^5 -avenasterol. Os valores destes compostos maioritários estão de acordo com os valores médios referenciados na bibliografia para o óleo de noz (Firestone e Reina, 1996, Kamm *et al.*, 2001). Apesar de, geralmente, se considerar que os fitosteróis predominantes nas plantas superiores são o β -sitosterol, campesterol e estigmasterol (Piironen *et al.*, 2000; Kritchevsky e Chen, 2005), no óleo de noz verificaram-se teores vestigiais de estigmasterol (0,3 a 0,8 mg/100 g de óleo, não tendo sido detectado em algumas amostras), valores estes que se encontram de acordo com os dados disponíveis na literatura (Firestone e Reina, 1996, Kamm *et al.*, 2001, Crews *et al.*, 2005b).

Para além destes compostos, detectaram-se ainda colesterol e clerosterol em todas as amostras, se bem que em quantidades reduzidas. Tanto quanto é dado saber, até à realização deste trabalho, os escassos valores existentes na bibliografia relativos à composição da noz em fitosteróis apenas referiam valores médios não sendo feita qualquer referência a qual, ou quais, as cultivares utilizadas, ou à proveniência das amostras utilizadas na obtenção dos dados.

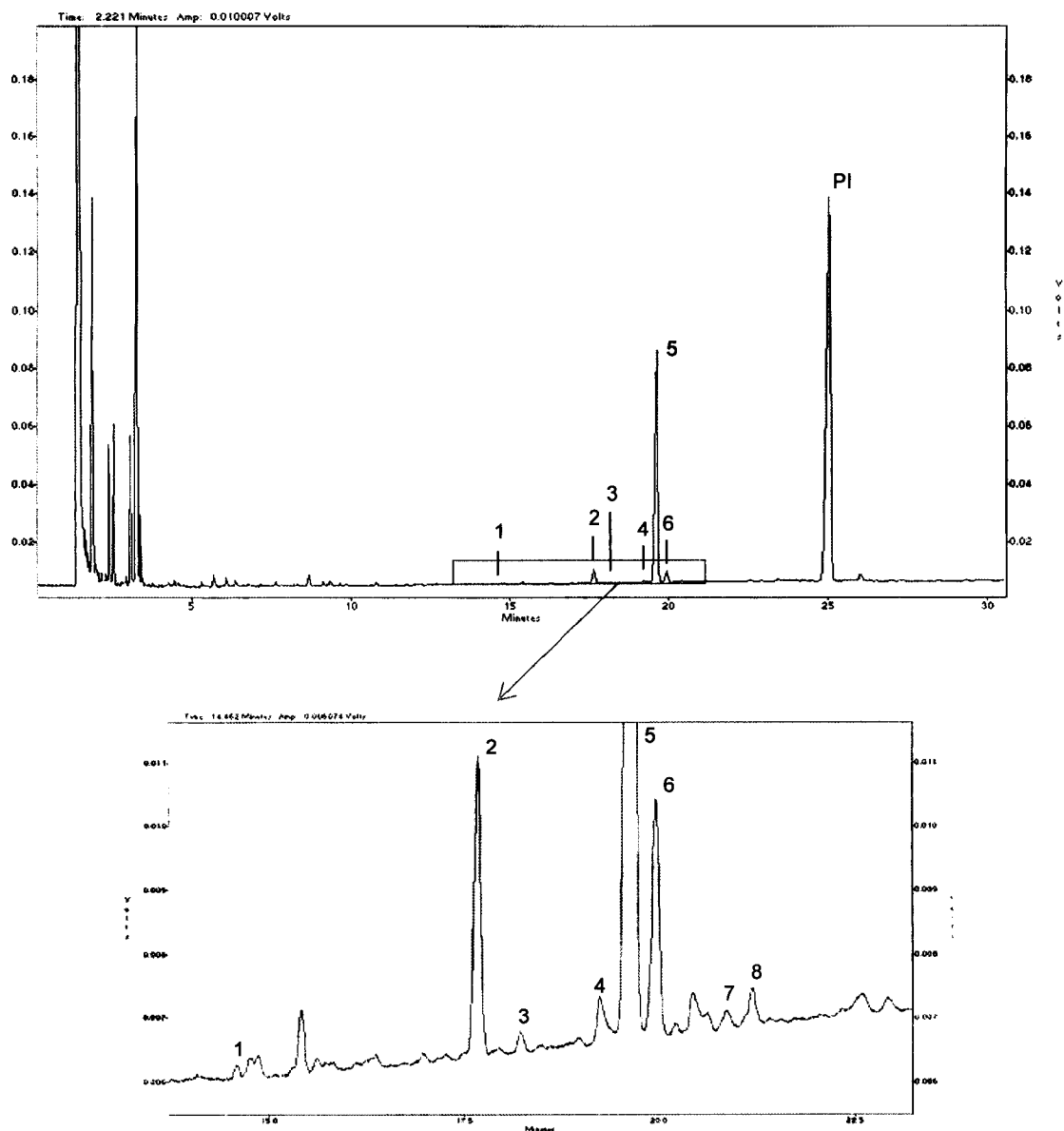


FIGURA 5.8. Cromatograma obtido por GC/FID segundo a metodologia descrita, de uma amostra de óleo de noz, e respectiva ampliação. Picos: 1: colesterol, 2: campesterol, 3: estigmasterol, 4: clerosterol, 5: β -sitosterol, 6: Δ^5 -avenasterol + β -sitostanol, 7: Δ^7 -estigmasterol, 8: Δ^7 -avenasterol, PI: betulina.

TABELA 5.5. Composição em fitosteróis (mg/100 g de óleo) das cultivares de noz estudadas, por ano de produção e localização geográfica.

| Cultivar | FITOESTERÓIS | | | | | | | | | | Total |
|------------------|--------------|--------------|---------------|-------------|---------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------|--|-------|
| | Coolesterol | Campesterol | Estigmasterol | Clerosterol | β -Sitosterol | Δ^5 -Avenasterol* | Δ^7 -Estigmasterol* | Δ^7 -Avenasterol | | | |
| Ano: 2001 | | | | | | | | | | | |
| Bragança | | | | | | | | | | | |
| Franquette | 1,38 ± 0,03 | 8,57 ± 0,20 | 0,51 ± 0,07 | 1,46 ± 0,11 | 138,32 ± 1,80 | 7,30 ± 0,11 | 0,69 ± 0,05 | 1,45 ± 0,29 | 159,67 | | |
| Lara | 0,98 ± 0,09 | 10,82 ± 0,18 | nd | 1,26 ± 0,09 | 170,67 ± 0,21 | 9,79 ± 0,09 | nd | 2,79 ± 0,06 | 196,31 | | |
| Marbot | 2,05 ± 0,04 | 9,64 ± 0,30 | 0,78 ± 0,03 | 2,04 ± 0,08 | 175,71 ± 0,24 | 11,38 ± 0,41 | 0,88 ± 0,09 | 1,12 ± 0,06 | 202,72 | | |
| Mayette | 3,80 ± 0,12 | 8,07 ± 0,17 | 0,65 ± 0,07 | 1,53 ± 0,08 | 151,43 ± 0,49 | 13,31 ± 0,08 | nd | nd | 179,67 | | |
| Mellanaise | 1,37 ± 0,03 | 6,52 ± 0,03 | 0,55 ± 0,03 | 1,11 ± 0,06 | 109,82 ± 0,06 | 7,28 ± 0,03 | nd | 0,52 ± 0,02 | 127,17 | | |
| Parisienne | 0,82 ± 0,04 | 6,12 ± 0,02 | nd | 2,00 ± 0,04 | 109,33 ± 0,04 | 2,50 ± 0,02 | nd | nd | 120,78 | | |
| Média | 1,73 | 8,29 | 0,62 | 1,57 | 142,55 | 8,59 | 0,79 | 1,47 | 164,39 | | |
| Varição | 0,98 - 3,80 | 6,12 - 10,89 | nd - 0,78 | 1,11 - 2,04 | 109,82 - 175,71 | 2,50 - 13,31 | nd - 0,88 | nd - 2,79 | 127,2 - 202,7 | | |
| Ano: 2002 | | | | | | | | | | | |
| Bragança | | | | | | | | | | | |
| Franquette | 1,11 ± 0,16 | 6,50 ± 0,34 | 0,54 ± 0,04 | 1,19 ± 0,07 | 114,85 ± 1,84 | 9,01 ± 0,36 | 1,50 ± 0,10 | 1,62 ± 0,05 | 136,3 | | |
| Lara | 1,10 ± 0,11 | 7,06 ± 0,04 | 0,31 ± 0,03 | 1,67 ± 0,02 | 109,64 ± 0,19 | 9,05 ± 0,04 | nd | 0,47 ± 0,03 | 129,3 | | |
| Marbot | 1,03 ± 0,05 | 7,72 ± 0,23 | 0,65 ± 0,01 | 2,06 ± 0,05 | 112,77 ± 1,92 | 10,15 ± 0,15 | nd | 0,48 ± 0,02 | 134,9 | | |
| Mayette | 1,21 ± 0,02 | 6,56 ± 0,06 | 0,36 ± 0,02 | 1,18 ± 0,06 | 106,47 ± 0,56 | 7,06 ± 0,00 | nd | 0,48 ± 0,01 | 123,3 | | |
| Mellanaise | 1,36 ± 0,01 | 7,59 ± 0,17 | 0,41 ± 0,01 | 1,20 ± 0,01 | 114,79 ± 0,95 | 5,94 ± 0,05 | nd | 0,36 ± 0,04 | 131,7 | | |
| Parisienne | 1,32 ± 0,02 | 10,63 ± 0,58 | 0,30 ± 0,04 | 1,76 ± 0,08 | 124,12 ± 0,62 | 7,19 ± 0,02 | nd | nd | 145,3 | | |
| Média | 1,19 | 7,68 | 0,43 | 1,51 | 113,77 | 8,07 | 1,50 | 0,68 | 133,5 | | |
| Varição | 1,03 - 1,36 | 6,50 - 10,63 | 0,30 - 0,65 | 1,18 - 2,06 | 106,47 - 124,12 | 5,94 - 10,15 | nd - 1,50 | nd - 1,62 | 123,3 - 145,3 | | |
| Ano: 2003 | | | | | | | | | | | |
| Bragança | | | | | | | | | | | |
| Franquette | 0,93 ± 0,02 | 7,15 ± 0,16 | 0,46 ± 0,01 | 1,04 ± 0,07 | 127,59 ± 0,09 | 11,32 ± 0,10 | nd | 0,12 ± 0,02 | 148,6 | | |
| Lara | 1,47 ± 0,05 | 7,96 ± 0,07 | 0,41 ± 0,02 | 1,14 ± 0,03 | 154,90 ± 0,49 | 12,37 ± 0,06 | nd | 0,24 ± 0,02 | 178,5 | | |
| Marbot | 1,00 ± 0,00 | 7,12 ± 0,06 | 0,51 ± 0,02 | 1,05 ± 0,02 | 138,59 ± 0,82 | 11,55 ± 0,29 | nd | nd | 159,8 | | |
| Mayette | 1,36 ± 0,05 | 6,66 ± 0,02 | 0,45 ± 0,02 | 1,03 ± 0,04 | 127,62 ± 0,15 | 10,11 ± 0,13 | nd | nd | 147,2 | | |
| Mellanaise | 0,80 ± 0,13 | 6,66 ± 0,06 | 0,47 ± 0,03 | 1,10 ± 0,07 | 130,91 ± 0,59 | 8,63 ± 0,04 | nd | nd | 148,6 | | |
| Parisienne | 1,19 ± 0,04 | 7,22 ± 0,16 | 0,61 ± 0,06 | 1,06 ± 0,05 | 128,00 ± 0,82 | 9,15 ± 0,02 | nd | nd | 147,2 | | |
| Média | 1,12 | 7,13 | 0,49 | 1,07 | 134,60 | 10,52 | - | 0,18 | 155,0 | | |
| Varição | 0,80 - 1,47 | 6,6 - 7,96 | 0,41 - 0,61 | 1,03 - 1,14 | 127,59 - 154,90 | 8,63 - 12,37 | - | nd - 0,24 | 147,2 - 178,5 | | |
| Coimbra | | | | | | | | | | | |
| Arco | 1,30 ± 0,11 | 7,73 ± 0,05 | 0,53 ± 0,01 | 1,25 ± 0,07 | 132,48 ± 0,64 | 14,42 ± 0,02 | nd | 0,33 ± 0,01 | 158,0 | | |
| Franquette | 0,69 ± 0,01 | 6,52 ± 0,20 | 0,59 ± 0,02 | 1,03 ± 0,02 | 121,39 ± 0,71 | 11,88 ± 0,09 | nd | 0,14 ± 0,02 | 142,2 | | |
| Hartley | 1,37 ± 0,03 | 7,06 ± 0,05 | 0,52 ± 0,02 | 0,96 ± 0,04 | 113,62 ± 0,44 | 7,32 ± 0,02 | nd | 0,43 ± 0,04 | 131,3 | | |
| Lara | 2,17 ± 0,08 | 8,40 ± 0,08 | 0,92 ± 0,03 | 1,22 ± 0,00 | 126,75 ± 0,83 | 9,76 ± 0,05 | nd | 0,77 ± 0,04 | 150,0 | | |
| Mayette | 0,70 ± 0,02 | 7,41 ± 0,02 | 0,74 ± 0,03 | 1,17 ± 0,05 | 129,07 ± 0,05 | 11,02 ± 0,06 | nd | 0,89 ± 0,06 | 151,0 | | |
| Mellanaise | 0,76 ± 0,04 | 7,02 ± 0,04 | 0,38 ± 0,01 | 1,15 ± 0,01 | 133,34 ± 0,08 | 8,62 ± 0,03 | nd | 0,81 ± 0,03 | 152,1 | | |
| Parisienne | 1,05 ± 0,04 | 6,03 ± 0,06 | 0,37 ± 0,01 | 1,00 ± 0,01 | 116,91 ± 0,53 | 9,52 ± 0,03 | nd | nd | 134,9 | | |
| Rego | 2,17 ± 0,15 | 9,87 ± 0,09 | 0,90 ± 0,04 | 1,22 ± 0,04 | 155,01 ± 1,30 | 8,98 ± 0,04 | nd | 0,42 ± 0,01 | 178,6 | | |
| Média | 1,28 | 7,50 | 0,62 | 1,13 | 128,57 | 10,19 | - | 0,54 | 1,3 | | |
| Varição | 0,69 - 2,17 | 6,03 - 9,87 | 0,37 - 0,92 | 0,96 - 1,25 | 113,62 - 155,01 | 7,32 - 14,42 | - | nd - 0,89 | 131,3 - 178,7 | | |

nd: não detectado. * β -sitostanol + Δ^5 -avenasterol.

De forma a verificar a existência, ou não, de diferenças significativas entre anos de produção, cultivares e localizações geográficas, realizou-se a análise estatística dos dados, seguindo um procedimento idêntico ao apresentado nos capítulos anteriores.

A análise iniciou-se pelo estudo das diferenças entre anos de produção, utilizando-se o ano como factor agrupante e considerando apenas os resultados relativos à localização “Bragança”, para a qual foram obtidos dados relativos a três anos de produção consecutivos. A Tabela 5.6 apresenta os resultados obtidos nos testes MANOVA, Hotelling T^2 e t -Student, que indicam a existência de diferenças significativas entre qualquer par de grupos comparados.

TABELA 5.6. Testes MANOVA, Hotelling T^2 e t -Student relativos às diferenças entre anos de produção em termos dos esteróis estudados verificadas para a noz.

| RESUMO DO TESTE MANOVA | | | |
|---|--|---|---|
| Wilks'Lambda = 0,01584; $F_{(16,88)} = 38,196$; $p < 0,0000$ | | | |
| RESUMO DOS TESTES HOTELLING T^2 E t -STUDENT | | | |
| | 2001 | 2002 | 2003 |
| 2001 | ----- | colesterol, β -sitosterol | colesterol, campesterol, clerosterol, Δ^5 -avenasterol, Δ^7 -estigmastenol, Δ^7 -avenasterol |
| 2002 | $T^2 = 99,8806$; $F_{(8,27)} = 9,9146$ $p < 0,0000$ | ----- | Clerosterol, β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol, Δ^7 -avenasterol |
| 2003 | $T^2 = 927,224$; $F_{(8,27)} = 92,041$ $p < 0,00000$ | $T^2 = 1329,26$; $F_{(8,27)} = 131,95$ $p < 0,0000$ | ----- |

Triângulo inferior: valores de F_{obs} (Hotelling T^2) e nível de significância; triângulo superior: fitosteróis para os quais os valores de t_{obs} são significativos ($p < 0,05$).

Subsequentemente, procedeu-se à análise DA “forward-stepwise” dos dados de forma a seleccionar as variáveis mais discriminantes e, com base nestas, proceder à CVA dos dados. As variáveis seleccionadas foram o clerosterol, β -sitosterol e Δ^7 -avenasterol, o que está de acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.6. O gráfico obtido apresenta-se na Figura 5.9, no qual CV_1 e CV_2 explicam respectivamente 83,9% e 16,1% da variância total dos dados. Pode-se observar que não é possível diferenciar claramente grupos distintos, principalmente devido à grande dispersão de resultados apresentada pelas amostras pertencentes ao grupo relativo a 2001. Observa-se, no entanto, que 2002 e 2003 se diferenciam entre si, sobretudo na primeira dimensão, a qual representa as diferenças existentes em termos de clerosterol e Δ^7 -avenasterol; pode ainda constatar-se que, na sua

maioria, as amostras de 2003 apresentam teores ligeiramente superiores de β -sitosterol comparativamente às amostras colhidas em 2002. No entanto, numa perspectiva prática e do ponto de vista nutricional, as diferenças apresentadas pelas amostras colhidas em 2002 e 2003 em termos do composto maioritário (β -sitosterol) e, conseqüentemente, em termos de teor total em fitosteróis, não parecem ser de grande relevância.

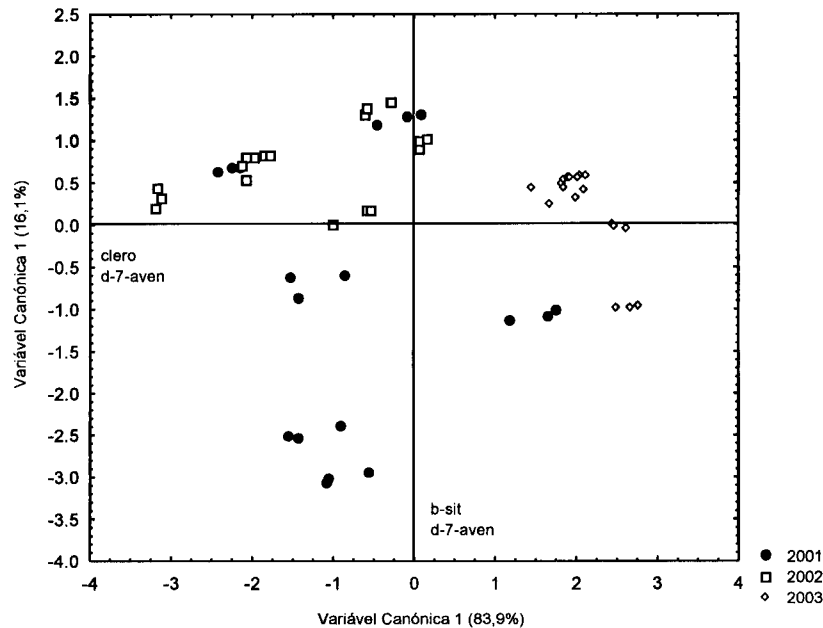


FIGURA 5.9. Resultados da CVA relativa à composição em fitosteróis do óleo de noz, tendo o ano como factor agrupante e realizada com base nas variáveis seleccionadas mediante a DA. Clero: clerosterol, d-7-aven: Δ^7 -avenasterol, b-sit: β -sitosterol.

Apesar de em ambas as análises se verificarem diferenças entre os anos, observa-se a dispersão de resultados das amostras pertencentes ao grupo relativo a 2001. De facto, como se pode constatar mediante a observação dos dados apresentados na Tabela 5.6, as amostras colhidas em 2001 apresentaram teores em fitosteróis muito diferentes entre si, quer em termos de compostos individuais quer em termos de conteúdo total. Por exemplo, as cvs. Parisienne e Mellanaise apresentaram teores totais na ordem dos 120 a 130 mg/100 g de óleo, ao passo que as cvs. Lara e Marbot apresentaram teores de aproximadamente 200 mg/100 g de óleo. Inicialmente, os valores obtidos pareciam apontar para a existência de cultivares com características diferentes em termos de fitosteróis. No entanto, o segundo e terceiro anos de estudo não permitiram concluir tal hipótese. Apesar destes resultados não permitirem tirar conclusões que expliquem os elevados teores apresentados pelas cvs. Lara e Marbot em 2001, evidenciam a importância da realização deste tipo de estudos, no mínimo, durante três anos de amostragem, apontando para a conveniência de estudos mais abrangentes e de maior duração temporal, o que nem sempre é possível tendo em conta as condicionantes que estão inerentes a este tipo de trabalhos, nomeadamente as de índole orçamental.

Como referido, atendendo aos resultados obtidos no primeiro ano de estudo, pensou-se inicialmente poderem existir diferenças significativas entre as cultivares. No entanto, os resultados obtidos, na globalidade dos três anos, foram muito variáveis. Por exemplo, em 2001 a cv. Parisienne foi a que apresentou o mais baixo teor em β -sitosterol mas, em 2002, foi a cultivar que apresentou teores mais elevados naquele composto. De igual forma, a cv. Lara, foi a que apresentou os teores mais baixos em β -sitosterol no ano 2002, sendo a cultivar com teores mais elevados no ano seguinte. Repare-se que, em ambos os casos, a cultivar que apresentou os teores mais baixos relativamente ao composto maioritário num ano, é aquela que apresenta os teores mais elevados do mesmo composto no ano seguinte. Uma vez que apenas foram estudados três anos de produção, não se pode especular se se tratará de um padrão característico, tratando-se provavelmente de mera coincidência. Relativamente aos compostos minoritários, Δ^7 -estigmastenol e Δ^7 -avenasterol, os quais existem em quantidades vestigiais, observa-se igualmente, para a maioria das cultivares, uma certa inconstância ao longo dos três anos. Exceptuam-se as cvs Lara e Parisienne, as quais apresentam, para este composto, resultados qualitativos similares ao longos dos anos estudados. Para podermos avançar alguma hipótese relativa a características em termos da composição em fitosteróis das cultivares estudadas, e dada a variabilidade de resultados obtida, seria certamente necessário continuar com o estudo durante vários anos consecutivos.

Com o objectivo de verificar a existência de diferenças significativas entre cultivares, procedeu-se à análise estatística dos dados obtidos através da realização de testes Hotteling T^2 e t -student. Os resultados das análises Hotteling T^2 e testes t -student, apresentados na Tabela 5.7, indicam a existência de diferenças quaisquer que sejam os grupos comparados. No entanto, para vários dos pares comparados, as diferenças são justificadas sobretudo por compostos minoritários. Apenas para 4 pares, nomeadamente Lara / Mayette, Lara / Parisienne, Marbot / Mellanaise e Marbot / Parisienne, o β -sitosterol, composto maioritário, é uma das variáveis que explicam as diferenças obtidas entre pares de grupos comparados.

Subsequentemente, efectuou-se uma DA “forward-stepwise”, tendo-se seleccionado apenas duas variáveis, Δ^5 -avenasterol e estigmasterol, com base nas quais se realizou uma CVA e construção do respectivo gráfico. Neste último, apesar de se verificar a existência de diferenças entre algumas das cultivares, não se observou a formação de quaisquer grupos claramente individualizados (Figura 5.10).

TABELA 5.7. Resultados dos testes Hotelling T^2 relativos às diferenças entre pares de cultivares de noz e dos testes *t*-Student relativos à significância das diferenças entre pares de cultivares para cada esterol estudado.

| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 |
|----|---------------------------------------|--|---|---|---|--|
| C1 | ----- | estig, Δ^7 -estig | estig, clero, Δ^5 -avena, Δ^7 -estig | col, Δ^7 -avena | Δ^5 -avena, Δ^7 -estig, Δ^7 -avena | estig, clero, Δ^5 -avena, Δ^7 -estig, Δ^7 -avena |
| C2 | $F_{(8,9)} = 33,466$ $p < 0,00001$ | ----- | estig | camp, estig, clero, β -sit, Δ^5 -avena | col, camp, estig, Δ^7 -avena | β -sit, Δ^5 -avena, Δ^7 -avena |
| C3 | $F_{(8,9)} = 9,251$ $p < 0,00154$ | $F_{(7,10)} = 37,964$ $p < 0,00000$ | ----- | camp, estig, clero | camp, estig, clero, β -sit, Δ^5 -avena | estig, β -sit, Δ^5 -avena, Δ^7 -avena |
| C4 | $F_{(8,9)} = 21,017$ $p < 0,00006$ | $F_{(8,9)} = 30,443$ $p < 0,00001$ | $F_{(8,9)} = 22,102$ $p < 0,00005$ | ----- | col, Δ^5 -avena | col, clero, Δ^5 -avena |
| C5 | $F_{(8,9)} = 74,863$ $p < 0,00000$ | $F_{(7,10)} = 311,02$ $p < 0,00000$ | $F_{(7,10)} = 84,191$ $p < 0,00000$ | $F_{(8,9)} = 54,066$ $p < 0,00000$ | ----- | clero, Δ^7 -avena |
| C6 | $F_{(8,9)} = 43,970$ $p < 0,00000$ | $F_{(7,10)} = 20,756$ $p < 0,00000$ | $F_{(7,10)} = 92,908$ $p < 0,00000$ | $F_{(8,0)} = 112,90$ $p < 0,00000$ | $F_{(7,10)} = 28,274$ $p < 0,00001$ | ----- |

C1: Franquette, C2: Lara; C3: Marbot, C4: Mayette, C5: Mellanaise, C6: Parisienne; Triângulo inferior: valores de F_{obs} (Hotelling T^2); Triângulo superior: esteróis para os quais os valores de t_{obs} foram significantes no teste *t*-Student ($p < 0,05$); col: colesterol; camp: campesterol; estig: estigmasterol; clero: cleroesterol; β -sit: β -sitosterol; Δ^5 -avena: Δ^5 -avenasterol; Δ^7 -estig: Δ^7 -estigmasterol; Δ^7 -avena: Δ^7 -avenasterol.

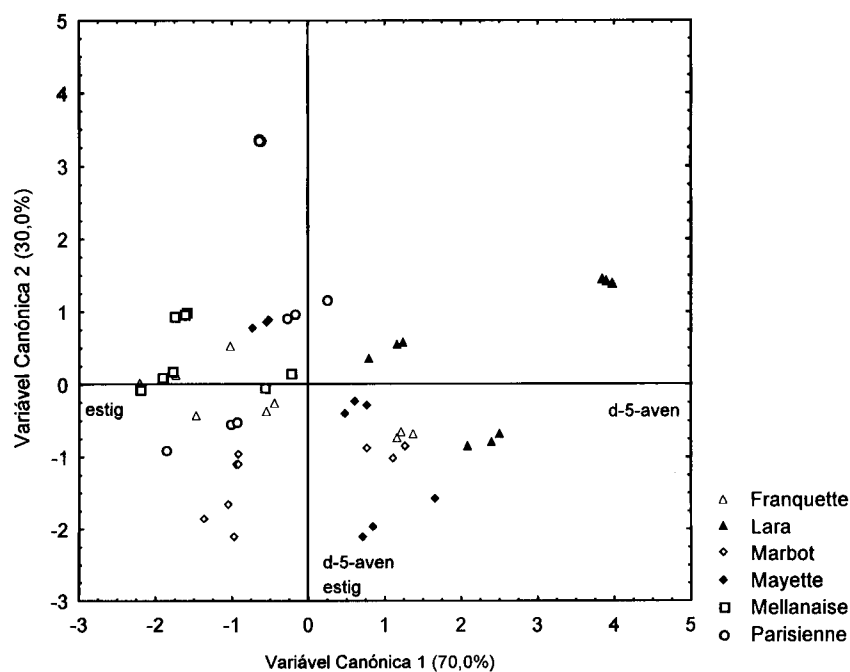


FIGURA 5.10. Resultado da CVA relativa à composição em fitosteróis da noz, tendo a cultivar como factor agrupante e realizada com base nas variáveis seleccionadas pela DA. estig: estigmasterol, d-5-aven: Δ^5 -avenasterol.

Tendo em conta a grande dispersão de resultados ao longo dos três anos para algumas das cultivares estudadas, as diferenças existentes entre grupos poderão estar mascaradas pelas diferenças existentes dentro dos próprios grupos. Desta forma, optou-se por realizar uma PCA de forma a visualizar as semelhanças existentes entre as amostras estudadas. No gráfico apresentado na Figura 5.11, duas componentes principais explicam 53,13% da variância dos dados. Neste gráfico pode observar-se a dispersão de resultados relativamente às amostras colhidas em 2001, bem como observar que as amostras de 2002 evidenciam teores ligeiramente superiores em clerosterol e Δ^7 -avenasterol relativamente às de 2003. O gráfico permite ainda constatar a dispersão de resultados relativamente a cada cultivar, ao longo dos três anos considerados, com especial destaque para o ano 2001.

Apesar de se concluir da necessidade de mais estudos, dado a escassez dos dados recolhidos pelo facto de este trabalho ter somente a duração de três anos, estes resultados sugerem que o factor “cultivar” não exerce uma influência significativa no que diz respeito à composição em fitosteróis do óleo de avelã, uma vez que parece existir uma variação dos teores destes compostos relativamente aleatória, isto é, não associada especificamente a uma ou outra cultivar. Esta variação poderá no entanto estar relacionada com qualquer outro factor não abrangido pelo estudo.

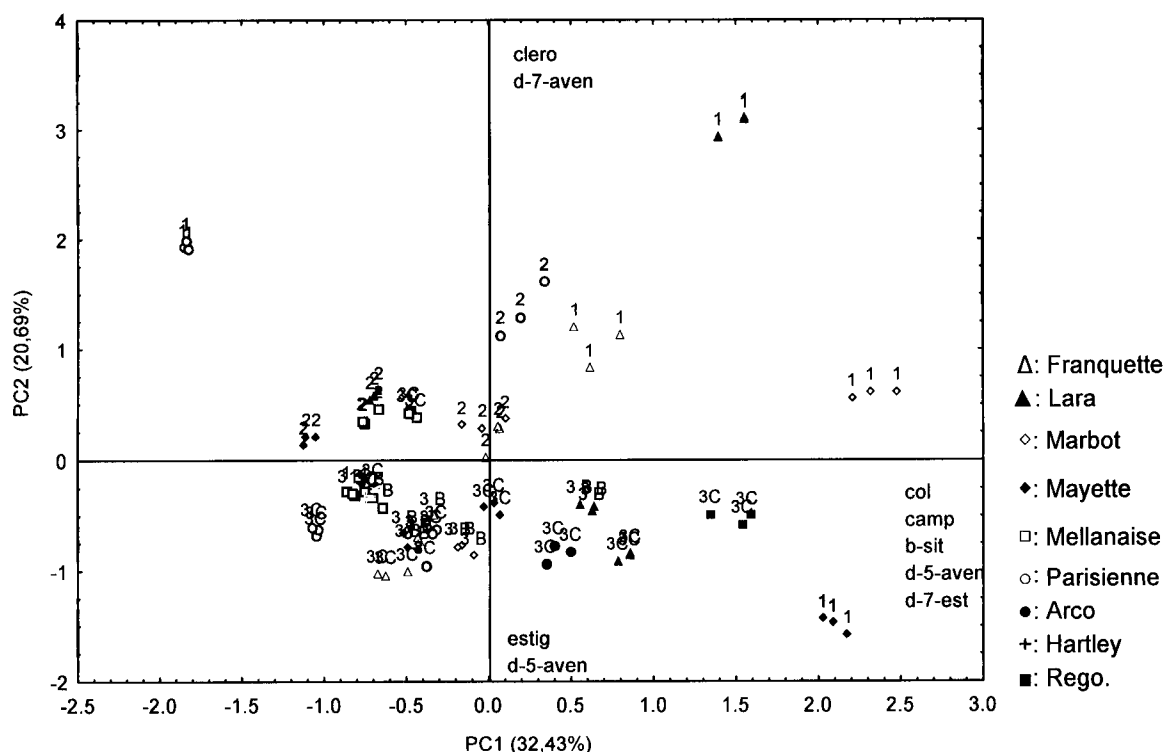


FIGURA 5.11. Resultado da PCA aplicada aos resultados da composição em esteróis da noz. Col: colesterol, camp: campesterol, estig: estigmasterol, clero: clerosterol, β -sit: β -sitosterol, d-5-aven: Δ^5 -avenasterol, d-7-est: Δ^7 -estigmasterol, d-7-aven: Δ^7 -avenasterol. 1: 2001, 2: 2002, 3B: Bragança 2003, 3C: Coimbra 2003.

O estudo de possíveis diferenças relacionadas com a localização geográfica das amostras, realizou-se apenas com os dados relativos às cultivares comuns às duas localizações (Bragança e Coimbra). O gráfico da Figura 5.12 mostra os resultados obtidos.

Como se pode ver no gráfico da Figura 5.12, as amostras provenientes de Bragança distinguem-se das de Coimbra pelos seus teores inferiores em Δ^7 -avenasterol, composto não detectado em três das cinco cultivares consideradas, e pelos seus teores ligeiramente superiores em β -sitosterol.

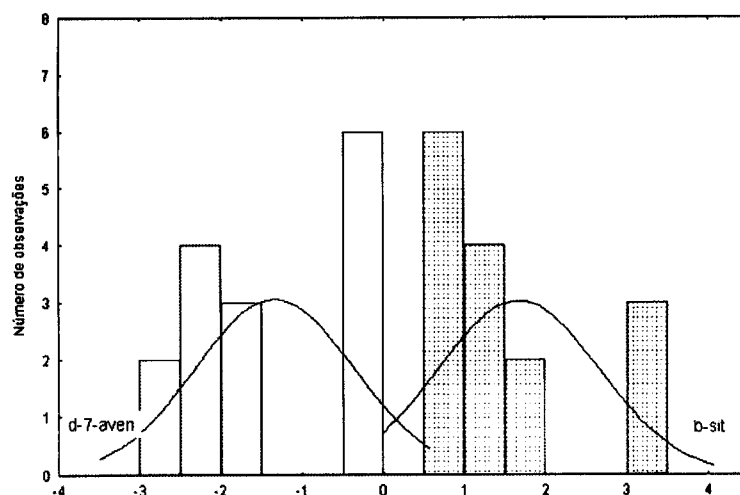


FIGURA 5.12. Resultados da CVA aplicada aos dados da composição em fitosteróis da noz, tendo a localização geográfica como factor agrupante. Bragança: Coimbra:

No entanto, tendo em consideração que a análise efectuada apenas abrange um ano de amostragem, e atendendo aos teores algo variáveis obtidos ao longo dos três anos de estudo na localidade de Bragança, este resultado deverá ser visto com alguma reserva, aconselhando-se a realização de mais estudos de forma a que alguma hipótese possa ser lançada relativamente à influência do factor “localização geográfica” na composição em fitosteróis do óleo de noz.

6. CONCLUSÕES

Durante a última década, tem-se assistido a um interesse crescente no estudo dos fitosteróis e da sua composição em diversos alimentos, devido às suas propriedades anti-colesterolémicas e dado o seu potencial económico. De facto, o consumidor interessa-se cada vez mais por conhecer os alimentos que utiliza e assiste-se a uma crescente demanda de produtos que tenham na sua composição constituintes considerados potencialmente benéficos para a saúde. Surge desta forma um campo com enorme potencial económico que as indústrias alimentares tentam explorar cada vez mais. Este fenómeno evidencia-se pelo

aumento do investimento de indústrias e grupos económicos no desenvolvimento de novos produtos apoiados em estudos científicos. No caso específico dos fitosteróis, existindo a percepção de que, para a generalidade dos consumidores é mais atractivo o consumo de alimentos fortificados com fitonutrientes do que a utilização de fármacos ou a adesão a dietas rigorosas, tem-se assistido a um aumento deste tipo de produtos e a uma crescente divulgação das suas propriedades benéficas, por parte das empresas detentoras dos mesmos.

Os óleos vegetais, cereais e frutos secos são actualmente tidos como alimentos naturalmente ricos em fitosteróis. No entanto, apesar de já existirem dados relativos ao teor total de fitosteróis de nozes e avelãs, tanto quanto se sabe, os estudos anteriormente realizados incidiram sobretudo nos compostos maioritários, havendo uma escassez de dados relativos aos compostos minoritários, escassez esta que se pretendeu colmatar. No caso específico do óleo de avelã, este estudo poderá adquirir uma maior relevância, uma vez que estes dados poderão ser úteis para futuros trabalhos relativos ao estudo de adulterações de azeites com óleo de avelã.

Ambos os frutos secos evidenciaram a presença de teores consideráveis de fitosteróis, sendo o β -sitosterol o composto maioritário, em ambos os casos.

Relativamente às amostras estudadas, após aplicação da análise estatística aos resultados obtidos, verificou-se que:

- No que concerne à avelã, existem algumas diferenças significativas entre as amostras obtidas em diferentes anos de produção (2001 a 2003), tendo-se apurado que as amostras colhidas em 2001 e 2002 foram mais similares entre si, ao passo que as amostras de 2003 se diferenciaram ligeiramente destas pelos seus teores tendencialmente superiores em Δ^5 -avenasterol. Apesar deste composto, para a maioria das amostras estudadas, ser o segundo maioritário, apresenta, no entanto, teores cerca de dez vezes inferiores aos encontrados para o β -sitosterol. Desta forma, pode concluir-se que, de um ponto de vista prático, e em termos médios, o teor em fitosteróis do óleo de avelã parece não sofrer uma influência relevante por parte do factor “ano de produção”. De forma similar, tiram-se conclusões idênticas relativamente ao factor “localização geográfica”, uma vez que os resultados obtidos indicam que, apesar de existirem algumas diferenças entre as amostras provenientes das duas localizações consideradas, estas referem-se sobretudo aos teores em Δ^5 -avenasterol.
- Mediante os resultados obtidos, pode ainda inferir-se que o factor genético parece exercer uma influência superior à exercida pelos factores ambientais. Apesar das amostras não se agruparem claramente segundo a sua origem, podem ser apontadas

algumas diferenças de composição segundo a origem das cultivares. Genericamente, as cultivares Italianas apresentaram teores superiores de Δ^7 -estigmastenol e inferiores de campesterol e estigmasterol. Pelo contrário, e salvo algumas exceções, as cultivares de origem Americana, Alemã e Inglesa apresentaram teores superiores de campesterol e estigmasterol e inferiores de Δ^7 -estigmastenol. Em algumas destas cultivares, nomeadamente nas cvs. Cosford, Ennis, Gunslebert e Merveille de Bollwiller, o composto Δ^7 -estigmastenol não foi detectado, e em outras, nomeadamente, nas cvs. Daviana, Lansing e Longa d'Espanha, ocorreu em quantidades geralmente inferiores às apresentadas pelas restantes cultivares em estudo. De uma forma geral, as amostras nativas da Alemanha e Inglaterra diferenciam-se das cultivares Americanas pelos seus teores superiores em campesterol. As cultivares Espanholas, relativamente aos outros grupos, parecem apresentar características intermédias em termos de fitosteróis.

- No que concerne à espécie nogueira, os resultados obtidos foram algo inconclusivos, principalmente devido à grande dispersão de resultados observada em 2001 para as diferentes cultivares. Este facto não se repetiu com a mesma ordem de magnitude nos dois anos seguintes. Esta variabilidade não parece ser, pelo menos *per si*, motivada por nenhum dos factores estudados. Também em termos dos compostos minoritários, Δ^7 -estigmastenol e Δ^7 -avenasterol, se observou alguma variabilidade de resultados obtidos. Assim, os resultados obtidos mediante a realização da análise estatística deverão ser vistos com alguma reserva. Pode-se contudo adiantar que parecem existir ligeiras diferenças em termos da composição em fitosteróis entre as amostras colhidas em 2002 e 2003, as quais se diferenciam sobretudo pelos teores em clerosterol e Δ^7 -avenasterol, mas também porque as amostras de 2003 apresentam teores ligeiramente superiores em β -sitosterol. Relativamente ao factor "cultivar", alguns pares de cultivares estudadas parecem apresentar diferenças entre si em termos do teor médio de β -sitosterol. No entanto, na análise discriminante este composto não foi seleccionado como variável importante para a discriminação dos grupos formados. Refira-se que, igualmente pelos motivos acima referidos, apesar de não se ter verificado a formação de grupos claramente diferenciados entre si, os resultados obtidos não permitem esclarecer, nem tão pouco sequer indiciar, a existência ou não de diferenças significativas em termos de fitosteróis entre as diferentes cultivares estudadas, sendo aconselhável a realização de mais estudos.

Por fim saliente-se que os resultados aconselham vivamente a prossecução destes estudos, preferencialmente realizados durante um período temporal alargado e complementados com um controlo rigoroso de diversos factores, tais como a composição dos solos, o grau de maturação dos frutos, e até mesmo uma rigorosa monitorização climática *in situ*.

CAPÍTULO 6

PERFIL DE TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS

I – TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

1. INTRODUÇÃO

A vitamina E foi descrita pela primeira vez há cerca de 75 anos atrás, como sendo um factor nutricional lipossolúvel que prevenia a morte e reabsorção de fetos em ratas grávidas. Em várias espécies animais foi referida a observação de diversas manifestações associadas à deficiência em vitamina E, tais como atrofia testicular, lesões do sistema nervoso central e distrofia muscular (Bramley *et al.*, 2000), anemia hemolítica (Nelis *et al.*, 2000), morte fetal e infertilidade, desordens renais e hepáticas e até mesmo cancro (Tadmor *et al.*, 2000). Nos humanos, exceptuando os casos de bebés prematuros e de desordens específicas a nível da absorção de lípidos e/ou vitamina E, é pouco frequente a observação de sintomas associados a dietas deficitárias nesta vitamina, uma vez que é difícil atingir o estado de depleção das reservas do organismo (Bramley *et al.*, 2000; Nelis *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2001). No entanto, níveis baixos de vitamina E podem afectar o sistema imunitário e nervoso e estão frequentemente associados com infecções e anemias (Nogala-Kalucka, 2002).

A vitamina E é sobejamente conhecida pela sua actividade antioxidante, particularmente pela protecção eficaz contra a oxidação lipídica. A teoria de que espécies reactivas, como é o caso dos radicais livres, poderão estar envolvidas no desenvolvimento de processos degenerativos e relacionadas com o envelhecimento e o cancro, originou um crescente interesse no estudo da generalidade dos antioxidantes, e da vitamina E em particular. Desta forma, começou a ganhar corpo a ideia de que os antioxidantes presentes nos alimentos, para além de contribuírem para a sua preservação, poderiam, após ingestão, actuar beneficemente no organismo. Nos últimos anos os estudos realizados têm sido muitos e abrangendo variadas vertentes. Têm sido conduzidos estudos epidemiológicos e clínicos, no sentido de estudar o papel desempenhado por este tipo de compostos no organismo, bem como as consequências da sua suplementação. Há igualmente um grande interesse na avaliação composicional dos alimentos neste tipo de constituintes.

2. ESTRUTURA QUÍMICA

O termo “vitamina E” é utilizado para referir um grupo de compostos estruturalmente relacionados entre si, os tocoferóis e os tocotrienóis, que apresentam o 2-metil-6-cromanol como base estrutural sendo, por este motivo, por vezes designados colectivamente como tococromanóis. Na natureza existem 4 tocoferóis e 4 tocotrienóis, em ambos os casos designados por α , β , γ e δ , diferindo entre si pelo número e posição dos grupos metilo no anel aromático (Figura 6.1). O grupo dos tocotrienóis distingue-se dos tocoferóis pela presença de três insaturações na cadeia lateral. Os tocoferóis apresentam 3 centros quirais nas posições

2, 4' e 8' sendo por isso possível a ocorrência de 8 estereoisómeros. Na natureza, a síntese destes compostos é estereoespecífica, resultando compostos que têm sempre a disposição *R* nesses centros. Quando estes compostos são sintetizados em laboratório, formam-se diversos estereoisómeros. A título de exemplo refira-se a obtenção sintética do all-*rac*- α -tocoferol, antigamente designado por dl- α -tocoferol, que é uma mistura equimolar dos 8 estereoisómeros.

Os tocotrienóis apresentam apenas um centro quiral, em posição 2, permitindo a ocorrência de 2 estereoisómeros, existindo na natureza apenas a forma 2*R*-3'-*trans*-7'-*trans* (Nelis *et al.*, 2000).

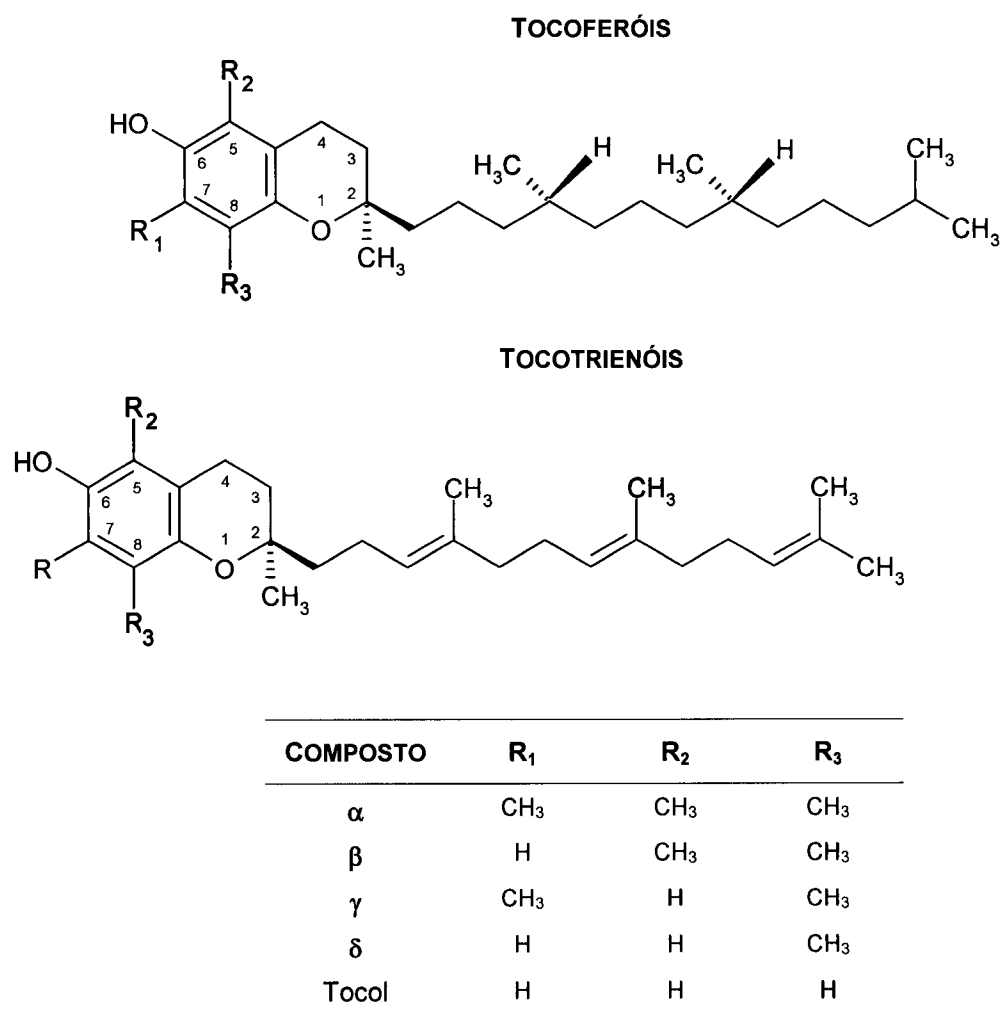


FIGURA 6.1. Estrutura dos tocoferóis e tocotrienóis existentes na natureza e do tocol (introduz-se o tocol nesta tabela pois foi o composto utilizado como padrão interno, como posteriormente será referido).

Na forma pura estes compostos apresentam-se como óleos viscosos, sendo sensíveis à luz, oxigénio, metais e soluções alcalinas. São insolúveis em água e facilmente solúveis em solventes orgânicos e óleos vegetais (Bramley *et al.*, 2000).

A actividade antioxidante dos tocoferóis tem sido sobejamente estudada, sendo explicada quimicamente pela presença de um grupo hidroxilo no seu anel aromático, permitindo a doação de um átomo de hidrogénio a um radical livre (Johnson *et al.*, 2001; Hall, 2001). Estes compostos apresentam uma elevada tendência de reacção com os radicais livres, uma vez que após perda do átomo de hidrogénio, são facilmente estabilizados através de fenómenos de ressonância. Segundo o número de grupos metilo no anel aromático a capacidade em doar o átomo de hidrogénio varia, levando a que os diferentes vitâmeros possam apresentar diferentes capacidades antioxidantes.

3. ACTIVIDADE BIOLÓGICA

Apesar de actualmente se admitirem outras formas de actuação, algumas de mecanismo ainda não completamente clarificado, acredita-se que a actividade destes compostos advém sobretudo da sua acção antioxidante. No organismo, estes compostos funcionam como antioxidantes fisiológicos, protegendo compostos potencialmente oxidáveis, tais como certas vitaminas e AG insaturados, defendendo desta forma as membranas biológicas de danos decorrentes quer de processos metabólicos normais, quer de agentes tóxicos externos.

A actividade biológica da Vitamina E é definida pela sua influência na sintomatologia associada à deficiência em Vitamina E, sendo avaliada pelo teste de reabsorção fetal em ratos (Bramley *et al.*, 2000; Rupérez *et al.*, 2001). Inicialmente o teor em vitamina E expressava-se em termos de actividade biológica, utilizando para tal Unidades Internacionais (IU). Este sistema, tinha por referência a actividade biológica de 1mg de acetato de dl- α -tocoferol que correspondia a 1 IU. A maior actividade biológica era encontrada para o d- α -tocoferol (*RRR*- α -tocoferol), sendo equivalente a 1,49 IU. Desde 1980 este sistema tem vindo progressivamente a ser substituído pela utilização de Equivalentes de Tocoferol (TE), em que 1 mg de *RRR*- α -tocoferol corresponde a 1 TE; 1 mg de β , γ e δ -tocoferol correspondem, respectivamente, a 0,5 TE, 0,1 TE e 0,03 TE e 1 mg de α e β -tocotrienol correspondem, respectivamente, a 0,3 TE e 0,05 TE (considerando em todos os casos a forma existente na natureza, *RRR*). A actividade biológica, expressa em IU e em TE, está igualmente definida para as diversas formas sintéticas da Vitamina E (essencialmente isómeros ou derivados do α -tocoferol). Comparativamente com a forma natural (*RRR*- α -tocoferol), estas formas apresentam sempre valores inferiores de actividade biológica, o que se justifica principalmente pela selectividade das proteínas de transporte. Segundo as recomendações em vigor nos EUA desde 2000 (DRI, Dietary Reference Intakes 2000), a actividade em vitamina E deverá ser calculada com base apenas no vitâmero natural *RRR*- α -tocoferol e nos estereoisómeros *2R* das formas sintéticas do α -tocoferol (Shankel e Pettit, 2004).

Apesar do α -tocoferol ser considerado o vitâmero biologicamente mais activo, pensa-se que, na generalidade, estes compostos poderão estar envolvidos numa diversidade de

funções fisiológicas e bioquímicas, principalmente devido à sua capacidade antioxidante e também pela sua acção a nível da estabilidade das membranas (Azzi e Stocker, 2000). Para além de actuarem como antioxidantes fisiológicos, protegendo os ácidos gordos polinsaturados e outros compostos de serem oxidados, têm sido realizados vários estudos incidindo em diferentes propriedades potencialmente benéficas dos tocoferóis e tocotrienóis.

Pela sua importância, mas sobretudo porque evidencia o interesse da determinação dos demais vitâmeros na dieta, alguns dos potenciais benefícios destes compostos são em seguida referidos.

3.1 Doenças Cardiovasculares

As hipóteses que inicialmente associaram a vitamina E à prevenção de doenças cardiovasculares baseavam-se na teoria de que a oxidação dos lípidos insaturados das partículas LDL desempenhava um papel crucial na patogénese da aterosclerose (Pryor, 2000). Com base em resultados de estudos observacionais, conjuntamente com o facto da ingestão de suplementos de vitamina E ser considerada segura, foram iniciados estudos clínicos envolvendo a administração de suplementos de α -tocoferol em humanos (Pryor, 2000; Bramley *et al.*, 2000). A associação entre vitamina E e doenças cardiovasculares, incluindo o estudo de fenómenos fisiológicos e bioquímicos, estudos em animais, estudos epidemiológicos e clínicos em humanos, foi extensivamente revista por Pryor (2000).

Alguns dos estudos revelaram efeitos positivos, ao passo que noutros, os efeitos foram reduzidos ou nulos. Por exemplo, no estudo “Cambridge Heart Antioxidant Study” (CHAOS) o suplemento de 400 a 800 IU de α -tocoferol/dia traduziu-se numa redução significativa de enfarte do miocárdio em pacientes com aterosclerose coronária, enquanto que no estudo “Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Trial” (ATBS) os efeitos foram reduzidos e considerados de escassa importância em termos de saúde pública (Bramley *et al.*, 2000). Apesar da maioria dos estudos clínicos serem focalizados no vitâmero α -tocoferol, estudos recentes sugerem que outros vitâmeros poderão igualmente estar associados à diminuição dos níveis de colesterol e à redução da mortalidade devido a doenças cardiovasculares (Khor e Chieng, 1996; Qureshi *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999; Hensley *et al.*, 2004; Naito *et al.*, 2005). Apesar de existirem vários dados que apontam para o benefício destes compostos relativamente à prevenção deste tipo de patologia, não existe ainda uma opinião unânime, sendo mais prudente esperar que resultados futuros possam fornecer informações mais esclarecedoras.

3.2 Cancro

Os resultados obtidos em alguns estudos epidemiológicos sugerem um efeito protector da vitamina E contra alguns tipos de cancro.

O relatório do Comité Científico dos Alimentos da Comunidade Europeia (SCF, Scientific Committee on Food) (SFC, 2003) refere a realização de três estudos relativos à possível associação entre a administração de vitamina E e o risco de cancro: o estudo "LINXIAN" (1993), o estudo "Polyprevention" (1994) e o estudo "ATBC" (1998). Destes três, o primeiro foi realizado numa população chinesa, a qual apresentava simultaneamente dietas deficitárias em micronutrientes e um alto nível de incidência de cancros do estômago e esófago. O referido relatório chama a atenção para o facto de, a diminuição dos casos de mortalidade por cancro ter sido associada não somente à administração de α -tocoferol, mas de um suplemento diário de três compostos (α -tocoferol, selénio e β -caroteno) durante um período superior a cinco anos. No segundo estudo, a administração de um suplemento de α -tocoferol e vitamina C não mostrou ser eficaz contra o cancro do cólon. No estudo ATBC, realizado num grupo de fumadores Filandeses do sexo masculino, verificou-se existir um efeito protector relativamente ao cancro da próstata, não se tendo, no entanto verificado qualquer efeito relativamente ao cancro do pulmão.

Apesar dos estudos referidos apenas sugerirem uma fraca associação entre a administração de um suplemento de vitamina E e a prevenção de determinados tipos de cancro, refira-se contudo que, em todos eles, o suplemento de vitamina E ministrado consistia apenas no vitâmero α -tocoferol. Resultados de vários estudos recentes, epidemiológicos ou realizados em culturas de células e em modelos animais, sugerem a associação entre outros vitâmeros, que não o α -tocoferol, e a protecção contra determinados tipos de cancros (Schwenke, 2002; Campbell *et al.*, 2003; Willis e Wians Jr., 2003; Hensley *et al.*, 2004).

Apesar dos tocotrienóis apresentarem uma diminuta, ou mesmo nula, actividade biológica (avaliada pelo teste de reabsorção fetal em ratos), as suas propriedades antioxidantes têm sido associadas, em vários estudos, à diminuição de danos no ADN e nas células, a efeitos anticarcinogénicos e à prevenção de doenças cardiovasculares (Mishima *et al.*, 2003; Nesaretnam *et al.*, 2004; Soelaiman *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2004).

Segundo Theriault *et al.* (1999) a cadeia insaturada dos tocotrienóis poderá estar relacionada com as acções desempenhadas por estes compostos, permitindo-lhes uma distribuição e metabolismos diferenciados, e uma penetração mais eficiente em determinados tecidos.

3.3 Desordens neurológicas

Espécies de oxigénio reactivas, radicais livres e reacções oxidativas têm sido implicadas em várias desordens neurológicas, nomeadamente na doença de Alzheimer. Ainda que não exista um total acordo por parte da comunidade científica, alguns autores acreditam que na fase inicial de certas doenças neurodegenerativas o α -tocoferol poderá desempenhar um papel protector (Nogala-Kalucka, 2002). Este papel foi demonstrado em estudos realizados

em culturas celulares de neurónios (Bramley *et al.*, 2000) e confirmado num estudo clínico, no qual um suplemento de 2000 IU de α -tocoferol/dia foi administrado a doentes com Alzheimer tendo-se verificado um atraso significativo na progressão da doença (Sano *et al.*, 1997).

4. FONTES E CONSUMO

Ao contrário das plantas verdes e de alguns microrganismos fotossintéticos, os animais (humanos incluídos) são incapazes de biossintetizar estes compostos, pelo que têm de os adquirir através da alimentação. Os óleos vegetais e seus derivados são as fontes principais de vitamina E na dieta, sendo também importantes os frutos secos e os cereais, não somente pelo seu elevado teor, mas também pela diversidade de vitâmeros que apresentam na sua composição (Tabela 6.1). Os frutos e vegetais, são igualmente fontes importantes, não pelo seu teor nestes compostos, mas pelo seu elevado consumo.

Os alimentos referidos para além de apresentarem diferentes teores em vitamina E, diferem ainda na presença dos diferentes vitâmeros e nas proporções que estes apresentam entre si. Nos países Mediterrânicos, o vitâmero de maior consumo será muito provavelmente o α -tocoferol, devido ao elevado consumo de azeite (Psomiadou e Tsimidou, 1998; Gimeno *et al.*, 2000). Por outro lado, na dieta Norte Americana verifica-se sobretudo o consumo de alimentos ricos em γ -tocoferol, principalmente devido ao elevado consumo de óleo de soja e seus derivados, tais como margarinas, maionese e molhos de saladas (Campbell *et al.*, 2003).

Refira-se ainda que os tocoferóis se encontram presentes na maioria dos óleos vegetais, mesmo nos que foram sujeitos a refinação. Já os tocotrienóis, existem em teores reduzidos na maioria dos óleos vegetais (à excepção do óleo de palma), apresentando elevados teores sobretudo nos cereais.

Em 1989, nos Estados Unidos da América (EUA), a dose diária recomendada (RDA, Recommended Daily Allowance) de vitamina E para adultos era de 8 mg para as mulheres e 10 mg para os homens. Em 2000 estes valores foram actualizados, designando-se agora por DRI (Dietary Reference Intakes), sendo o seu valor de 15 mg /dia, quer para homens quer para mulheres (DellaPenna, 2005).

Segundo a opinião do SCF (2003), as recomendações relativas às necessidades diárias em vitamina E deverão ter em consideração a ingestão de PUFA, sendo recomendado o consumo diário de 0,4 mg de vitamina E por grama de PUFA.

Comparando os dados provenientes de diversos estudos realizados num total de 6 países Europeus (Alemanha, Áustria, Holanda, Itália, Irlanda e Reino Unido), a estimativa do consumo de vitamina E (mg TE/ dia) variou entre 7,2 no Reino Unido (média, grupo de 1110 mulheres) e 14,6 na Alemanha (mediana, grupo de 854 homens) (SCF, 2003).

TABELA 6.1. Vitamina E em diversos alimentos (mg/kg de porção edível). Adaptado de Bramley *et al.* (2000) e de Eskin e Przybylski (2001).

| ALIMENTO | TOCOFERÓIS | | | | TOCOTRIENÓIS | | | |
|-------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------|
| | α | β | γ | δ | α | β | γ | δ |
| Óleos | | | | | | | | |
| Girassol ^{a,b} | 487 ^a , 1000 ^b | - | 5 ^b , 51 ^a | 1 ^b , 8 ^a | - | - | - | - |
| Palma ^{a,b} | 256 ^a , 279 ^b | - | 61 ^b , 316 ^a | nd ^b , 70 ^a | 146 ^a , 274 ^b | nd ^b , 32 ^a | 398 ^b | 69 ^b |
| Milho ^a | 112 | 50 | 602 | 18 | - | - | * | * |
| Azeite ^a | 119 | - | 7 | - | - | - | * | * |
| Sésamo ^a | 136 | - | 290 | - | - | - | * | * |
| Soja ^{a,b} | 75 ^a , 101 ^b | nd ^b , 15 ^a | 593 ^b , 797 ^a | 264 ^b , 266 ^a | nd ^b , 2 ^a | nd ^b , 1 ^a | - | - |
| Cereais | | | | | | | | |
| Arroz | 3 | - | 3 | 0,4 | 5 | - | * | * |
| Aveia ^{a,b} | 5 | 1 | - | - | 11 | 2 | - | - |
| Centeio | nd ^a , 2 ^b | 0,4, 4 ^b | nd ^b , 0,3 | 0,1, 1 ^b | 11 ^b | 3 ^b | 2 ^b | * |
| Trigo ^{a,b} | 10 ^a , 14 ^b | 7 ^{a,b} | - | - | 4 ^a , 33 ^b | 28 ^a , nd ^b | * | * |
| Frutos secos | | | | | | | | |
| Amêndoas ^a | 452 | 3 | 19 | 1 | 2 | - | * | * |
| Amendoins ^a | 114 | - | 84 | - | - | - | * | * |
| Avelã ^a | 215 | - | 1 | 0,1 | - | - | * | * |
| Cajú ^a | 110 | - | 51 | 26 | - | - | * | * |

^a Bramley *et al.* (2000), * teores não referidos; ^b Eskin e Przybylski (2001); *: não referido na bibliografia; nd: referido na bibliografia como não detectado.

5. PARÂMETRO NA AVALIAÇÃO DA AUTENTICIDADE

A determinação de tocoferóis e tocotrienóis nos alimentos serve um duplo propósito, nomeadamente no que diz respeito à avaliação nutricional e ao controlo de qualidade dos alimentos. Como já foi referido e se pode constatar pela observação da Tabela 6.1, o perfil qualitativo e quantitativo é variável segundo o alimento considerado. Desta forma, o conhecimento do perfil qualitativo destes compostos bem como a sua abundância relativa em determinado alimento, pode ser uma ferramenta muito útil na sua caracterização, com aplicabilidade directa no controlo de qualidade e na detecção de adulterações.

A avaliação do teor em vitamina E reflecte ainda o potencial antioxidante dos alimentos e, consequentemente, pode fornecer indicações úteis sobre o seu prazo de validade e sobre possíveis efeitos deletérios que possam ocorrer durante o seu processamento e armazenamento.

6. METODOLOGIAS ANALÍTICAS – BREVE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para a determinação da Vitamina E existem vários métodos descritos na literatura, tendo as metodologias utilizadas sofrido inúmeros desenvolvimentos nas últimas décadas. Inicialmente, os métodos eram mais rudimentares e baseavam-se sobretudo em medições espectrofotométricas, não permitindo a determinação diferenciada dos diferentes vitâmeros. A utilização da cromatografia gasosa para determinação destes compostos é conhecida desde a década de 70. No entanto, por frequentemente implicar a saponificação da amostra seguida de uma separação em TLC e a derivatização dos compostos, actualmente é pouco utilizada sendo preterida em favor da utilização de técnicas de HPLC.

As características químicas destes compostos permitem que a sua determinação possa ser realizada por HPLC, quer em fase normal quer em fase reversa. As vantagens e desvantagens de cada uma das técnicas serão posteriormente discutidas. Após separação por cromatografia líquida, vários detectores são passíveis de serem utilizados para a sua monitorização, nomeadamente UV, fluorescência, electroquímico, ELSD, DAD e MS.

Para informações mais detalhadas aconselha-se a consulta da muita literatura actualmente disponível que se debruça sobre este tema, entre a qual se incluem várias revisões abrangendo técnicas de preparação da amostra, separação e monitorização dos compostos (Eitenmiller e Landen, 1998; Greyt *et al.*, 1998; Abidi, 2000; Nelis *et al.*, 2000; Rupérez, 2001).

II - TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS. PARTE EXPERIMENTAL

1. REAGENTES E SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Os tocoferóis (α , β , γ e δ) e tocotrienóis (α , β , γ e δ) foram adquiridos à Calbiochem (La Jolla, CA, USA). O 2-metil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-croman-6-ol (tocol) foi adquirido à Matreya Inc. (PA, USA) e o acetato de α -tocoferol à Merck (Darmstad, Alemanha). O butilhidroxitolueno (BHT) foi obtido na Aldrich (Madrid, Espanha). O *n*-hexano LiChrosolv foi adquirido à Merck (Darmstad, Alemanha) e o 1,4-dioxano à Fluka (Madrid, Espanha). Os restantes reagentes utilizados eram de grau de pureza "Pro analysi".

2. PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

Todas as soluções foram preparadas numa sala escura com luz vermelha. Preparou-se uma solução de BHT em *n*-hexano (10 mg/ml) e uma solução de tocol, também em *n*-hexano (10 mg/ml), a qual foi sendo diluída em soluções de trabalho (500 μ g/ml) conforme necessário.

Prepararam-se soluções "stock" em *n*-hexano, de cada uma das oito substâncias de referência, com concentrações aproximadas de 5 mg/ml. Dada a sua natureza instável, as concentrações foram confirmadas por UV levando em conta as suas absorvências específicas (Eitenmiller e Landen, 1998). As soluções foram colocadas em frascos escuros, sujeitas a uma corrente de azoto e armazenadas a - 20 °C, protegidas da luz. Preparou-se uma mistura padrão com os 8 isómeros em proporções relativas similares às existentes em cada uma das matrizes estudadas. A composição da mistura padrão para cada uma das matrizes é apresentada na Tabela 6.2.

TABELA 6.2. Composição das misturas padrão preparadas para a matriz avelã e para a matriz noz.

| | TOCOFERÓIS | TOCOTRIENÓIS |
|-------|--------------------------------------|--|
| AVELÃ | | |
| | α -tocoferol (150 μ g/ml) | α -tocotrienol (30 μ g/ml) |
| | β -tocoferol (50 μ g/ml) | β -tocotrienol (4 μ g/ml) |
| | γ -tocoferol (30 μ g/ml) | γ -tocotrienol (10 μ g/ml) |
| | δ -tocoferol (4 μ g/ml) | δ -tocotrienol (50 μ g/ml). |
| NOZ | | |
| | α -tocoferol (75 mg/ml) | α -tocotrienol (30 mg/ml) |
| | β -tocoferol (30 mg/ml) | β -tocotrienol (4 mg/ml) |
| | γ -tocoferol (150 mg/ml) | γ -tocotrienol (10 mg/ml) |
| | δ -tocoferol (75 mg/ml) | δ -tocotrienol (30 mg/ml) |

3. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A preparação da amostra foi idêntica para ambas as matrizes em estudo.

Inicialmente procedeu-se à quebra manual das sementes, e o seu miolo foi moído de modo a passar por um tamiz de 0,7 mm. Uma amostra rigorosamente pesada (aproximadamente 300 mg para a avelã e 600 mg para a noz) foi colocada num tubo de vidro com rolha (Supelco, Bellefonte, PA, USA) e homogeneizado em vórtex com 2 ml de etanol, durante 1min. Subsequentemente, adicionou-se *n*-hexano (4 ml), homogeneizou-se durante 1 min, adicionou-se solução saturada de cloreto de sódio (2 ml) e homogeneizou-se novamente durante 1 min. Após centrifugação (2 min, 5000 g) removeu-se cuidadosamente a fase orgânica para outro tubo de vidro. A amostra foi re-extraída duas vezes com *n*-hexano (4 ml). Os extractos orgânicos foram reunidos no mesmo tubo de vidro e evaporados à secura em corrente de azoto e à temperatura ambiente, utilizando um módulo Reacti-Therm (Pierce, Rockford, IL, USA). O resíduo foi transferido com 1,5 ml de *n*-hexano para um tubo

de microcentrífuga e desidratado com sulfato de sódio anidro. O extracto foi centrifugado (20s, 10000 g), transferido para um frasco escuro e injectado no sistema de HPLC.

4. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Características do sistema cromatográfico utilizado:

- Cromatógrafo Jasco (Tóquio, Japão) equipado com uma bomba Jasco (modelo PU-980), um injector automático Jasco (modelo AS-950) e um “loop” de 10 μ l ;
- Detector de díodos (DAD) Jasco (modelo MD-910) ligado em série com um detector de fluorescência Jasco (modelo FP-920) programado com λ (excitação) = 290 nm e λ (emissão) = 330 nm;
- Coluna Inertsil 5 SI, 250 x 3 mm, 5 μ m de tamanho de partícula (Varian, The Netherland) a operar a temperatura ambiente (~ 20°C);

Condições analíticas utilizadas:

NOZ:

Fase móvel: mistura de *n*-hexano e 1,4-dioxano (96,5:3,5, v/v), com um fluxo de 0,7 ml/min, a operar em modo isocrático;

Volume de injeção: 10 μ l;

Detector de fluorescência: 0 min: ganho 10; 11,5 min: ganho 100; 14,3 min: ganho 10.

AVELÁ:

Fase móvel: mistura de *n*-hexano e 1,4-dioxano (95,5:4,5, v/v), com um fluxo de 0,7 ml/min, a operar em modo isocrático;

Volume de injeção: 10 μ l;

Detector de fluorescência: 0 min: ganho 10; 9,4 min: ganho 100; 12,7 min: ganho 10.

Os dados cromatográficos foram analisados utilizando o software Borwin (JMBS, França). Os compostos foram identificados por comparação dos tempos de retenção e dos espectros UV com substâncias de referência. A quantificação dos compostos foi feita com base no sinal obtido pelo detector de fluorescência, utilizando o método do padrão interno.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Como nos capítulos anteriores, a análise estatística foi feita com o programa “Statistica for Windows” (Statistica for Windows, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) e os resultados obtidos

comentados com base em literatura existente (Naes e Indhal, 1998; Alves e Oliveira, 2004; Alves *et al.*, 2005).

Relativamente à matriz avelã, a análise dos dados envolveu a realização de MANOVAS, testes Hotelling T^2 , testes *t*-Student, análise discriminante (DA) “forward stepwise”, para selecção das variáveis mais discriminantes e análise de variáveis canónicas (CVA), para analisar as diferenças entre grupos e permitir a sua visualização através da realização de gráficos convenientes.

Relativamente à matriz noz, de forma a avaliar a existência de diferenças discriminando os anos de produção, realizou-se uma análise de componentes principais (PCA) com validação cruzada do número de componentes (Wold, 1978). Os dados organizados em componentes principais foram divididos em três grupos, associando as observações de acordo com o ano. As diferenças entre estes grupos foram avaliadas através da realização de uma análise de variáveis canónica. Por último, e de forma a relacionar as diferenças observadas directamente com os valores iniciais dos compostos, foi construído um “biplot preditivo” (Gower e Hand, 1996). De forma a analisar as diferenças entre cultivares, procedeu-se à realização de testes MANOVA, Hotelling T^2 e *t*-Student e à análise multivariada dos dados (Bray e Maxwell, 1985). Os dados foram directamente divididos em grupos de acordo com a cultivar, e procedeu-se a uma análise discriminante “forward stepwise”, de forma a seleccionar os compostos mais discriminantes, seguida de uma análise de variáveis canónicas e da construção de um “biplot preditivo” de modo a permitir a visualização dos resultados (Alves e Oliveira, 2004).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Optimização da análise cromatográfica

6.1.1 Fase móvel e fase estacionária

São vários os exemplos de trabalhos nos quais a determinação da composição em vitamina E é realizada através da utilização de técnicas de RP-HPLC (Gimeno *et al.*, 2000; Rupérez *et al.*, 2001; Delgado-Zamarreño *et al.*, 2001; Escrivá *et al.*, 2002; Taibi e Nicotra, 2002; Gliszczynka-Swiglo e Sikorska, 2004). No entanto, uma vez que as colunas de fase reversa não permitem a completa resolução dos isómeros β e γ (Abidi e Mounts, 1997; Kamal-Eldin *et al.*, 2000; Pyka e Sliwiok, 2001; Rupérez *et al.*, 2001; Woollard e Indyk, 2003), a utilização deste tipo de colunas é geralmente preterida em detrimento do uso de colunas de fase normal (NP-HPLC), especialmente quando se pretende a quantificação do maior número possível de vitâmeros e não somente do composto maioritário (Panfili *et al.*,

1994; Gama *et al.*, 2000; Kamal-Eldin *et al.*, 2000; Pyka e Sliwiok, 2001; Bruni *et al.*, 2002; Alasalvar *et al.*, 2003a; Panfili *et al.*, 2003; Al-Saqer *et al.*, 2004; Hewavitharana *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2005). A utilização de sistemas de fase normal apresenta ainda a vantagem de permitir o uso de solventes orgânicos, conseguindo-se, desta forma, uma maior solubilidade dos lípidos e, conseqüentemente, a injeção de quantidades superiores de amostras lipofílicas no sistema (Pyka e Sliwiok, 2001; Rupérez *et al.*, 2001). Apesar de alguns autores defenderem que o uso de RP-HPLC conduz à obtenção de melhor reprodutibilidade de tempos de retenção (Rt), os coeficientes de variação obtidos (relativamente à variação de Rt) com a metodologia de NP-HPLC utilizada foram baixos (menos de 1,1 % para os diferentes padrões).

Até à presente data, foram utilizadas várias colunas e fases móveis na determinação de tococromanóis por NP-HPLC. Com base no trabalho realizado por Kamal-Eldin *et al.* (2000), no qual foi comparado o desempenho de diferentes colunas de fase normal e de diferentes fases móveis na separação dos 8 tococromanóis, decidiu-se usar neste trabalho uma coluna Inertsil 5 SI e uma mistura de *n*-hexano e 1,4-dioxano como fase móvel.

Para cada uma das matrizes, testou-se o modificador orgânico (1,4-dioxano) em diversas proporções, de modo a obter uma boa separação dos compostos num período de tempo o mais curto possível. Para a avelã testou-se o 1,4-dioxano nas quantidades (v/v) de 2,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0% e 7,5%, tendo-se obtido melhores resultados com 4,5%. Para a noz foram testadas as quantidades (v/v) de 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4% e 5%, tendo-se obtido melhores resultados com 3,5%.

Hewavitharana *et al.* (2003, 2004), ao utilizar um outro tipo de coluna de sílica e uma fase móvel similar à utilizada neste trabalho, referiu a ocorrência de alguns problemas devidos à adsorção irreversível de tocoferóis e tocotrienóis. A autora relatou que no início de cada semana de trabalho, a injeção de amostras ou padrões conduzia à obtenção de pequenos ou nenhuns picos. Estes problemas muito provavelmente seriam devidos à diferente coluna utilizada uma vez que, com a coluna Inertsil 5 SI e com a fase móvel escolhida, estes problemas não surgiram.

6.1.2 Padrão interno

De forma a melhorar a exactidão, precisão e robustez do método, optou-se por realizar a quantificação dos diferentes vitâmeros pelo método do padrão interno. Após pesquisa bibliográfica, constatou-se que os compostos mais utilizados como padrão interno para a determinação da composição em vitamina E eram o acetato de α -tocoferol e o tocol, devido à similaridade química com os compostos que se pretende estudar (Rupérez *et al.*, 2001).

Apesar de ambos os compostos apresentarem tempos de retenção (R_t) diferentes comparativamente aos R_t dos compostos em análise, o acetato de α -tocoferol apresentava impurezas que co-eluíam com compostos presentes nas amostras. Deste modo optou-se pela utilização do tocol como padrão interno. Refira-se ainda que, o acetato de α -tocoferol apresenta a desvantagem adicional de não poder ser utilizado quando se procede à saponificação da amostra.

6.1.3 Parâmetros do detector

Utilizou-se o detector de fluorescência para a quantificação dos compostos uma vez que este permite uma maior sensibilidade e selectividade que o DAD. Utilizaram-se os comprimentos de onda de excitação e de emissão descritos na literatura e adequados à determinação destes compostos.

Uma vez que os perfis apresentados pelas duas matrizes eram visivelmente diferentes, os parâmetros relativos ao ganho de sinal imposto ao detector foram testados individualmente para cada matriz, com base nos referidos perfis. No entanto, para ambas as matrizes o objectivo era o mesmo, sendo por isso utilizada a mesma ideologia. Uma vez que se pretendia detectar e quantificar o maior número possível de vitâmeros na mesma análise cromatográfica, e em ambos os casos havia um composto maioritário e outros em quantidades diminutas, ao longo da análise foram impostos diferentes ganhos de sinal ao detector. Para a avelã as melhores condições obtidas foram: 0 min: ganho 10; 9,4 min: ganho 100; 12,7 min: ganho 10. Para a noz utilizaram-se as seguintes condições: 0 min: ganho 10; 11,5 min: ganho 100; 14,3 min: ganho 10.

6.2 Processo extractivo

Devido à sensibilidade à luz, ao aquecimento e ao oxigénio por parte dos compostos em estudo (Rupérez *et al.*, 2001; Woollard e Indyk, 2003; Lopes *et al.*, 2004), foram tomadas precauções especiais no seu manuseamento. Tal como referido para as soluções padrão, a preparação dos extractos foi igualmente realizada numa sala escura com luz vermelha e, sempre que possível, as amostras foram mantidas em gelo durante o processo extractivo. Para prevenção da oxidação de vitaminas, vários autores recomendam o uso de um antioxidante. Optou-se pelo uso de BHT, pois é frequentemente descrito com este fim e, nas condições analíticas utilizadas, verificou-se que não interferia com a eluição dos compostos.

6.2.1 Avelã

De modo a estabelecer as melhores condições para a determinação destes compostos, foram testados diferentes processos extractivos (método I, II e III). Os três métodos foram

executados com a adição de padrão interno (PI), partindo da mesma amostra homogénea de avelã moída. Todos os métodos foram testados com e sem a adição de antioxidante (100 µl de solução de BHT). O antioxidante e o PI foram adicionados às amostras antes de se realizar a extracção dos compostos. Todos os testes foram realizados em duplicado.

Método I:

A amostra de avelã moída (~ 2 g) foi extraída num aparelho Soxhlet (Büchi, Suíça) com éter de petróleo (p.e. 40 – 60 °C) durante 1,5 h. O solvente remanescente foi removido em fluxo de azoto. Pesou-se rigorosamente uma toma do óleo obtido e diluiu-se em 1500 µl de *n*-hexano. Após homogeneização, filtrou-se com um filtro descartável de 0,22 µm para um pequeno frasco escuro e procedeu-se à sua injeção no sistema de HPLC.

Método II:

Uma amostra rigorosamente pesada de avelã moída (~ 300 mg) foi colocada num tubo de vidro com rolha (Supelco, Bellefonte, Pa., USA) e homogeneizado em vórtex com 2 ml de etanol durante 1min. Subsequentemente, adicionou-se *n*-hexano (4 ml), homogeneizou-se durante 1 min, adicionou-se solução saturada de cloreto de sódio (2 ml) e homogeneizou-se novamente durante 1 min. Após centrifugação (2 min, 5000 g) removeu-se cuidadosamente a fase orgânica para outro tubo de vidro previamente tarado. A amostra foi re-extraída duas vezes com *n*-hexano (4ml). Os extractos foram reunidos no mesmo frasco de vidro e levou-se à secura em corrente de azoto e à temperatura ambiente, utilizando um módulo Reacti-Therm (Pierce, Rockford, IL, USA). O resíduo foi transferido com 1,5 ml de *n*-hexano para um tubo de microcentrifuga e desidratado por adição de sulfato de sódio anidro. O extracto foi centrifugado (20s, 10000 g), transferido para um frasco escuro e injectado no sistema de HPLC.

Método III:

Antes da extracção da fracção insaponificável com *n*-hexano, procedeu-se à digestão alcalina da amostra. Para tal, adicionou-se à amostra de avelã previamente moída e rigorosamente pesada num tubo de vidro (~ 300 mg), 2,5 ml de etanol, 2,5 ml de água e 0,5 ml de NaOH 10 N, e homogenizou-se em vórtex durante 1 min. O tubo foi cheio com azoto, rolhado e procedeu-se à saponificação da amostra num módulo Reacti-Therm durante 20 min a 60 °C. Após a adição de 2,5 ml de água e 5,0 ml de *n*-hexano, a mistura foi sujeita a centrifugação (5 min, 5000 g) e a fase orgânica foi transferida para outro tubo previamente tarado. A amostra foi re-extraída duas vezes com *n*-hexano, procedendo-se de seguida como descrito para o método II.

Para qualquer um dos métodos e considerando a totalidade dos compostos detectados na avelã, os resultados obtidos com a adição de BHT foram sempre idênticos ou melhores do

que os obtidos sem o uso do antioxidante. A Tabela 6.3 compara os três métodos extractivos (em termos de % relativa), considerando os resultados obtidos para os processos realizados com a adição de BHT. Apesar de alguns autores sugerirem o uso de saponificação em determinadas matrizes (Rupérez *et al.*, 2001; Panfili *et al.*, 2003), os resultados obtidos após saponificação (método III) foram inferiores aos obtidos com o método II (com excepção do vitâmero γ -tocotrienol), provavelmente devido a perdas por oxidação ou degradação parcial. Comparativamente ao método I (extracção em Soxhlet) o método II apresentou valores inferiores de α -tocotrienol, mas valores consideravelmente superiores de α -tocoferol, β -tocoferol e β -tocotrienol. Considerando que o vitâmero maioritário nas avelãs é o α -tocoferol e que o método II parece ser aquele que, atendendo ao conjunto dos vitâmeros, permite a obtenção de melhores resultados, seleccionou-se o método II para prosseguimento dos trabalhos.

TABELA 6.3. Comparação dos 3 métodos extractivos ensaiados (% relativa assumindo 100% para a maior área obtida para o mesmo composto).

| Método Extractivo | α -T | β -T | γ -T | δ -T | α -TTR | β -TTR | γ -TTR |
|----------------------|-------------|------------|-------------|-------------|---------------|--------------|---------------|
| I | 76 | 74 | 100 | 100 | 100 | 60 | 54 |
| II | 100 | 100 | 88 | 99 | 58 | 100 | 73 |
| III | 81 | 92 | 95 | 66 | 39 | 52 | 100 |

I: extracção em Soxhlet; II: extracção com *n*-hexano; III: saponificação. T: tocoferol; TTR: tocotrienol.

6.2.2 Nogueira

A comparação da eficácia de três métodos extractivos (extracção por soxhlet com *n*-hexano, saponificação seguida de extracção com éter etílico e hidrólise ácida seguida de extracção com *n*-hexano) foi realizada por Lavendrine *et al.* (1997) ao estudar a composição em vitaminas lipossolúveis da noz. Relativamente ao teor em α -tocoferol verificou-se um ligeiro aumento pela utilização de hidrólise, quer alcalina quer ácida. Relativamente aos vitâmeros γ -tocoferol (composto maioritário) e δ -tocoferol, apesar de a extracção com soxhlet permitir a obtenção de teores ligeiramente superiores, os resultados obtidos foram estatisticamente comparados através da realização de testes *t*-Student, não tendo sido verificadas diferenças significativas ($p > 0,1$) entre os métodos testados. Uma vez que a saponificação da amostra de noz moída não conduziu a aumentos significativos do composto maioritário e os métodos envolvendo hidrólise são muito morosos e trabalhosos (o que aumenta a probabilidade de perdas de compostos) optou-se pela utilização do método de extracção por soxhlet.

Com base no trabalho realizado por Lavendrine *et al.* (1997) e nos conhecimentos adquiridos com o estudo da matriz avelã, optou-se por um processo extractivo semelhante ao seleccionado para a avelã. Para além de se testar a quantidade de amostra a utilizar, testou-se o volume de *n*-hexano utilizado na extracção, bem como o número de vezes que a amostra é re-extraída, tendo-se obtido resultados semelhantes aos da avelã (3 x 4ml de *n*-hexano).

6.3 Validação do método

6.3.1 Aveleira

Para cada vitâmero determinou-se a linearidade, limites de detecção e limites de quantificação (Tabela 6.4).

Igualmente para cada composto, foi construída uma curva de calibração com seis pontos, utilizando a razão entre as áreas dos picos do vitâmero considerado e a área do PI *versus* a concentração do padrão ($\mu\text{g/ml}$). Cada ponto da curva de calibração foi determinado em triplicado. Os coeficientes de correlação foram sempre superiores a 0,999 para todos os compostos (Tabela 6.4).

A Figura 6.2 mostra um cromatograma de uma mistura padrão.

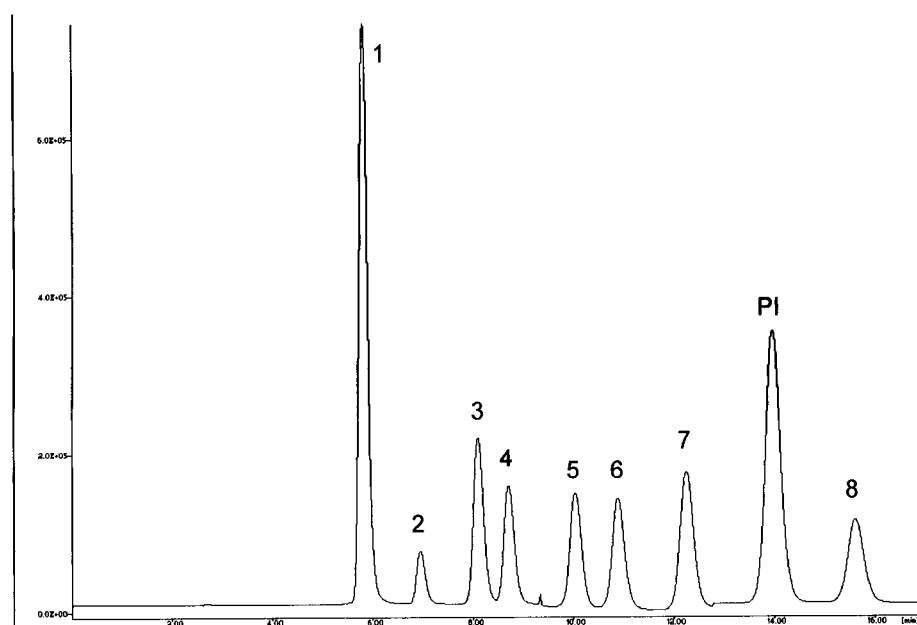


FIGURA 6.2. Cromatograma obtido por HPLC/Fluorescência da mistura padrão utilizada para a matriz avelã. 1: α -tocoferol; 2: α -tocotrienol; 3: β -tocoferol; 4: γ -tocoferol; 5: β -tocotrienol; 6: γ -tocotrienol; 7: δ -tocoferol; 8: δ -tocotrienol; PI: padrão interno (tocol).

Os limites de detecção (LOD), calculados como a concentração correspondente a três vezes o desvio padrão do ruído de base, variaram entre 10 ng/ml e 0,3 µg/ml. Os limites de quantificação (LOQ) foram determinados por diluições sucessivas da amostra, e variaram entre 0,02 e 0,83 µg/g (Tabela 6.4).

TABELA 6.4. Características analíticas do método utilizado para a determinação da composição em tococromanóis na matriz avelã.

| Composto | Rt | | Coeficiente de correlação (r^2) | Linearidade (µg/ml) | Ganho do detector | Limites | |
|------------|-------|------|-------------------------------------|---------------------|-------------------|-------------|------------|
| | min | CV% | | | | LOD (µg/ml) | LOQ (µg/g) |
| α-T | 5,69 | 0,89 | 0,9995 | 1,00 - 40,0 | 10 | 0,30 | 0,83 |
| α-TTR | 6,79 | 1,10 | 0,9992 | 0,30 - 15,0 | 10 | 0,22 | 0,72 |
| β-T | 7,96 | 0,37 | 0,9997 | 0,25 - 25,0 | 10 | 0,16 | 0,47 |
| γ-T | 8,56 | 0,40 | 0,9997 | 0,15 - 15,0 | 10 | 0,11 | 0,34 |
| β-TTR | 9,84 | 0,52 | 0,9995 | 0,04 - 2,0 | 100 | 0,01 | 0,02 |
| γ-TTR | 10,67 | 0,56 | 0,9997 | 0,10 - 5,0 | 100 | 0,03 | 0,08 |
| δ-T | 12,02 | 0,58 | 0,9996 | 0,04 - 2,0 | 100 | 0,03 | 0,07 |
| PI (tocol) | 13,71 | 0,50 | - | - | 10 | - | - |
| δ-TTR | 15,28 | 0,79 | 0,9999 | 0,50 - 25,0 | 10 | 0,22 | 0,65 |

Rt: tempo de retenção; CV: coeficiente de variação; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; T: tocoferol; TTR: tocotrienol.

De forma a avaliar a precisão cromatográfica, a mesma amostra foi injectada seis vezes, sendo o valor da precisão dado pelo coeficiente de variação (CV %) da resposta do detector. Foram obtidos CV % entre 0,8 e 3,5%, o que demonstra a precisão do sistema cromatográfico (Tabela 6.5).

A repetibilidade foi avaliada por aplicação de todo o processo extractivo seis vezes à mesma amostra homogénea de avelã moída. Os valores de CV% obtidos foram baixos, variando entre 3,5 e 6,8%.

A exactidão do método foi avaliada pelo procedimento da adição de padrões, segundo três níveis de adição (aproximadamente 15%, 30% e 60% dos valores esperados), cada nível realizado em duplicado. A mistura padrão foi adicionada à amostra moída, tendo-se de seguida efectuado todo o processo extractivo. As percentagens de recuperação dos padrões foram elevadas, variando entre 93,3% e 104,8%.

Os resultados referentes à precisão, repetibilidade e percentagem de recuperação encontram-se apresentados na Tabela 6.5.

TABELA 6.5. Parâmetros referentes à validação do método (precisão, repetibilidade e exactidão) para a matriz avelã.

| Composto | Precisão | Repetibilidade | Exactidão |
|---------------|--------------|----------------|-----------------|
| | CV % (n = 6) | CV % (n = 6) | (% recuperação) |
| α -T | 0,8 | 4,6 | 104,8 |
| α -TTR | 3,5 | 5,4 | 93,3 |
| β -T | 0,9 | 3,5 | 98,0 |
| γ -T | 1,3 | 4,2 | 95,9 |
| β -TTR | 3,5 | 6,8 | 97,3 |
| γ -TTR | 2,0 | 5,5 | 93,8 |
| δ -T | 2,5 | 5,1 | 97,4 |
| δ -TTR | - | - | 97,7 |

CV: coeficiente de variação; T: tocoferol; TTR: tocotrienol.

6.3.2 Noqueira

O cromatograma de uma mistura padrão pode ser observado na Figura 6.3.

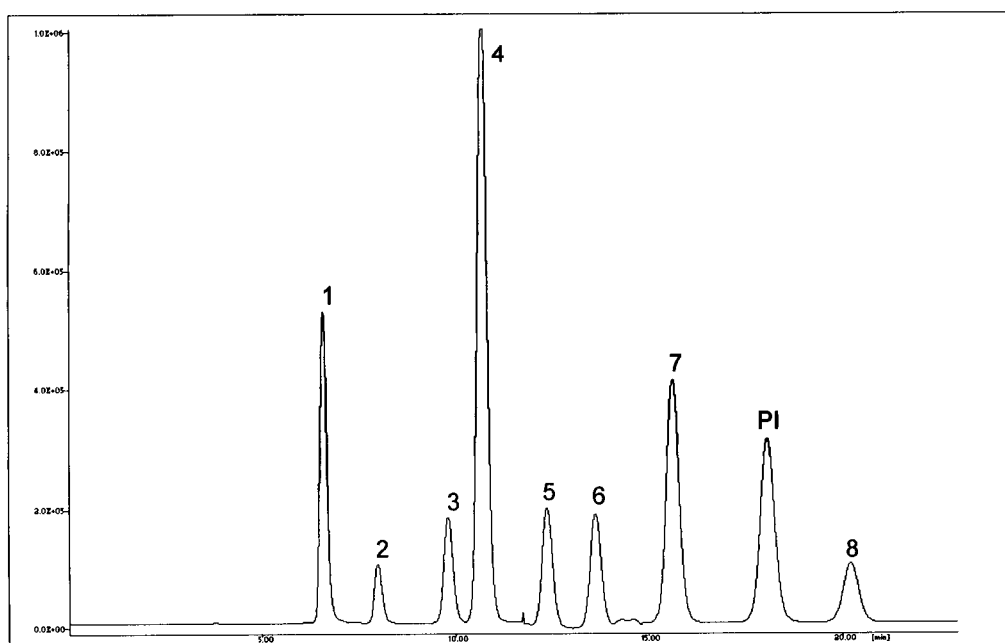


FIGURA 6.3. Cromatograma obtido por HPLC/Fluorescência da mistura padrão utilizada para a matriz noz. 1: α -tocoferol; 2: α -tocotrienol; 3: β -tocoferol; 4: γ -tocoferol; 5: β -tocotrienol; 6: γ -tocotrienol; 7: δ -tocoferol; 8: δ -tocotrienol; PI: padrão interno (tocol).

Para cada vitâmero foi construída uma curva de calibração com seis pontos, tal como descrito anteriormente para a matriz avelã. Os coeficientes de correlação invariavelmente excederam 0,999 para todos os compostos. Os limites de detecção e de quantificação foram

calculados de forma similar à descrita para a matriz avelã, variando entre 0,04 e 0,27 µg/ml e entre 0,11 e 0,96 µg/g, respectivamente (Tabela 6.6).

TABELA 6.6. Características analíticas do método utilizado para a determinação da composição em tococromanóis na matriz noz.

| Composto | Rt | | Coeficiente de correlação (r^2) | Linearidade (µg/ml) | Ganho do detector | Limites | |
|------------|-------|------|-------------------------------------|---------------------|-------------------|-------------|------------|
| | min | CV% | | | | LOD (µg/ml) | LOQ (µg/g) |
| α-T | 6,67 | 0,12 | 0,9994 | 0,40 - 37,5 | 10 | 0,22 | 0,71 |
| α-TTR | 8,11 | 0,15 | 0,9994 | 0,30 - 15,0 | 10 | 0,27 | 0,96 |
| β-T | 10,19 | 0,21 | 0,9992 | 0,16 - 15,0 | 10 | 0,07 | 0,30 |
| γ-T | 11,10 | 0,21 | 0,9994 | 0,80 - 100,0 | 10 | 0,22 | 0,65 |
| β-TTR | 12,87 | 0,22 | 0,9996 | 0,04 - 2,0 | 100 | 0,04 | 0,11 |
| γ-TTR | 14,17 | 0,20 | 0,9995 | 0,10 - 5,0 | 100 | 0,07 | 0,21 |
| δ-T | 16,24 | 0,21 | 0,9999 | 0,16 - 15,0 | 10 | 0,05 | 0,18 |
| PI (tocol) | 18,96 | 0,26 | - | - | 10 | - | - |
| δ-TTR | 21,06 | 0,27 | 0,9993 | 0,30 - 8,0 | 10 | 0,17 | 0,55 |

Rt: tempo de retenção; CV: coeficiente de variação; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; T: tocoferol; TTR: tocotrienol.

Para avaliação da precisão cromatográfica, a mesma amostra foi injectada seis vezes, tendo-se obtido coeficientes de variação (CV%) entre 0,5 e 2,8%.

Para cada composto detectado nas nozes, a repetibilidade do método foi avaliada através da determinação de CV% relativamente a seis extracções consecutivas da mesma amostra homogénea de noz. Os valores de CV% variaram entre 1,9 e 5,6%.

A exactidão do método foi avaliada de forma similar à descrita para a matriz avelã, tendo as percentagens de recuperação variado entre 93,4% e 104,0%.

TABELA 6.7. Parâmetros referentes à validação do método (precisão, repetibilidade e exactidão) para a matriz noz.

| Composto | Precisão | Repetibilidade | Exactidão |
|----------|------------------|------------------|-----------------|
| | CV % ($n = 6$) | CV % ($n = 6$) | (% recuperação) |
| α-T | 0,9 | 3,8 | 98,5 |
| α-TTR | - | - | 95,7 |
| β-T | 2,3 | 3,5 | 93,4 |
| γ-T | 0,5 | 2,4 | 104,0 |
| β-TTR | - | 5,6 | 95,5 |
| γ-TTR | 2,8 | 3,3 | 97,0 |
| δ-T | 1,1 | 1,9 | 101,8 |
| δ-TTR | - | - | 96,2 |

CV: coeficiente de variação; T: tocoferol; TTR: tocotrienol.

6.4 Determinação da composição em vitamina E das amostras

6.4.1 Avelã

Após desenvolvimento e validação do método, procedeu-se à aplicação do mesmo a um total de 79 amostras.

Na maioria das amostras foram identificados sete vitâmeros: α -, β -, γ - e δ -tocoferóis e α -, β - e γ -tocotrienóis. A Figura 6.4 mostra um cromatograma típico de uma amostra de avelã contendo todos os compostos identificados.

A composição em vitamina E (mg/kg de avelã), expressa em termos de valores médios, e os respectivos desvios padrão para cada cultivar, ano de produção e localização geográfica é apresentada na Tabela 6.8.

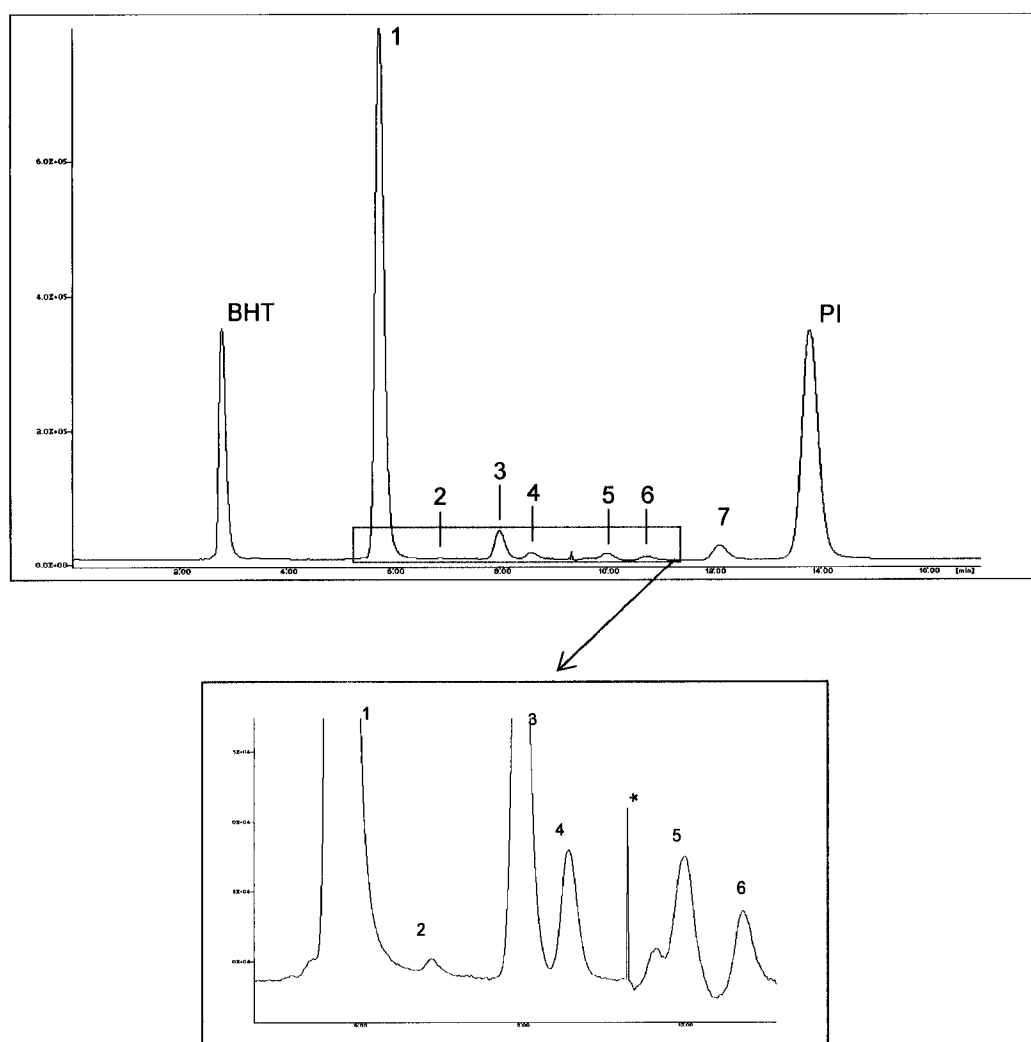


FIGURA 6.4. Cromatograma obtido por HPLC/Fluorescência, representativo de uma amostra de avelã. **BHT:** butil-hidroxitolueno; **1:** α -tocoferol; **2:** α -tocotrienol; **3:** β -tocoferol; **4:** γ -tocoferol; **5:** β -tocotrienol; **6:** γ -tocotrienol; **7:** δ -tocoferol; **PI:** padrão interno (tocol); * :mudança de ganho no detector.

TABELA 6.8. Composição em tocoferóis e tocotrienóis (mg/kg avelã) das cultivares estudadas, por ano de produção e localização geográfica.

| Cultivar | Tocoferóis e Tocotrienóis | | | | | | | Total |
|------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|---------------|
| | α -Tocoferol | α -Tocotrienol | β -Tocoferol | γ -Tocoferol | β -Tocotrienol | γ -Tocotrienol | δ -Tocoferol | |
| Ano: 2001 | | | | | | | | |
| Butler | 188,89 ± 2,16 | nd ^a | 9,21 ± 0,17 | 4,88 ± 0,11 | 0,26 ± 0,01 | 0,31 ± 0,02 | 1,07 ± 0,01 | 204,61 |
| Campanica | 183,58 ± 0,67 | nd | 6,89 ± 0,04 | 7,89 ± 0,03 | 0,22 ± 0,01 | 0,28 ± 0,01 | 1,11 ± 0,02 | 199,98 |
| Cosford | 177,15 ± 2,83 | nd | 8,50 ± 0,18 | 7,66 ± 0,14 | 0,11 ± 0,00 | 0,40 ± 0,02 | 1,60 ± 0,02 | 195,42 |
| Couplat | 193,50 ± 1,64 | nd | 7,38 ± 0,05 | 4,93 ± 0,02 | 0,12 ± 0,00 | 0,42 ± 0,01 | 1,18 ± 0,02 | 207,53 |
| Daviana | 165,96 ± 1,27 | nd | 7,67 ± 0,05 | 4,47 ± 0,01 | 0,19 ± 0,01 | 0,37 ± 0,02 | 0,61 ± 0,00 | 179,27 |
| Ennis | 151,85 ± 0,18 | nd | 7,51 ± 0,04 | 3,97 ± 0,03 | 0,15 ± 0,00 | nd | 0,61 ± 0,01 | 164,09 |
| F. Coutard | 182,84 ± 1,57 | nd | 5,34 ± 0,02 | 5,25 ± 0,05 | 0,11 ± 0,01 | nd | 0,31 ± 0,01 | 193,85 |
| Grossal | 160,22 ± 1,20 | nd | 4,98 ± 0,01 | 2,29 ± 0,03 | 0,21 ± 0,01 | 0,12 0,14 | 0,29 ± 0,01 | 168,10 |
| Gunsibert | 170,80 ± 0,73 | 1,30 ± 0,04 | 7,04 ± 0,03 | 6,44 ± 0,02 | 0,21 ± 0,01 | 0,27 ± 0,01 | 1,43 ± 0,00 | 187,48 |
| Lansing | 136,98 ± 0,04 | 1,24 ± 0,04 | 3,40 ± 0,04 | 3,54 ± 0,09 | 0,22 ± 0,01 | 0,25 ± 0,01 | 0,42 ± 0,01 | 146,05 |
| L. Espanha | 200,73 ± 1,72 | nd | 11,47 ± 0,13 | 8,95 ± 0,11 | 0,24 ± 0,01 | 0,58 ± 0,02 | 2,10 ± 0,01 | 224,07 |
| M. Bollwiller | 133,96 ± 0,57 | nd | 6,17 ± 0,03 | 2,42 ± 0,03 | 0,11 ± 0,00 | nd | 0,96 ± 0,02 | 143,61 |
| Morell | 166,85 ± 0,94 | nd | 8,24 ± 0,01 | 5,89 ± 0,04 | 0,11 ± 0,00 | 0,44 ± 0,01 | 1,33 ± 0,02 | 182,86 |
| Negreta | 164,25 ± 1,40 | nd | 7,75 ± 0,06 | 5,66 ± 0,04 | 0,09 ± 0,00 | 0,41 ± 0,01 | 0,96 ± 0,00 | 179,12 |
| Pauetet | 154,41 ± 0,26 | nd | 5,28 ± 0,05 | 4,41 ± 0,03 | 0,10 ± 0,00 | 0,23 ± 0,02 | 0,60 ± 0,01 | 165,03 |
| R. Piemont | 180,17 ± 0,29 | nd | 4,92 ± 0,02 | 4,04 ± 0,02 | 0,20 ± 0,01 | 0,58 ± 0,02 | 0,32 ± 0,01 | 190,23 |
| Segorbe | 219,96 ± 0,59 | nd | 11,55 ± 0,02 | 6,13 ± 0,05 | 0,12 ± 0,00 | 0,78 ± 0,04 | 0,68 ± 0,01 | 239,23 |
| S.Mª Jesus | 140,99 ± 0,16 | nd | 4,78 ± 0,02 | 5,69 ± 0,02 | 0,17 ± 0,00 | 0,31 ± 0,02 | 0,52 ± 0,03 | 152,47 |
| T. Giffonni | 214,75 ± 1,56 | nd | 4,87 ± 0,03 | 2,64 ± 0,02 | 0,33 ± 0,02 | nd | 0,24 ± 0,01 | 222,82 |
| Média | 173,04 | 1,24 ^b | 7,00 | 5,11 | 0,17 | 0,38 ^b | 0,86 | 186,62 |
| Variação | 134,0 - 220,0 | 1,2 - 1,3 | 3,4 - 11,5 | 2,3 - 9,0 | 0,1 - 0,3 | 0,1 - 0,8 | 0,2 - 2,1 | 143,6 - 239,2 |

média de três determinações; ^a: nd: não detectado; ^b: média dos valores determinados.

continuação da Tabela 6.8.

| Cultivar | α -Tocoferol | α -Tocotrienol | β -Tocoferol | γ -Tocoferol | β -Tocotrienol | γ -Tocotrienol | δ -Tocoferol | Total |
|-------------------|---------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|---------------|
| Ano: 2002 | | | | | | | | |
| Vila Real | | | | | | | | |
| Butler | 140,65 ± 0,28 | nd | 5,34 ± 0,05 | 3,08 ± 0,05 | 0,21 ± 0,00 | 0,35 ± 0,01 | 0,64 ± 0,00 | 150,26 |
| Campanica | 186,83 ± 2,19 | nd | 6,25 ± 0,09 | 9,83 ± 0,03 | 0,19 ± 0,01 | 0,35 ± 0,01 | 1,21 ± 0,02 | 204,65 |
| Cosford | 171,12 ± 0,76 | nd | 8,49 ± 0,03 | 9,53 ± 0,04 | 0,13 ± 0,00 | 0,30 ± 0,01 | 2,77 ± 0,01 | 192,34 |
| Couplat | 188,63 ± 1,53 | 1,21 ± 0,05 | 8,38 ± 0,02 | 4,18 ± 0,03 | 0,15 ± 0,00 | 0,39 ± 0,03 | 1,20 ± 0,01 | 204,13 |
| Daviana | 176,54 ± 2,09 | nd | 6,10 ± 0,11 | 4,39 ± 0,10 | 0,16 ± 0,01 | 0,29 ± 0,01 | 0,70 ± 0,02 | 188,19 |
| Ennis | 165,71 ± 0,52 | nd | 5,93 ± 0,05 | 6,18 ± 0,09 | 0,14 ± 0,00 | nd | 0,88 ± 0,03 | 178,85 |
| F. Coutard | 146,86 ± 0,09 | nd | 4,01 ± 0,03 | 3,69 ± 0,04 | 0,29 ± 0,00 | nd | 0,27 ± 0,00 | 155,13 |
| Grossal | 196,00 ± 3,41 | 1,03 ± 0,11 | 5,78 ± 0,09 | 4,15 ± 0,04 | 0,33 ± 0,03 | 0,33 ± 0,02 | 0,46 ± 0,03 | 208,08 |
| Gunsbert | 194,49 ± 2,21 | 1,22 ± 0,09 | 9,27 ± 0,09 | 8,22 ± 0,12 | 0,37 ± 0,01 | 0,46 ± 0,03 | 2,42 ± 0,03 | 216,44 |
| Lansing | 145,56 ± 1,26 | nd | 4,30 ± 0,10 | 7,12 ± 0,04 | 0,10 ± 0,01 | 0,25 ± 0,01 | 0,47 ± 0,03 | 157,80 |
| L. Espanha | 173,88 ± 2,46 | nd | 6,73 ± 0,13 | 8,03 ± 0,16 | 0,33 ± 0,02 | 0,40 ± 0,02 | 1,14 ± 0,01 | 190,51 |
| M. Bollwiller | 158,38 ± 0,70 | nd | 5,91 ± 0,04 | 3,31 ± 0,01 | 0,12 ± 0,01 | nd | 0,76 ± 0,02 | 168,48 |
| Morell | 188,20 ± 4,08 | 1,18 ± 0,05 | 6,78 ± 0,12 | 5,03 ± 0,07 | 0,33 ± 0,01 | 0,43 ± 0,01 | 0,69 ± 0,01 | 202,65 |
| Negreta | 186,19 ± 0,40 | nd | 5,61 ± 0,01 | 6,51 ± 0,04 | 0,18 ± 0,01 | 0,34 ± 0,02 | 0,69 ± 0,01 | 199,53 |
| Paulet | 168,80 ± 1,68 | nd | 5,97 ± 0,08 | 6,86 ± 0,07 | 0,09 ± 0,00 | 0,28 ± 0,01 | 0,76 ± 0,01 | 182,76 |
| R. Piemont | 165,88 ± 0,43 | nd | 4,18 ± 0,04 | 6,10 ± 0,05 | 0,10 ± 0,00 | 0,41 ± 0,02 | 0,40 ± 0,00 | 176,97 |
| Segorbe | 221,19 ± 0,64 | nd | 9,41 ± 0,10 | 5,45 ± 0,04 | 0,25 ± 0,02 | 0,47 ± 0,01 | 0,57 ± 0,01 | 237,33 |
| S.Mª Jesus | 167,18 ± 0,43 | nd | 3,61 ± 0,12 | 5,79 ± 0,04 | 0,30 ± 0,01 | 0,49 ± 0,03 | 0,26 ± 0,00 | 177,62 |
| T. Giffonni | 214,33 ± 1,52 | nd | 4,57 ± 0,06 | 4,23 ± 0,01 | 0,28 ± 0,01 | 0,30 ± 0,04 | 0,25 ± 0,01 | 223,95 |
| Média | 176,65 | 1,18 ^b | 6,14 | 5,88 | 0,22 ^b | 0,36 ^b | 0,87 | 190,30 |
| Varição | 145,6 - 221,2 | 1,0 - 1,2 | 3,6 - 9,4 | 3,3 - 9,8 | 0,1 - 0,4 | 0,3 - 0,5 | 0,3 - 2,8 | 155,1 - 237,3 |
| Felgueiras | | | | | | | | |
| Butler | 184,30 ± 0,43 | nd | 9,81 ± 0,00 | 5,21 ± 0,06 | 0,33 ± 0,01 | 0,27 ± 0,01 | 1,45 ± 0,00 | 201,37 |
| Campanica | 190,30 ± 0,42 | nd | 5,43 ± 0,15 | 5,95 ± 0,08 | 0,23 ± 0,01 | 0,24 ± 0,01 | 0,90 ± 0,02 | 203,05 |
| Cosford | 110,15 ± 1,99 | nd | 4,32 ± 0,09 | 2,67 ± 0,07 | 0,05 ± 0,00 | 0,00 ± 0,05 | 0,64 ± 0,03 | 117,83 |
| Couplat | 223,57 ± 0,28 | nd | 12,01 ± 0,03 | 8,61 ± 0,06 | 0,26 ± 0,00 | 0,61 ± 0,00 | 1,58 ± 0,01 | 246,63 |
| Ennis | 123,89 ± 2,66 | nd | 5,46 ± 0,14 | 5,85 ± 0,15 | 0,12 ± 0,00 | 3,20 ± 0,12 | 1,08 ± 0,02 | 139,59 |
| F. Coutard | 226,83 ± 1,85 | 1,22 ± 0,03 | 8,01 ± 0,15 | 9,75 ± 0,18 | 0,28 ± 0,01 | 0,33 ± 0,01 | 1,03 ± 0,03 | 247,45 |
| M. Bollwiller | 105,87 ± 0,21 | nd | 4,07 ± 0,07 | 2,60 ± 0,02 | 0,05 ± 0,00 | nd | 0,61 ± 0,01 | 113,21 |
| Morell | 221,22 ± 3,19 | 1,10 ± 0,04 | 9,12 ± 0,17 | 13,39 ± 0,76 | 0,40 ± 0,00 | 0,34 ± 0,00 | 2,37 ± 0,15 | 247,93 |
| Paulet | 201,04 ± 3,26 | nd | 7,40 ± 0,15 | 7,60 ± 0,17 | 0,09 ± 0,00 | 0,25 ± 0,01 | 1,14 ± 0,03 | 217,52 |
| T. Giffonni | 219,94 ± 0,59 | nd | 5,44 ± 0,01 | 4,74 ± 0,04 | 0,12 ± 0,00 | 0,24 ± 0,01 | 0,43 ± 0,01 | 230,92 |
| Média | 180,71 | 1,16 ^b | 7,11 | 6,64 | 0,19 | 0,61 ^b | 1,12 | 196,55 |
| Varição | 105,9 - 226,8 | 1,1 - 1,2 | 4,1 - 12,0 | 2,6 - 13,4 | 0,0 - 0,4 | 0,0 - 3,2 | 0,4 - 2,4 | 113,2 - 247,9 |

continuação da Tabela 6.8.

| Cultivar | α-Tocoferol | α-Tocotrienol | β-Tocoferol | γ-Tocoferol | β-Tocotrienol | γ-Tocotrienol | δ-Tocoferol | Total |
|-------------------|---------------|-------------------|--------------|--------------|---------------|-------------------|-------------|---------------|
| Ano: 2003 | | | | | | | | |
| Vila Real | | | | | | | | |
| Butler | 156,29 ± 7,26 | 0,95 ± 0,05 | 5,53 ± 0,20 | 2,11 ± 0,09 | 0,23 ± 0,02 | 0,33 ± 0,02 | 0,40 ± 0,02 | 165,84 |
| Campanica | 165,50 ± 0,37 | nd | 4,82 ± 0,04 | 3,75 ± 0,03 | 0,35 ± 0,01 | 0,62 ± 0,04 | 0,40 ± 0,01 | 175,45 |
| Cosford | 177,47 ± 0,76 | nd | 8,97 ± 0,01 | 5,49 ± 0,01 | 0,17 ± 0,00 | 0,22 ± 0,01 | 1,32 ± 0,02 | 193,65 |
| Couplat | 158,79 ± 0,68 | 1,12 ± 0,03 | 7,60 ± 0,04 | 4,31 ± 0,06 | 0,09 ± 0,00 | 0,48 ± 0,01 | 1,09 ± 0,02 | 173,46 |
| Ennis | 126,78 ± 0,42 | 1,11 ± 0,04 | 7,29 ± 0,05 | 1,04 ± 0,02 | 0,29 ± 0,01 | nd | 0,25 ± 0,01 | 136,76 |
| F. Coutard | 174,54 ± 5,24 | nd | 4,30 ± 0,09 | 1,69 ± 0,05 | 0,32 ± 0,02 | nd | 0,23 ± 0,00 | 181,07 |
| Grossal | 188,63 ± 0,97 | nd | 6,56 ± 0,01 | 2,25 ± 0,04 | 0,16 ± 0,00 | nd | 0,32 ± 0,01 | 197,91 |
| Gunslibert | 181,55 ± 0,98 | nd | 10,77 ± 0,12 | 3,74 ± 0,07 | 0,21 ± 0,00 | 0,25 ± 0,01 | 0,86 ± 0,02 | 197,36 |
| Lansing | 110,15 ± 1,01 | 1,34 ± 0,03 | 3,29 ± 0,01 | 1,72 ± 0,02 | 0,18 ± 0,01 | nd | 0,23 ± 0,01 | 116,91 |
| L. Espanha | 193,98 ± 0,86 | nd | 7,51 ± 0,04 | 5,97 ± 0,03 | 0,30 ± 0,00 | 0,49 ± 0,02 | 1,15 ± 0,02 | 209,39 |
| M. Bollwiller | 159,76 ± 1,03 | nd | 5,30 ± 0,06 | 1,66 ± 0,06 | 0,14 ± 0,00 | nd | 0,35 ± 0,01 | 167,21 |
| Morell | 188,44 ± 1,01 | nd | 6,28 ± 0,08 | 15,69 ± 0,08 | 0,20 ± 0,01 | 0,57 ± 0,03 | 2,38 ± 0,01 | 213,55 |
| Negreta | 170,08 ± 2,31 | nd | 4,15 ± 0,00 | 4,02 ± 0,01 | 0,30 ± 0,01 | nd | 0,36 ± 0,00 | 178,91 |
| Pauetet | 177,83 ± 2,89 | nd | 6,64 ± 0,06 | 4,67 ± 0,04 | 0,21 ± 0,01 | 0,38 ± 0,02 | 0,53 ± 0,01 | 189,87 |
| R. Piemont | 193,64 ± 2,36 | nd | 5,88 ± 0,10 | 5,80 ± 0,10 | 0,17 ± 0,01 | 0,54 ± 0,03 | 0,58 ± 0,01 | 206,07 |
| Segorbe | 203,43 ± 1,36 | nd | 8,74 ± 0,06 | 2,25 ± 0,04 | 0,21 ± 0,02 | 0,37 ± 0,01 | 0,25 ± 0,01 | 214,88 |
| S.ª Jesus | 201,54 ± 1,90 | nd | 9,39 ± 0,09 | 4,51 ± 0,04 | 0,10 ± 0,00 | 0,32 ± 0,03 | 0,81 ± 0,02 | 216,67 |
| T. Giffonni | 177,78 ± 2,83 | nd | 3,42 ± 0,09 | 1,89 ± 0,06 | 0,21 ± 0,01 | nd | 0,14 ± 0,00 | 183,45 |
| Média | 172,56 | 0,92 ^b | 6,47 | 4,03 | 0,21 | 0,39 ^b | 0,65 | 184,36 |
| Variação | 110,1 - 203,4 | 1,0 - 1,3 | 3,3 - 10,8 | 1,0 - 15,7 | 0,1 - 0,4 | 0,2 - 0,6 | 0,1 - 2,4 | 116,9 - 216,7 |
| Felgueiras | | | | | | | | |
| Butler | 148,48 ± 0,30 | 1,07 ± 0,02 | 9,04 ± 0,03 | 1,94 ± 0,04 | 0,32 ± 0,02 | 0,41 ± 0,00 | 0,54 ± 0,02 | 161,79 |
| Campanica | 212,95 ± 1,35 | nd | 5,87 ± 0,03 | 4,42 ± 0,05 | 0,15 ± 0,00 | 0,28 ± 0,02 | 0,72 ± 0,02 | 224,39 |
| Cosford | 169,08 ± 1,13 | nd | 8,34 ± 0,06 | 4,94 ± 0,01 | 0,07 ± 0,00 | 0,30 ± 0,02 | 1,09 ± 0,02 | 183,82 |
| Couplat | 220,75 ± 1,63 | nd | 13,54 ± 0,23 | 20,79 ± 0,65 | 0,15 ± 0,01 | 0,51 ± 0,02 | 4,39 ± 0,15 | 260,14 |
| Ennis | 132,92 ± 1,11 | 1,10 ± 0,04 | 6,49 ± 0,05 | 2,34 ± 0,06 | 0,11 ± 0,01 | nd | 0,50 ± 0,01 | 143,46 |
| F. Coutard | 116,29 ± 1,11 | nd | 3,41 ± 0,02 | 6,27 ± 0,06 | 0,13 ± 0,01 | 0,28 ± 0,01 | 1,11 ± 0,03 | 127,51 |
| Gunslibert | 202,99 ± 1,22 | nd | 11,97 ± 0,06 | 4,40 ± 0,02 | 0,07 ± 0,00 | 0,35 ± 0,02 | 2,40 ± 0,00 | 222,19 |
| L. Espanha | 221,33 ± 0,56 | nd | 13,10 ± 0,03 | 8,44 ± 0,02 | 0,10 ± 0,00 | 0,61 ± 0,05 | 1,75 ± 0,01 | 245,33 |
| M. Bollwiller | 154,84 ± 1,36 | 2,48 ± 0,11 | 8,80 ± 0,02 | 3,73 ± 0,05 | 3,80 ± 0,06 | 1,88 ± 0,04 | 4,13 ± 0,03 | 179,66 |
| Morell | 214,44 ± 1,82 | nd | 10,20 ± 0,05 | 3,55 ± 0,08 | 0,10 ± 0,00 | 0,84 ± 0,03 | 1,37 ± 0,03 | 230,49 |
| Negreta | 218,67 ± 1,48 | nd | 6,77 ± 0,04 | 4,02 ± 0,03 | 0,09 ± 0,01 | 0,25 ± 0,02 | 0,75 ± 0,01 | 230,56 |
| Pauetet | 217,04 ± 1,43 | nd | 8,23 ± 0,16 | 5,62 ± 0,11 | 0,19 ± 0,00 | 0,38 ± 0,01 | 1,20 ± 0,01 | 232,66 |
| Segorbe | 222,86 ± 0,30 | nd | 8,93 ± 0,06 | 2,54 ± 0,04 | 0,11 ± 0,00 | 0,49 ± 0,03 | 0,58 ± 0,00 | 235,51 |
| T. Giffonni | 214,29 ± 1,52 | nd | 5,50 ± 0,05 | 3,18 ± 0,05 | 0,12 ± 0,00 | 0,24 ± 0,02 | 0,36 ± 0,02 | 223,68 |
| Média | 190,49 | 1,55 ^b | 8,59 | 5,44 | 0,39 | 0,53 ^b | 1,49 | 207,23 |
| Variação | 116,3 - 222,9 | 1,1 - 2,5 | 3,4 - 13,5 | 1,9 - 20,8 | 0,1 - 3,8 | 0,2 - 1,9 | 0,4 - 4,4 | 127,5 - 260,1 |

Na tabela anterior, observa-se que o vitâmero α -tocoferol foi o composto maioritário em todas as amostras analisadas, variando entre 105,9 mg/kg na cv. Merveille de Bollwiller e 226,8 mg/kg na cv. Fertille de Coutard, ambas recolhidas no ano 2002, em Felgueiras. Na mesma tabela pode-se igualmente constatar que os vitâmeros α - e γ -tocotrienóis existem em quantidades muito pequenas, inclusivamente não tendo sido detectados em algumas das amostras estudadas.

Na literatura encontram-se disponíveis vários estudos relativos à composição em vitamina E de avelãs (Parcerisa *et al.*, 1995b, 1998, 2000; Savage *et al.*, 1997; Açkurt *et al.*, 1999; Delgado-Zamarreno *et al.*, 2001; Delgado-Zamarreno *et al.*, 2004; Ozdemir *et al.*, 2001a; Bernardo-Gil *et al.*, 2002; Alasalvar *et al.*, 2003a; Benitez-Sánchez *et al.*, 2003; Bada *et al.*, 2004; Crews *et al.*, 2005a). Na grande maioria dos mesmos, a composição em vitamina E é determinada no óleo extraído das avelãs, ao contrário do que acontece no trabalho que aqui se descreve, no qual foi considerada a totalidade da semente (ver secção II.3. "Preparação da amostra"). Este facto parece ser o principal responsável pelas diferenças encontradas aquando da comparação entre os valores aqui apresentados e os descritos nos referidos trabalhos, uma vez que, após conversão dos resultados apresentados na Tabela 6.8 (em mg/kg de avelã) para mg/kg de óleo, os valores obtidos são coerentes com os previamente publicados. Refira-se no entanto, que algumas variações podem também ser imputadas à metodologia analítica utilizada, uma vez que, como anteriormente referido, foram várias as metodologias utilizadas em trabalhos relativos à determinação deste tipo de compostos conduzidos por outros grupo de trabalho, bem como as diferenças inerentes à própria amostra em estudo (por exemplo: cultivar, localização geográfica e factores edafoclimáticos).

Apesar de existirem vários trabalhos prévios, em muitos deles apenas foi determinado o vitâmero maioritário, α -tocoferol, muitas vezes recorrendo a técnicas já obsoletas baseadas em reacções espectrofotométricas (Açkurt *et al.*, 1999; Ozdemir *et al.*, 2001a).

Em outros estudos, a separação dos vitâmeros foi feita por NP-HPLC, sendo a sua detecção feita, na maioria das vezes, por detectores UV, de fluorescência ou por ambos, permitindo deste modo a determinação de um maior número de vitâmeros. Alasalvar *et al.* (2003a), ao estudar o óleo obtido de uma cultivar turca por NP-HPLC/UV, obteve teores idênticos aos aqui descritos para os vitâmeros α -, β - e δ -tocoferóis, mas teores de γ -tocoferol bastante superiores (em média, quase 5 vezes superiores). Como se pode ver na Tabela 6.8, também neste trabalho existem duas cultivares (cv. Morell de Vila Real e cv. Couplat de Felgueiras, ambas recolhidas no ano 2003) que apresentaram teores anormalmente elevados de γ -tocoferol (15, 7 e 20,8 mg/kg avelã, respectivamente) quando comparadas com as restantes amostras (5,0 mg/kg avelã, em média). No entanto, os resultados obtidos ao longo dos três anos estudados não se permitiram tirar conclusões acerca deste facto.

Crews e colaboradores (2005a) estudaram óleos de avelã provenientes de 5 países, tendo encontrado valores de α -tocoferol bastante variáveis. Comparativamente com os resultados obtidos com as amostras portuguesas estudadas, verificou-se que a amostra proveniente da Croácia, estudada pelos referidos autores, apresentou valores de γ -tocoferol muito superiores (65 mg/kg óleo) e que uma amostra proveniente de Itália apresentou teores extremamente elevados de α -tocotrienol (209 mg/kg); refira-se ainda que no mesmo trabalho, os vitâmeros β - e γ -tocotrienóis não foram detectados na maioria das amostras, à excepção de duas amostras Espanholas para as quais os valores obtidos foram muito elevados quando comparados com os obtidos no trabalho que aqui se descreve. Estas diferenças poder-se-ão dever a diferenças na metodologias utilizada, uma vez que no trabalho realizado por Crews *et al.* (2005a) os compostos foram detectados por UV, o qual não permite a confirmação da identidade dos compostos, ao contrário do que é possível ser feito no DAD pela comparação dos espectros dos compostos detectados com os de substâncias de referência. Consequentemente, é possível que os valores anormalmente elevados, descritos por Crews *et al.* (2005a) resultem da co-eluição de compostos que não os identificados.

Outra vantagem da utilização em série dos detectores DAD e Fluorescência deve ainda ser salientada: ao efectuar-se a quantificação dos compostos com o detector de fluorescência consegue-se uma sensibilidade bastante superior à obtida com os detectores UV e DAD. Comparativamente, neste trabalho foram obtidos limites de detecção inferiores a 1mg/kg para todos os vitâmeros, ao passo que Crews e colaboradores (2005a) referem a impossibilidade de detectar valores inferiores a 10 mg/kg. Este dado poderá justificar a ausência de β - e γ -tocotrienóis na maioria das amostras estudadas por estes autores, uma vez que estes compostos poderiam existir nas amostras mas não terem sido detectados. Estas hipóteses são corroboradas pelos resultados descritos por Benitez-Sánchez *et al.* (2003), ao estudar 17 óleos de avelã provenientes de 5 países utilizando NP-HPLC/MS/DAD/Fluorescência, uma vez que na maioria das amostras estudadas por estes autores foram identificados e quantificados 7 vitâmeros (α -, β -, γ - e δ -tocoferóis e α -, β - e γ -tocotrienóis).

Relativamente aos teores individuais dos vitâmeros, os valores apresentados na Tabela 6.8 são coerentes com os descritos por Benitez-Sánchez *et al.* (2003), à excepção do teor em β -tocoferol, o que poderá possivelmente ser explicado pelo facto de algumas amostras de óleos de avelã refinados e de óleos obtidos de avelãs torradas terem sido incluídos no estudo dos referidos autores. Em algumas das cultivares estudadas, cultivadas em Portugal, os vitâmeros α - e γ -tocotrienóis não foram detectados, o que está igualmente de acordo com os resultados descritos por Benitez-Sánchez *et al.* (2003).

A composição em vitamina E das avelãs foi ainda alvo de estudo por parte de outros autores (Savage *et al.*, 1997; Bernardo-Gil *et al.*, 2002; Bada *et al.*, 2004). Todos estes autores utilizaram uma metodologia NP-HPLC/Fluorescência, o que lhes permitiu a detecção

e quantificação dos 4 tocoferóis (α , β , γ e δ), sem no entanto terem procedido à determinação de tocotrienóis.

A existência de diferenças na composição em vitamina E, originadas pela influência de factores como a cultivar, ano de produção ou factores edafo-climáticos, foi avaliada através da realização da análise estatística dos resultados. Como referido, a cultivar Morell (Vila Real, 2003) apresentou um teor em γ -tocoferol anormalmente elevado, tendo sido por essa razão considerada uma amostra “outlier” e conseqüentemente removida da análise estatística pois, caso contrário, a análise descreveria as diferenças entre esta cultivar e as restantes, em vez de permitir averiguar as diferenças e similaridades existentes no conjunto total dos dados.

De forma a verificar a influência do ano, efectuaram-se testes MANOVA, considerando apenas os resultados obtidos ao longo dos três anos de estudo para as mesmas cultivares, provenientes da mesma localização geográfica (Vila Real) e tendo o ano de produção como factor agrupante. Os resultados demonstraram diferenças significativas, isto é, indicando que pelo menos um grupo é diferente dos restantes. Em seguida realizaram-se testes Hotelling T^2 , tendo o ano como factor agrupante e desta forma comparando os anos dois-a-dois (Tabela 6.9). Pela realização de testes t-Student verificou-se quais os compostos responsáveis pela observação das diferenças entre os grupos (Tabela 6.9).

TABELA 6.9. Testes MANOVA, Hotelling T^2 e t-Student relativos às diferenças entre anos de produção em termos da composição em tococromanóis da avelã.

| RESUMO DOS TESTES MANOVA | | | |
|---|---|--|---|
| Wilks' Lambda = 0,60787, $F_{(14,312)} = 6,298$, $p < 0,0000$ | | | |
| RESUMO DOS TESTES HOTELLING T^2 E t-STUDENT | | | |
| | 2001 | 2002 | 2003 |
| 2001 | ----- | β -T, γ -T, β -TTR | γ -T, β -TTR, δ -T |
| 2002 | $T^2 = 32,76$; $F_{(7,10)} = 4,43$ $p < 0,0001$ | ----- | γ -T, γ -TTR, δ -T |
| 2003 | $T^2 = 48,59$; $F_{(7,10)} = 6,55$ $p < 0,0001$ | $T^2 = 78,85$; $F_{(7,10)} = 10,62$ $p < 0,0001$ | ----- |

Triângulo inferior: valores de F_{obs} (Hotelling T^2) e nível de significância; triângulo superior: vitâmeros para os quais os valores de t_{obs} são significativos ($p < 0,05$). T: tocoferol; TTR: tocotrienol.

Aplicando um procedimento estatístico similar ao descrito nos capítulos anteriores (análise DA seguida de análise CVA) obteve-se o gráfico apresentado na Figura 6.5.

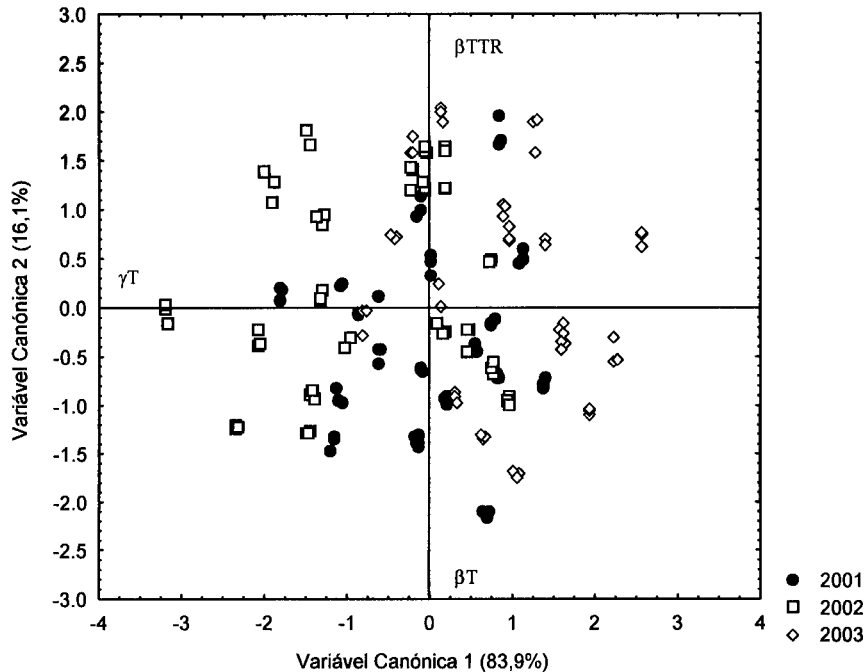


FIGURA 6.5. Resultados da CVA relativos à composição em tococromanóis da avelã, tendo o ano como factor agrupante. As percentagens em cada eixo referem o total da informação explicada por cada dimensão canónica; γ T: γ -tocoferol; β T: β -tocoferol; β TTR: β -tocotrienol.

Apesar dos testes MANOVA e Hotelling T^2 terem revelado a existência de diferenças significativas (Tabela 6.9), a Figura 6.5 mostra claramente que as amostras dos três anos de produção são relativamente idênticas entre si. As pequenas diferenças existentes entre amostras individuais são sobretudo explicadas pelos teores em γ - e β -tocoferóis e β -tocotrienol, não se observando quaisquer diferenças significativas em termos de teor do composto maioritário (α -tocoferol) (Tabela 6.9 e Figura 6.5).

De forma a avaliar a influência do factor localização geográfica, procedeu-se à análise estatística dos resultados relativos às cultivares comuns em Felgueiras e Vila Real, nos anos 2002 e 2003. Os dados foram agrupados mediante a sua proveniência geográfica, e novamente se fez uma DA "forward stepwise", seleccionando-se dois vitâmeros como sendo os mais discriminantes, seguida de uma CVA. Uma vez que apenas dois grupos são considerados (Felgueiras e Vila Real) as diferenças entre os resultados obtidos para as diferentes localizações geográficas são visualizadas em apenas uma dimensão canónica (Figura 6.6).

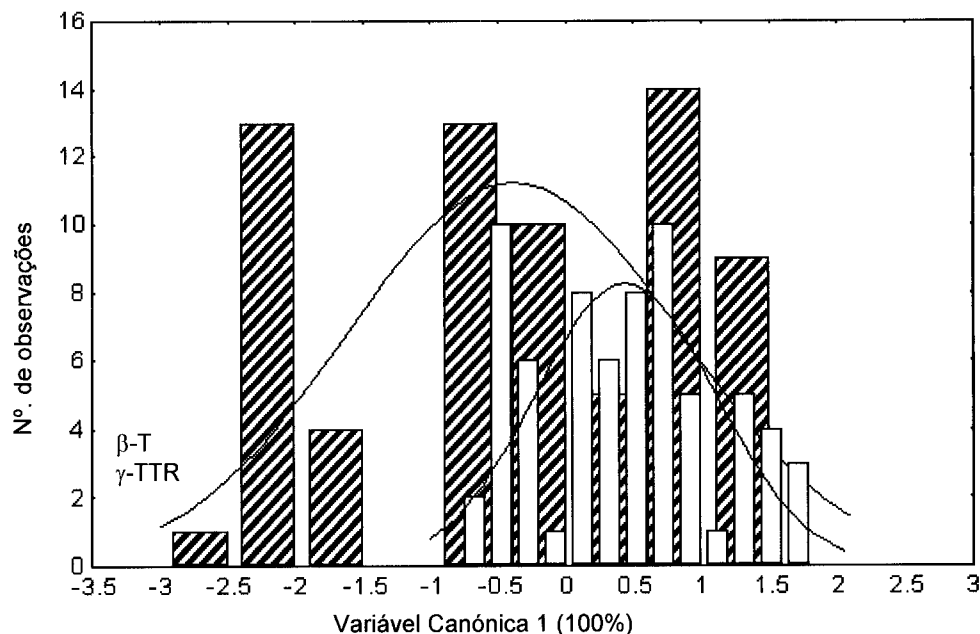


FIGURA 6.6. Resultados da CVA tendo a localização geográfica como factor agrupante. β T: β -tocoferol; γ TTR: γ -tocotrienol. : Felgueiras; : Vila Real

Estes dados parecem indicar que a composição em vitamina E das avelãs não será substancialmente influenciada pelo factor “localização geográfica”. Apesar da localização “Felgueiras” apresentar uma maior dispersão de resultados, com algumas cultivares ligeiramente diferentes da generalidade das amostras estudadas (nomeadamente a cv. Couplat de ambos os anos e as cvs. Longue d’Espanha, Merveille de Bollwiller e Morell de 2003, as quais apresentaram teores superiores em β -tocoferol e γ -tocotrienol), a Figura 6.6 evidencia que as amostras provenientes de Vila Real são idênticas à maioria das amostras de Felgueiras.

Tal como referido para a análise em triacilgliceróis, tendo por base o trabalho realizado por Parcerisa *et al.* (1998), procedeu-se a uma abordagem semelhante à realizada por este autor, utilizando agora, como variáveis, os diferentes vitâmeros analisados. Os dados foram distribuídos mediante a origem das cultivares, isto é, segundo os quatro grupos referidos nos capítulos anteriores: USA (cvs. Butler, Ennis e Lansing), Itália (cvs. Campanica, Round du Piemont, Santa Maria de Jesus e Tonda di Giffoni), Espanha (cvs. Couplat, Grossal, Morell, Negreta, Pauetet e Segorbe) e um grupo denominado “Outros”, compreendendo uma cultivar de origem Francesa (cv. Fertille de Coutard), cultivares Inglesas (cvs. Cosford, Daviana, Longue d’Espanha) e Alemãs (cvs. Gunslebert e Merveille de Bollwiller), e procedeu-se a um tratamento estatístico similar ao efectuado para o factor “ano de produção”, tendo agora como factor agrupante a origem das cultivares. A Tabela 6.10 mostra os resultados obtidos

com os testes MANOVA, Hotelling T^2 e t -Student. Os resultados revelam que todos os grupos são diferentes, apesar das diferenças existentes entre cada par de grupos comparados serem atribuídas a diferentes conjuntos de variáveis. As variáveis responsáveis pelas diferenças observadas entre os grupos considerados ($p < 0,05$), encontram-se descritas no triângulo superior da Tabela 6.10. Curiosamente, ao contrário do que se verificou quando os diferentes anos de produção e as diferentes localizações geográficas foram consideradas, todos os grupos, com exceção do par Espanha/Itália, apresentaram diferenças significativas relativamente ao teor do composto maioritário (α -tocoferol).

TABELA 6.10. Testes MANOVA, Hotelling T^2 e t -Student relativos às diferenças dos grupos, em termos da sua composição em tococromanóis e segundo as origens das cultivares.

| RESUMO DO TESTE MANOVA | | | | |
|---|---------------------------------------|---|--|---|
| Wilks' Lambda = 0,26978, $F_{(21,445)} = 12,269$; $p < 0,0001$ | | | | |
| RESUMO DOS TESTES HOTELLING T^2 E t -STUDENT | | | | |
| | USA | ITÁLIA | ESPANHA | OUTRAS |
| USA | ----- | α -T, α -TTR, γ -T, γ -TTR | α -T, α -TTR, β -T, γ -T, γ -TTR, δ -T | α -T, α -TTR, β -T, γ -T, δ -T |
| | $T^2 = 113,689$ | | | |
| ITÁLIA | $F_{(7,55)} = 14,64$ $p < 0,0001$ | ----- | α -TTR, β -T, δ -T | α -T, α -TTR, β -T, γ -TTR, δ -T |
| | $T^2 = 89,676$ | $T^2 = 71,1636$ | | |
| ESPANHA | $F_{(7,70)} = 11,800$ $p < 0,0001$ | $F_{(7,79)} = 9,4484$ $p < 0,0001$ | ----- | α -T, γ -TTR, δ -T |
| | $T^2 = 60,8194$ | $T^2 = 122,024$ | $T^2 = 97,4714$ | |
| OUTRAS | $F_{(7,70)} = 8,0026$ $p < 0,0001$ | $F_{(7,79)} = 16,201$ $p < 0,0001$ | $F_{(7,94)} = 13,089$ $p < 0,0001$ | ----- |

Testes Hotelling T^2 e t -Student: triângulo inferior: valores de F_{obs} (Hotelling T^2) e nível de significância; triângulo superior: vitâmeros para os quais os valores de t_{obs} são significativos ($p < 0,05$). T: tocoferol; TTR: tocotrienol.

A análise multivariada dos dados permitiu a obtenção da Figura 6.7, a qual representa 84,8% da informação originalmente contida nos dados. Constata-se a existência de algumas diferenças entre os quatro grupos considerados, apesar destes não se encontrarem separados.

Esta figura permite ainda verificar diferenças consideráveis dentro dos grupos, evidenciadas pela importância da variável α -tocoferol em ambas as dimensões, o que dificulta a visualização das diferenças entre os grupos.

Adicionalmente, o grupo “Espanha” parece evidenciar características intermédias, uma vez que se encontra distribuído pela zona central do gráfico. Devido principalmente aos teores inferiores de α -tocoferol e γ -tocotrienol, o grupo “USA” parece ser distinto do grupo “Itália”, apresentando ainda algumas diferenças relativamente ao grupo “Espanha”. O grupo “Outras” foi aquele que apresentou uma maior dispersão de resultados, sendo no entanto possível observar que algumas cultivares pertencentes a este grupo apresentaram teores superiores em β - e δ -tocoferóis e inferiores em γ -tocotrienol, diferenciando-se por este motivo das restantes. Verifica-se ainda que algumas das cultivares pertencentes aos grupos “Espanha” e “Itália” são muito idênticas, o que está de acordo com os resultados apresentados na Tabela 6.10, pois, como se referiu, o par Espanha/Itália foi o único que não apresentou diferenças significativas relativamente ao composto maioritário (α -tocoferol).

Por último, refira-se ainda que, apesar de o teor dos vitâmeros entre diferentes cultivares ao longo dos anos apresentar alguma variabilidade natural dentro do mesmo grupo de origem de cultivares, a cultivar Espanhola “Segorbe” e a cultivar Italiana “Tonda di Giffoni”, foram as que menos variabilidade apresentaram, sempre com teores elevados de α -tocoferol.

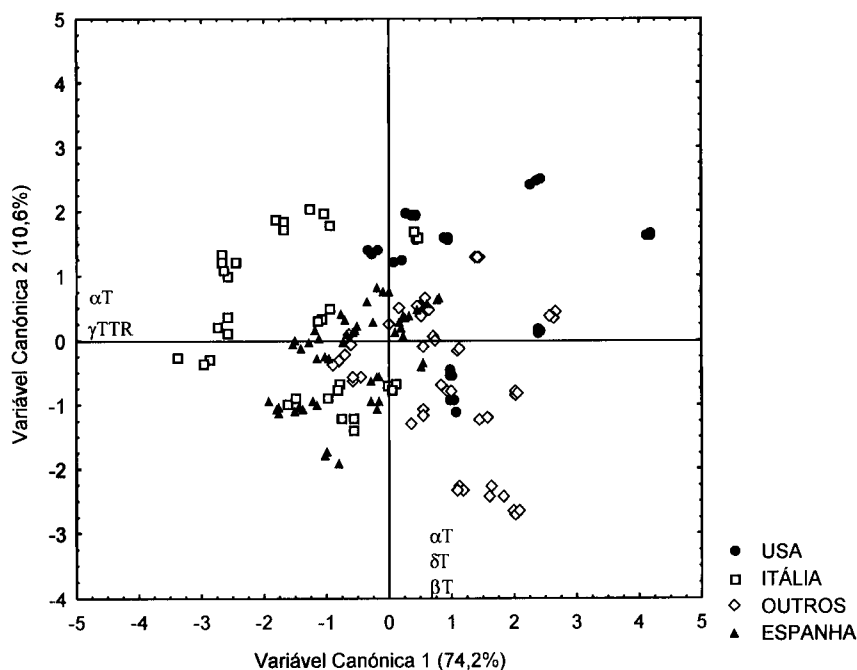


FIGURA 6.7. Resultados da CVA relativos aos resultados da composição em tococromanois da avelã, tendo a origem das cultivares como factor agrupante. α -T: α -Tocoferol, γ -TTR: γ -Tocotrienol; δ -T: δ -Tocoferol; β -T: β -Tocoferol.

6.4.2 Nogueira

Após desenvolvimento e validação do método, procedeu-se à aplicação do mesmo a um total de 26 amostras, correspondentes a três anos, duas localidades geográficas e nove cultivares diferentes. Todas as amostras apresentaram um perfil qualitativo similar, tendo sido identificados 5 vitâmeros: α -, β -, γ - e δ - tocoferóis e γ -tocotrienol. A Figura 6.8 mostra um cromatograma obtido para uma amostra de noz, utilizando as condições experimentais anteriormente descritas.

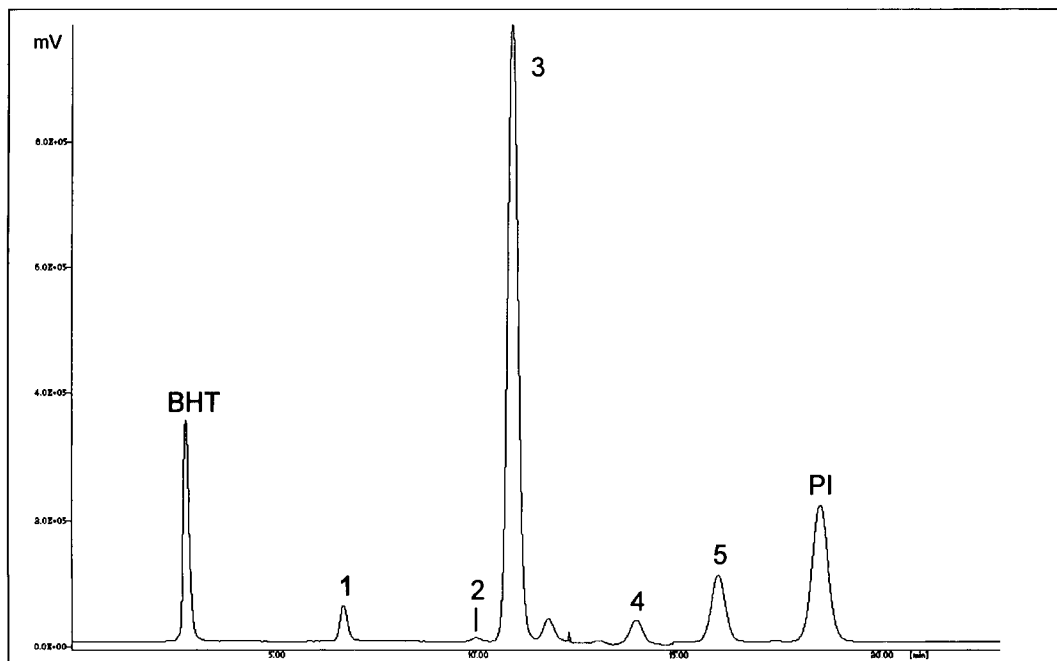


FIGURA 6.8. Cromatograma representativo do perfil em tocoferóis e tocotrienóis de uma amostra de noz. BHT: butil-hidroxitolueno; 1: α -tocoferol; 2: β -tocoferol; 3: γ -tocoferol; 4: γ -tocotrienol; 5: δ -tocoferol; PI: padrão interno (tocol).

A Tabela 6.11 apresenta os valores médios de cada vitâmero e respectivos desvios padrão, obtidos para cada cultivar, ano de produção e origem geográfica. Como se pode constatar, em todas as amostra estudadas, o γ -tocoferol foi o vitâmero predominante, com valores compreendidos entre 172,6 e 262,0 mg/kg. As amostras apresentaram ainda valores consideráveis de α - e δ -tocoferóis, cujos valores foram idênticos entre si, variando entre 8,7 e 16,6 mg/kg e entre 8,2 e 16,9 mg/kg, respectivamente.

Como anteriormente referido, encontram-se disponíveis na literatura alguns estudos relativos à composição em tocoferóis de nozes. Os trabalhos consultados apresentam em comum o facto de se basearem em metodologias de RP-HPLC, as quais, como foi já referido, apresentam a desvantagem de não permitir a separação dos homólogos β e γ .

TABELA 6.11. Composição em tocoferóis e tocotrienóis (mg/kg noz) das cultivares estudadas, por ano de produção e localização geográfica.

| | Tocoferóis e Tocotrienóis | | | | | Total |
|------------------|---------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|---------------|
| | α -Tocoferol | β -Tocoferol | γ -Tocoferol | γ -Tocotrienol | δ -Tocoferol | |
| Ano: 2001 | | | | | | |
| Bragança | | | | | | |
| Franquette | 14,36 ± 0,42 | 1,46 ± 0,05 | 261,60 ± 4,62 | 2,57 ± 0,06 | 16,91 ± 0,14 | 296,90 |
| Lara | 15,76 ± 0,14 | 1,82 ± 0,03 | 208,13 ± 0,55 | 3,16 ± 0,04 | 12,98 ± 0,04 | 241,85 |
| Marbot | 12,65 ± 0,04 | 0,90 ± 0,03 | 262,01 ± 0,91 | 2,69 ± 0,02 | 13,05 ± 5,13 | 291,31 |
| Mayette | 11,98 ± 0,06 | 0,85 ± 0,03 | 258,62 ± 0,96 | 2,39 ± 0,04 | 12,82 ± 0,29 | 286,65 |
| Mellanaise | 10,42 ± 0,00 | 1,07 ± 0,02 | 229,87 ± 0,22 | 2,60 ± 0,09 | 15,17 ± 0,05 | 259,14 |
| Parisienne | 16,55 ± 0,26 | 1,13 ± 0,03 | 252,68 ± 2,17 | 2,91 ± 0,02 | 16,78 ± 0,08 | 290,04 |
| Média | 13,62 | 1,21 | 245,49 | 2,72 | 14,62 | 277,65 |
| Varição | 10,42 - 16,55 | 0,85 - 1,82 | 208,13 - 262,01 | 2,39 - 3,16 | 12,82 - 16,91 | 241,9 - 296,9 |
| Ano: 2002 | | | | | | |
| Bragança | | | | | | |
| Franquette | 12,50 ± 0,05 | 1,08 ± 0,05 | 240,89 ± 1,81 | 3,36 ± 0,09 | 13,20 ± 0,14 | 271,03 |
| Lara | 11,44 ± 0,66 | 0,84 ± 0,05 | 229,93 ± 6,90 | 3,28 ± 0,08 | 11,01 ± 0,43 | 256,50 |
| Marbot | 10,77 ± 0,14 | 0,89 ± 0,04 | 255,01 ± 4,99 | 3,18 ± 0,09 | 13,62 ± 0,35 | 283,46 |
| Mayette | 11,33 ± 0,35 | 0,86 ± 0,06 | 213,24 ± 5,23 | 3,33 ± 0,07 | 12,19 ± 0,31 | 240,95 |
| Mellanaise | 10,53 ± 0,03 | 0,78 ± 0,02 | 213,87 ± 1,09 | 3,07 ± 0,09 | 10,38 ± 0,06 | 238,63 |
| Parisienne | 13,26 ± 0,19 | 0,89 ± 0,05 | 214,22 ± 2,80 | 2,46 ± 0,08 | 12,20 ± 0,14 | 243,04 |
| Média | 11,64 | 0,89 | 227,86 | 3,11 | 12,10 | 255,60 |
| Varição | 10,53 - 13,26 | 0,78 - 1,08 | 213,24 - 255,01 | 2,46 - 3,36 | 10,38 - 13,62 | 238,6 - 283,5 |
| Ano: 2003 | | | | | | |
| Bragança | | | | | | |
| Franquette | 8,96 ± 0,03 | 0,88 ± 0,01 | 189,85 ± 3,05 | 2,38 ± 0,06 | 9,43 ± 0,16 | 211,51 |
| Lara | 13,25 ± 0,48 | 1,56 ± 0,09 | 229,79 ± 6,88 | 3,79 ± 0,14 | 13,09 ± 0,39 | 261,47 |
| Marbot | 10,36 ± 0,08 | 0,83 ± 0,03 | 197,24 ± 1,52 | 2,83 ± 0,01 | 8,24 ± 0,12 | 219,51 |
| Mayette | 13,02 ± 0,16 | 1,16 ± 0,03 | 200,77 ± 1,95 | 2,30 ± 0,06 | 11,38 ± 0,05 | 228,63 |
| Mellanaise | 8,69 ± 0,36 | 0,60 ± 0,04 | 204,17 ± 9,22 | 3,19 ± 0,15 | 8,61 ± 0,34 | 225,26 |
| Parisienne | 11,44 ± 0,15 | 0,76 ± 0,03 | 213,94 ± 3,01 | 2,25 ± 0,02 | 11,21 ± 0,16 | 239,59 |
| Média | 10,95 | 0,97 | 205,96 | 2,79 | 10,33 | 231,00 |
| Varição | 8,69 - 13,25 | 0,60 - 1,56 | 189,85 - 229,79 | 2,25 - 3,79 | 8,24 - 13,09 | 211,5 - 261,5 |
| Coimbra | | | | | | |
| Arco | 13,75 ± 0,42 | 1,26 ± 0,04 | 209,69 ± 5,97 | 4,16 ± 0,14 | 9,43 ± 0,32 | 238,29 |
| Franquette | 10,16 ± 0,07 | 0,73 ± 0,02 | 191,01 ± 0,51 | 2,48 ± 0,00 | 8,68 ± 0,02 | 213,05 |
| Hartley | 16,77 ± 0,63 | 1,21 ± 0,07 | 204,96 ± 7,95 | 3,63 ± 0,06 | 9,79 ± 0,39 | 236,37 |
| Lara | 13,54 ± 0,12 | 1,57 ± 0,04 | 193,74 ± 3,02 | 3,79 ± 0,11 | 10,37 ± 0,17 | 223,00 |
| Mayette | 15,55 ± 0,52 | 1,37 ± 0,06 | 247,99 ± 8,45 | 5,14 ± 0,14 | 15,57 ± 0,29 | 285,62 |
| Mellanaise | 9,43 ± 0,39 | 0,99 ± 0,04 | 172,58 ± 5,71 | 2,10 ± 0,06 | 8,90 ± 0,32 | 194,00 |
| Parisienne | 11,84 ± 0,18 | 0,91 ± 0,04 | 210,27 ± 4,36 | 3,71 ± 0,09 | 12,19 ± 0,34 | 238,92 |
| Rego | 14,02 ± 0,32 | 1,45 ± 0,06 | 239,98 ± 5,31 | 3,13 ± 0,11 | 14,80 ± 0,38 | 273,38 |
| Média | 13,13 | 1,19 | 208,78 | 3,52 | 11,22 | 237,83 |
| Varição | 9,43 - 16,77 | 0,73 - 1,57 | 172,58 - 247,99 | 2,10 - 5,14 | 8,68 - 15,57 | 194,0 - 285,6 |

Valores expressos como média ± desvio padrão de três determinações para cada amostra.

Embora existam algumas similaridades entre os valores agora obtidos e os registados na literatura, existem também diferenças, em grande parte devidas às diferentes metodologias aplicadas, mas que poderão estar também relacionadas com factores genéticos e edafo-climáticos. Lavendrine e colaboradores (1997) quantificaram três vitâmeros (α -, γ - e δ - tocoferóis) utilizando uma metodologia de RP-HPLC/UV. Os autores referiram nesse trabalho que a não separação dos vitâmeros β - e γ - tocoferóis não seria um inconveniente devido à ausência do primeiro nas nozes. No entanto, no trabalho decorrente desta tese confirmou-se a presença de β - tocoferol na matriz noz, ainda que em pequenas quantidades (entre 0,60 e 1,82 mg/kg), o que leva a supor que no trabalho de Lavendrine *et al.* (1997) muito provavelmente o pico quantificado como γ - tocoferol correspondesse à soma dos vitâmeros β e γ . O estudo referido incidiu sobre duas cultivares (Franquette e Hartley) também estudadas neste trabalho. Apesar das diferenças de metodologia apontadas, foram obtidos resultados globais similares para a cultivar Franquette; os valores obtidos para a cultivar Hartley foram ligeiramente inferiores aos referidos por Lavendrine e colaboradores, o que pode ser imputado a diferenças de localização geográfica e condições edafo-climáticas das amostras. Comparativamente aos valores apresentados na Tabela 6.11, Delgado-Zamarreño *et al.* (2001, 2004) obtiveram valores superiores de δ - tocoferol, mas inferiores de γ - tocoferol; o teor em α - tocoferol descrito no presente trabalho (13,0 mg/kg, valor médio) é superior ao descrito em 2001 por Delgado-Zamarreño e colaboradores (7,9 mg/kg), mas inferior ao descrito em 2004 pelos mesmos autores (26,0 mg/kg). Devido à utilização de uma metodologia de RP-HPLC em ambos os trabalhos realizados, Delgado-Zamarreño e colaboradores (2001 e 2004) procederam à quantificação conjunta dos vitâmeros β e γ como sendo γ - tocoferol. Assim mesmo, os valores de γ - tocoferol referidos por estes autores foram inferiores aos descritos na Tabela 6.11. Uma vez que em ambos os trabalhos de Delgado-Zamarreño *et al.* (2001, 2004) não são referidos quaisquer dados relativos à cultivar utilizada ou à proveniência das amostras, não é possível tentar explicar as diferenças acima mencionadas.

Relativamente à composição em tocotrienóis, apenas foi detectado o vitâmero γ - tocotrienol (entre 2,1 e 5,1 mg/kg), o qual, tanto quanto é dado saber, foi pela primeira vez descrito nas nozes.

No que diz respeito ao total em tocoferóis, os valores das amostras analisadas variaram entre 191,9 e 294,3 mg/kg. Comparativamente a estes valores, algumas tabelas de composição de alimentos apresentam valores largamente inferiores (38 mg/kg) (Holland *et al.*, 1991) ou superiores (309 a 455 mg/kg) (Firestone e Reina, 1996), o que poderá ser devido ao facto de no último caso os valores se referirem a kg de óleo, e de muito provavelmente, no primeiro caso estes valores serem fundamentados em dados relativamente antigos e escassos. No entanto, os valores apresentados na Tabela 6.11 são

coerentes com os valores actualizados da base de dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA Nutrient Database, 2005) para os tocoferóis α , β , γ e δ (7,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 208,3 mg/kg e 18,9 mg/kg, respectivamente), não sendo feita qualquer referência aos tocotrienóis.

De forma a avaliar a existência, ou não, de diferenças relativamente à composição em vitamina E das amostras analisadas, procedeu-se à análise estatística dos dados obtidos. Para tal, realizou-se uma PCA com o objectivo de organizar a informação, tendo-se seleccionado três componentes de forma a eliminar a informação não importante dos dados. Estes três componentes representaram mais de 90% da informação inicial e a informação de cada vitâmero organizada nos mesmos excedeu sempre 85%. Seguidamente realizou-se uma CVA com base nas três componentes principais seleccionadas, permitindo a subsequente realização de um “biplot preditivo” (Figura 6.9) (Bray e Maxwell, 1985; Oliveira *et al.*, 2001; Alves e Oliveira, 2003; Alves e Oliveira, 2004). Em vez de atribuir um significado às variáveis canónicas em termos dos componentes principais utilizados, este “biplot preditivo” relaciona a posição de qualquer ponto representativo de uma amostra directamente com os compostos e os respectivos valores originais.

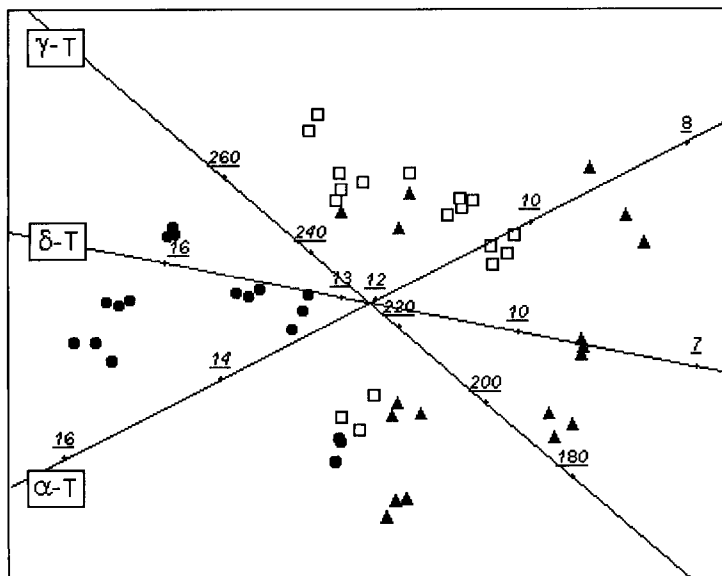


FIGURA 6.9. Resultados da análise estatística multivariada relativa à composição em tococromanóis, tendo o ano de produção como factor agrupante. Os valores sublinhados correspondem a valores da escala. α -T: α -tocoferol; β -T: β -tocoferol; γ -T: γ -tocoferol. Símbolos: ●: 2001; □: 2002; ▲: 2003.

Na Figura 6.9, constata-se que existe uma distinção moderada entre os três anos, sendo que o α -, γ - e δ -tocoferóis foram os vitâmeros mais importantes na discriminação dos diferentes anos de produção estudados. Apesar da maioria das amostras de 2001 e 2002 apresentarem valores de γ -tocoferol entre 210 e 260 mg/kg, estes dois anos diferenciaram-se

tendo em conta os valores de α - e δ -tocoferóis; 2003 diferenciou-se destes últimos principalmente devido aos teores de γ -tocoferol, apresentando, para a generalidade das amostras estudadas, valores entre 190 e 220 mg/kg.

Estes resultados sugerem que as condições climáticas poderão influenciar a composição em vitamina E das nozes, uma vez que, considerando as mesmas seis cultivares, provenientes do mesmo campo e sujeitas a práticas agrícolas idênticas, se observam diferenças significativas entre os anos de produção estudados.

De forma a avaliar se a composição em vitamina E pode ser útil na discriminação de cultivares, realizou-se uma abordagem ligeiramente diferente, devido ao facto do número de cultivares em estudo exceder o número de vitâmeros e de o número de amostras por cultivar ser relativamente pequeno. Com a aplicação de testes MANOVA directamente aos dados iniciais verificaram-se diferenças entre as cultivares, tendo-se depois efectuado testes Hotelling T^2 de modo a fazer comparações entre pares de cultivares e determinar quais as cultivares diferentes em termos da composição de tocoferóis e tocotrienóis. Os resultados apresentados na Tabela 6.12 mostram a existência de diferenças significativas entre as cultivares [à excepção dos pares Melanaise/Marbot ($F_{obs} = 6,92$) e Mayette/Marbot ($F_{obs} = 7,54$)], relacionando-se essas diferenças sobretudo com os teores de α -tocoferol e γ -tocotrienol.

TABELA 6.12. Resultados dos testes Hotelling T^2 relativos à existência de diferenças entre pares de cultivares e dos testes t -Student relativos à significância das diferenças entre pares de cultivares para cada vitâmero.

| | Franquette | Mayette | Marbot | Lara | Mellanaise | Parisienne |
|-------------------|-------------------|----------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Franquette | ----- | γ -TTR | β -T | - | α -T; β -T | - |
| Mayette | 71,77 | ----- | α -T; γ -TTR | β -T; γ -TTR | α -T; γ -TTR | β -T; γ -TTR |
| Marbot | 79,35 | 164,19 | ----- | - | α -T | α -T; γ -TTR |
| Lara | 124,60 | 305,02 | 7,54 | ----- | α -T | - |
| Mellanaise | 596,05 | 366,28 | 6,92 | 26,03 | ----- | α -T; γ -TTR |
| Parisienne | 412,13 | 261,99 | 75,30 | 21,08 | 77,81 | ----- |

Triângulo inferior: valores de F_{obs} (Hotelling T^2), qualquer valor superior ao valor crítico $F_{(5,12)} = 8,89$ significa que as duas cultivares são significativamente diferentes ($\alpha = 0,001$). Triângulo superior: vitâmeros para os quais os valores de t_{obs} foram significantes no teste univariado da hipótese de que as médias de dois grupos são iguais; "nenhum" significa que as diferenças observadas não foram atribuídas especificamente a um vitâmero. T: tocoferol; TTR: tocotrienol

A realização de uma CVA permitiu a obtenção do gráfico apresentado na Figura 6.10, o qual permite visualizar as diferenças entre as cultivares se bem que, devido à proporção de parâmetros, grupos e dimensões significativas, se torne difícil apontar com exactidão quais as diferenças entre os seis grupos de cultivares. Na Figura 6.10 constata-se que algumas cultivares são idênticas entre si (por exemplo, as cvs. Mayette e Marbot), enquanto que outras parecem ser distintas (por exemplo, as cvs. Lara e Parisienne). Apenas os vitâmeros α -tocoferol e γ -tocotrienol revelaram ter algum poder preditivo, o que reflecte o facto das diferenças entre as cultivares não poderem ser descritas mediante uma estrutura simples de dados, e possivelmente as diferenças entre as cultivares serem explicadas com base em todas as combinações possíveis. Estes resultados estão de acordo com os obtidos através da análise univariada dos dados, descritos no parágrafo anterior.

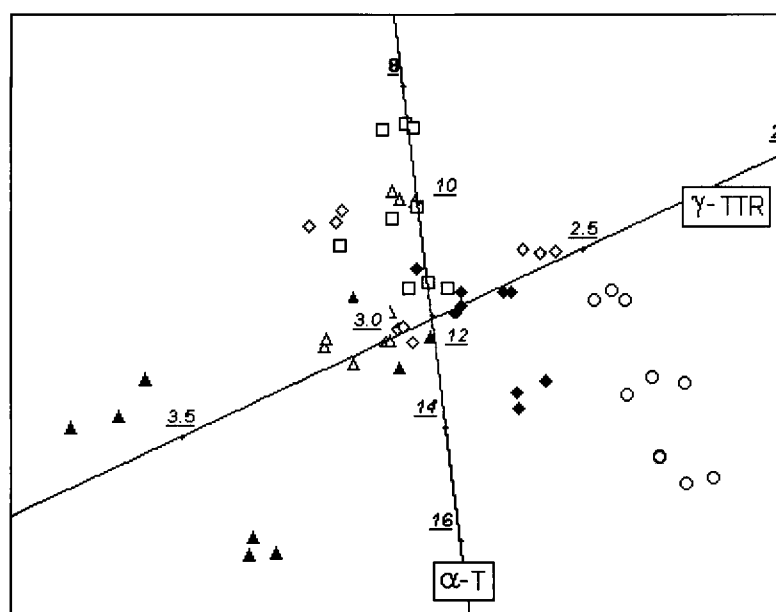


FIGURA 6.10. Resultados da análise estatística multivariada relativa à composição em tococromanois, tendo o ano de produção como factor agrupante. Os valores sublinhados correspondem a valores da escala. Símbolos: \triangle : Franquette; \blacktriangle : Lara; \diamond : Marbot; \blacklozenge : Mayette; \square : Mellanaise; \circ : Parisienne.

Em 2003, foram incluídas neste trabalho amostras provenientes de uma origem geográfica diferente (Coimbra), de forma a avaliar o efeito deste factor na composição em vitamina E das nozes. Devido à existência de apenas dois grupos (Bragança e Coimbra), as diferenças foram visualizadas apenas numa dimensão canónica (Figura 6.11). Na análise estatística efectuada apenas foram tidos em consideração os resultados obtidos para as cultivares comuns às duas localizações.

Os resultados parecem indicar diferenças significativas entre as amostras provenientes das duas localizações geográficas em termos da composição em vitamina E (Figura 6.11).

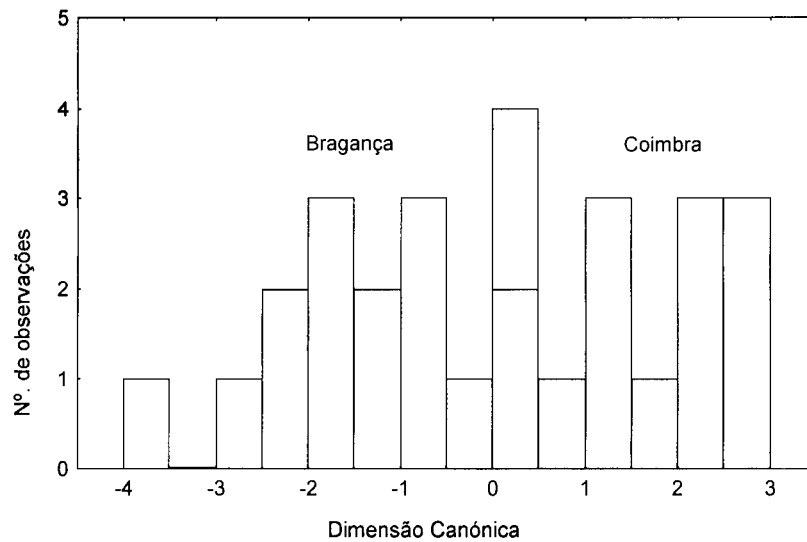


FIGURA 6.11. Resultados da análise CVA tendo a localização geográfica como factor agrupante.

7. CONCLUSÕES

Pelo que foi apresentado e discutido pode-se concluir que, relativamente à composição em Vitamina E das matrizes estudadas, existe alguma discrepância nos valores publicados na literatura. Esta discrepância dever-se-á principalmente à diversidade de metodologias analíticas utilizadas, ressaltando-se no entanto o facto de que outros factores, tais como a cultivar e a proveniência das amostras, poderão também contribuir para que tal aconteça.

Como referido, as metodologias que permitem determinar simultaneamente tocoferóis e tocotrienóis são escassas e recentes. Neste trabalho, para cada matriz foram otimizados diferentes parâmetros do método analítico, de forma a permitir a separação e quantificação simultânea de todos os vitâmeros. A utilização do detector de fluorescência permitiu a obtenção de uma elevada sensibilidade e selectividade e a utilização do DAD permitiu a confirmação da identidade dos compostos pela análise dos espectros.

Considerando as diferentes potências, actividades biológicas e seus potenciais efeitos benéficos actualmente descritos para os vários compostos analisados (apesar de novos estudos neste âmbito continuarem a ser delineados e, por conseguinte, em breve novos conhecimentos sobre a actividade destes compostos poderem vir a ser divulgados), o conhecimento de dados quantitativos sobre a composição dos alimentos nestes compostos adquire um papel cada vez mais importante quando se pretende estimar o valor potencial de um dado alimento no que respeita aos seus benefícios para a saúde. De igual forma, o conhecimento do seu perfil qualitativo e quantitativo nos alimentos é cada vez mais relevante no que diz respeito à realização de estudos epidemiológicos e clínicos. Para este propósito, o trabalho descrito neste capítulo representa uma contribuição para a caracterização em

termos químicos das sementes edíveis de ambas as espécies, uma vez que permite a determinação simultânea de todos os vitâmeros num curto espaço de tempo.

Sabendo-se actualmente que a composição química dos alimentos pode ser afectada por diversos factores, procurou-se com este trabalho elucidar as possíveis contribuições da cultivar, ano de produção e localização geográfica, para a variabilidade da composição em tococromanóis. Apesar dos dados serem ainda escassos para que possam ser tiradas conclusões definitivas, constituem de alguma forma, pelo número de amostras estudadas, uma contribuição para a definição de um perfil qualitativo e quantitativo, em termos da composição de tocoferóis e tocotrienóis da avelã e da noz. Relativamente às amostras estudadas, após aplicação da análise estatística aos resultados obtidos, verificou-se que:

- No que concerne a espécie avelleira, para a generalidade das amostras, foram obtidos resultados idênticos nos três anos em estudo. De igual forma, o factor localização geográfica pareceu não influenciar de forma significativa os valores obtidos. Os resultados obtidos apontam no sentido da fraca (ou até mesmo nula) influência de factores edafo-climáticos. Os resultados sugerem no entanto que factores genéticos podem influenciar a composição em Vitamina E das avelãs.
- No que concerne à espécie noqueira, os resultados obtidos sugerem que a sua composição em tococromanóis pode sofrer influências moderadas de factores genéticos, edafo-climáticos e geográficos.

Uma vez que a literatura aponta estes compostos, tocoferóis e tocotrienóis, como parâmetros úteis na detecção de adulterações de azeites com óleo de avelã, ao representar uma contribuição na caracterização da composição química das sementes de avelleira, este trabalho poderá também representar uma contribuição para futuros trabalhos de avaliação de autenticidade de azeites.

Por último, refira-se que os resultados obtidos confirmam que as avelãs e as nozes são respectivamente uma boa fonte de α -tocoferol e de γ -tocoferol e que, apesar de em menor quantidade, o consumo de ambos os frutos secos fornece ainda outros tocoferóis e tocotrienóis.

CAPÍTULO 7

TORRA DE AVELÃ

I – TORRA. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

O processamento térmico é realizado em diversos alimentos, frequentemente com objectivos diferentes, nomeadamente a obtenção de um leque variado de aromas, sabores e texturas, a destruição de microrganismos, toxinas e alérgenos, ou a inactivação de enzimas. Alguns processamentos térmicos são realizados preferencialmente a nível industrial, tais como a pasteurização e a esterilização; outros podem ser realizados quer industrialmente quer a nível doméstico, tais como a torra e a cozedura no forno (principalmente associado à padaria e pastelaria), e outros ainda, são tipicamente operações caseiras tais como cozer em água, assar e grelhar. A utilização de microondas é, actualmente, uma técnica muito utilizada para levar a cabo a maioria dos processamentos referidos. Sendo a energia transferida na forma de ondas, verifica-se um grande poder de penetração nos alimentos, os quais ficam expostos a elevadas temperaturas por um período de tempo mais curto. Esta técnica tem adquirido cada vez mais importância a nível industrial, uma vez que apresenta algumas vantagens comparativamente aos processos térmicos convencionais, tais como rapidez, eficiência energética e maior precisão nos processos de controlo. A nível doméstico, pela sua rapidez, facilidade de utilização e limpeza, os fornos microondas são cada vez utilizados, não só para reaquecer como para cozinhar.

Qualquer que seja o processamento térmico realizado, regra geral associa-se este tipo de operações à perda de determinados compostos bioactivos, ou à diminuição da sua actividade ou biodisponibilidade. Na verdade, devido à sua termosensibilidade, é frequente associar a utilização de temperaturas elevadas à redução de teores de vitamina E nos alimentos. No entanto, dados actuais, como posteriormente será referido com mais detalhe, indicam que, dependendo das matrizes e dos tratamentos térmicos aplicados, podem ser obtidos resultados finais positivos em termos do teor em vitamina E.

A torra é um processo geralmente realizado com o principal objectivo de modificar as características sensoriais do alimento, sendo estas modificações maioritariamente determinadas pela sua composição química (teores em água, gordura, proteína e hidratos de carbono), mas também pela presença de oxigénio e pelas temperaturas e tempos de torra utilizados (Fellows, 2000). Ao mesmo tempo, como já referido, outros objectivos como a diminuição da humidade, a destruição de microrganismos e a inactivação de determinadas enzimas é também alcançada, contribuindo para a preservação e segurança do alimento.

Como referido no Capítulo 2 desta dissertação (Sementes de avelã e de noz – Introdução Geral, páginas 74-76), a avelã é frequentemente consumida a nível mundial, representando um produto de grande importância económica, não só para os países produtores como também para as indústrias transformadoras, geralmente localizadas nos países consumidores.

A avelã é utilizada como ingrediente na produção de uma grande variedade de produtos tais como bolos, cereais, “snacks”, gelados, cremes para barrar e numa diversidade imensa de chocolates. De facto, estima-se que apenas uma pequena parte (8 a 10%) do total de avelãs produzidas mundialmente seja consumida na sua forma original, isto é, como fruto seco (Ozdemir e Akinci, 2004), sendo a grande maioria utilizada após torrefacção. Para além dos objectivos já apontados, no caso específico da avelã, a torra tem ainda a importante função de facilitar a remoção da película que envolve a semente (Fellows, 2000; Ozdemir e Akinci, 2004).

O processo de torra, não só da avelã como de outros alimentos, é muitas vezes conduzido empiricamente, com base nos conhecimentos adquiridos com a experiência do dia-a-dia, utilizando frequentemente a cor ou a aparência final do produto como indicadores do “*terminus*” do processo. No entanto, a nível industrial assiste-se cada vez mais a uma demanda de maior precisão e controlo de procedimentos, o que requer um conhecimento mais detalhado dos processos envolvidos. Recentemente, têm sido levados a cabo vários trabalhos relativos ao estudo de diversos parâmetros de torra nas mais diversas matrizes. Também a optimização das condições de torra da avelã, através da avaliação da cinética do processo de mudança da cor (Demir *et al.*, 2002; Ozdemir e Devres, 2000), da temperatura (Demir *et al.*, 2003), da humidade e características de desidratação (Ozdemir e Devres, 1999), da estabilidade oxidativa, das características sensoriais e das alterações microestruturais (Saklar *et al.*, 2003), se encontram extensamente descritas na literatura. Pelo contrário, são escassos os estudos relativos à influência da torra nas mudanças da composição química e efeitos a nível do valor nutricional da avelã. Langourieux *et al.* (2000) estudaram a influência de diferentes parâmetros de torra nos compostos voláteis associados ao aroma da avelã torrada e Alasalvar *et al.* (2003b) compararam a composição em compostos voláteis da avelã crua e torrada. Ozdemir *et al.*, (2001b) avaliaram os efeitos da torra relativamente à composição em aminoácidos e aos teores de tiamina, riboflavina, péroxidos e ácidos gordos livres. Kirbaslar e Erkmen (2003) determinaram os efeitos da torra relativamente à composição em ácidos gordos e ao teor em humidade, gordura, proteína, hidratos de carbono totais, açúcar total e amido.

Apesar da fracção lipídica representar a componente maioritária das avelãs (aproximadamente 60%), o seu comportamento face ao processamento térmico e possíveis subsequentes efeitos no seu valor nutricional foi até ao momento, tanto quanto se sabe, alvo de escassos estudos. Esta fracção, para além de apresentar uma quantidade elevada de ácidos gordos insaturados, é também rica noutros compostos potencialmente benéficos para a saúde, tais como os já mencionados fitosteróis e vitamina E. Pelo contrário, durante o processo de torra é provável que ocorra a formação de ácidos gordos *trans*, os quais, segundo alguns autores, poderão aumentar o risco de ocorrência de doenças cardiovasculares (Oomen *et al.*, 2001), sendo neste caso prejudiciais à saúde humana.

Segundo o que se encontra descrito na literatura, o tratamento térmico pode provocar diferentes efeitos no teor em vitamina E, dependendo da natureza dos alimentos. No geral, podem considerar-se dois grandes grupos: aqueles em que o teor final em vitamina E é menor do que o original, e aqueles em que os alimentos apresentam teores superiores em vitamina E, após termicamente processados. No primeiro caso as perdas estão, regra geral, associadas à maior ou menor degradação dos diferentes vitâmeros. O segundo caso justifica-se pela obtenção de um melhor rendimento de extracção da fracção lipídica induzido pelo processamento térmico e, conseqüentemente, da vitamina E. Por outro lado, foi sugerido que, para algumas matrizes, uma quantidade significativa de vitâmeros poderá estar envolvida em ligações com outros compostos, ligações estas que seriam quebradas devido à utilização de temperaturas de processamento elevadas, aumentando desta forma a quantidade extraída dos referidos vitâmeros.

Com o propósito de estudar a influência do processamento térmico, nomeadamente a torra, no valor nutricional da fracção lipídica das avelãs, estudou-se a composição em ácidos gordos, com especial ênfase nos AG *trans*, em TAG, fitosteróis, tocoferóis e tocotrienóis, de avelãs cruas e submetidas a torras com diferentes intensidades.

II – TORRA. PARTE EXPERIMENTAL

1. AMOSTRAS

Uma amostra de aproximadamente 3 kg de avelãs sem casca foi fornecida pela indústria transformadora Transagri Lda., localizada em Mangualde, Portugal. Pela observação do tamanho e da forma das avelãs, verificou-se que a amostra era composta por uma mistura de duas a três cultivares de avelãs. Segundo informações fornecidas, apesar de não ser possível confirmar a identidade das cultivares, a cultivar mais abundante seria muito provavelmente a cultivar de origem espanhola, Negreta. A amostra fornecida foi retirada aleatoriamente de um lote de 50 kg. As condições preferencialmente utilizadas na torra de avelã na referida indústria (145 °C, 15 min) foram reproduzidas à escala laboratorial. Para além destas condições, foram igualmente testadas as seguintes: 125 °C, 15 min; 125 °C, 30 min; 165 °C, 15 min; 165 °C, 30 min; 185 °C, 15 min e 200 °C, 5min. As diversas torras foram realizadas numa estufa de ar forçado (WTC, Tuttlinger, Germany).

2. REAGENTES E PADRÕES

Foram utilizados os reagentes e padrões enumerados nos capítulos anteriores (ver Capítulos 3, 4, 5 e 6).

3. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A preparação das amostras para determinação dos teores de humidade e de gordura total, e das composições em AG, TAG, fitosteróis, tocoferóis e tocotrienóis foi feita de acordo com o descrito nos Capítulos 3, 4, 5 e 6.

4. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

As diferentes análises cromatográficas foram realizadas com os sistemas cromatográficos e condições analíticas descritas nos Capítulos 3, 4, 5 e 6, respectivamente no que respeita a AG, TAG, fitosteróis, tocoferóis e tocotrienóis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de humidade e de gordura total (calculado em peso seco) das amostras de avelã crua e das avelãs sujeitas a diferentes torras, é apresentado na Tabela 7.1. Como esperado, quanto mais elevada a temperatura e/ou o tempo de torra, maior a perda de água verificada. Apesar das diferentes condições de torra implicarem, na generalidade, uma maior quantidade de óleo extraída, este incremento não foi significativo ($p > 0,05$). O acréscimo deveu-se, muito provavelmente, a uma melhor extractibilidade, causada por um aumento de danos a nível das membranas (Langourieux *et al.*, 2000) e um aumento da desnaturação de proteínas (Mohamed e Awatif, 1998; Lee *et al.*, 2004).

TABELA 7.1. Efeito da torra no teor de humidade (%) e gordura (% em peso seco) das amostras estudadas.

| | Humidade (%) | Gordura (%) | Cor |
|----------------|--------------|-------------|------------------------|
| Crú | 5,0 ± 0,4 | 68,3 ± 0,7 | amarelo pálido |
| 125 °C/ 15 min | 1,9 ± 0,1 | 68,4 ± 1,6 | amarelo pálido/amarelo |
| 125 °C/ 30 min | 1,6 ± 0,0 | 70,2 ± 0,1 | amarelo |
| 145 °C/ 15 min | 1,6 ± 0,0 | 70,0 ± 0,8 | amarelo/dourado |
| 165 °C/ 15 min | 1,5 ± 0,0 | 68,5 ± 0,7 | amarelo/dourado |
| 165 °C/ 30 min | 1,2 ± 0,1 | 70,7 ± 1,4 | castanho |
| 185 °C/ 15 min | 1,0 ± 0,1 | 70,8 ± 1,9 | castanho escuro |
| 200 °C/ 5 min | 1,4 ± 0,1 | 69,4 ± 0,8 | castanho |

Média ± desvio padrão de três determinações.

Visualmente observou-se um desenvolvimento marcado da cor com a torra, de amarelo pálido a castanho. A cor é aqui referida apenas como ponto de referência da intensidade de torra. Segundo a literatura (Lee *et al.*, 2004; Pokorný, 2001; Pokorný, 2003) esta mudança de

cor deve-se à formação de substâncias de cor acastanhada originadas por reacções de Maillard entre açúcares redutores e aminoácidos livres ou amidas. Verificou-se igualmente que com o aumento da intensidade da torra, se tornava mais fácil a remoção da película que envolve a avelã.

Uma vez que a torra da avelã é normalmente efectuada a altas temperaturas e a pressão normal (isto é, na presença do oxigénio atmosférico) existe uma maior probabilidade de ocorrência de fenómenos de oxidação, que se traduzem na diminuição do valor nutricional da avelã. Porque a composição em AG, e neste caso específico, a formação de isómeros *trans*, pode ser um bom indicador da estabilidade do óleo e de possíveis alterações sofridas, procedeu-se à comparação da composição em ácidos gordos das avelãs cruas e torradas. Em todas as amostras, cruas ou torradas, foram identificados 14 AG; em todas elas, o ácido oleico foi o composto maioritário (77,9 a 82,1%), seguindo-se o ácido linoleico (10,0 a 13,8%), palmítico (5,0 a 5,5%) e esteárico (1,7 a 2,3%). Como se pode constatar pela observação da Tabela 7.2, com o aumento do tempo de exposição e temperatura da torra observaram-se ligeiras diferenças relativamente à percentagem relativa dos diferentes AG.

No geral, verificou-se um aumento relativo dos teores de AG saturados e monoinsaturados (verificado sobretudo a nível do ácido oleico) e uma diminuição do teor em polinsaturados (verificado sobretudo a nível do ácido linoleico). Segundo Yoshida *et al.* (2003) as velocidades de oxidação dos ésteres dos ácidos oléico, linoleico e linolénico apresentam, respectivamente, a seguinte relação 1:10:20. De facto, verifica-se que, quanto maior o número de ligações duplas existentes na molécula de AG, maior é a velocidade de oxidação do mesmo, o que explica as ligeiras diferenças encontradas entre a amostra crua e as submetidas a processos de torra. Teoricamente, o ácido linolénico seria aquele mais sujeito a sofrer isomerização e/ou degradação, sendo por isso um bom indicador de processamento térmico (Alves *et al.*, 2003). No entanto, devido aos teores extremamente baixos de ácido linolénico na avelã (inferiores a 0,1%) os níveis de isómeros *trans*, formados em consequência do processo de torra, serão ínfimos, não sendo por isso passíveis de serem detectados. Comparando individualmente cada processo de torra com a amostra crua, constata-se duas excepções ao comportamento global descrito: as torras efectuada a 165 °C e a 185 °C, ambas durante 15 min. A composição em AG da amostra torrada a 165 °C é similar à determinada para a amostra crua, provavelmente devido a idênticas velocidades de degradação dos ácidos oleico e linoleico. Relativamente à amostra torrada a 185 °C, comparativamente com a amostra crua, esta apresenta níveis superiores de ácido oleico e inferiores de linoleico e de AG saturados; dado que as avelãs apresentam na sua composição teores muito superiores de ácido oleico do que de linoleico, provavelmente a esta elevada temperatura a quantidade de ácido oleico afectada será maior, levando a uma diminuição da sua percentagem relativa e, conseqüentemente, ao aumento das percentagens relativas de ácidos gordos saturados e polinsaturados. Um comportamento

semelhante ao descrito foi observado por Crews *et al.* (2005a). O autor concluiu que, para a generalidade das amostras, não se verificaram diferenças significativas na composição em AG dos óleos obtidos após a torra das avelãs a 165 °C durante 30 min; no entanto, uma das amostras testadas apresentou um ligeiro aumento da percentagem dos ácidos palmítico e linoleico, e uma diminuição do ácido oleico. Os resultados obtidos são igualmente consistentes com dados publicados referentes a outros alimentos, igualmente sujeitos a processamento térmico: em rebentos de soja torrados verificou-se o aumento das percentagens de ácido palmítico, esteárico e oleico e a diminuição de ácido linoleico e linolénico, com o aumento do tempo de torra (Yoshida *et al.*, 2000a); em amendoins torrados em microondas, Megahed (2001) descreveu o aumento simultâneo de ácido palmítico e decréscimo dos ácidos linoleico, linolénico e oleico enquanto que Yoshida *et al.* (2003) descreveram aumento dos ácidos palmítico e oleico e um decréscimo de ácido linoleico; em sementes de girassol, verificou-se que um aumento das percentagens de ácidos oleico e palmítico e diminuição da percentagem de ácido linoleico, com o aumento do tempo de torra (Yoshida *et al.*, 2002).

Relativamente à presença de AG *trans*, as amostras torradas apresentaram apenas um ligeiro aumento comparativamente à amostra controlo, o que reforça a ideia de que as alterações a nível da composição em AG não foram relevantes. Apesar de alguns autores sugerirem a existência de possíveis efeitos perniciosos para a saúde associados ao consumo de AG *trans* (Oomen *et al.*, 2001), outros defendem que tendo em conta os teores actualmente ingeridos, os AG *trans* da dieta não colocam qualquer problema de saúde pública (Kritchevsky, 1997). Uma vez que parece não haver consenso relativamente a esta matéria, torna-se imperioso realizar mais estudos de modo a que a associação feita entre o consumo destes compostos e efeitos negativos para a saúde seja comprovada ou refutada. De qualquer forma, a presença de AG *trans* nas avelãs torradas não levanta qualquer preocupação uma vez que estes compostos existem em percentagens diminutas (<0,1% do total de AG), o que muito provavelmente terá um impacto desprezável no valor nutricional destes alimentos.

Uma vez que em estudos realizados com outras matrizes submetidas a processamento térmico se verificaram diferenças em termos da composição em TAG (Yoshida *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 2000a; Yoshida *et al.*, 2000b; Yoshida *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2003), procedeu-se à determinação destes compostos nas avelãs. Na Tabela 7.3 apresenta-se as percentagens relativas de cada TAG obtidas para as avelãs cruas e submetidas às diferentes torradas. Foram determinados 11 TAG, o que está de acordo com os resultados obtidos para as diversas variedades estudadas.

TABELA 7.2. Efeito da torra na composição em ácidos gordos (% relativa).

| Amostra | Ácidos gordos | | | | | | | | | | | | | | | | SFA MUFA PUFA |
|---------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|-------|---------------|
| | C14:0 | C16:0 | C16:1n7c | C17:0 | C17:1n7 | C18:0 | C18:1n9t | C18:1n9c | C18:2n6cc | C20:0 | C20:1n9 | C18:3n3c | C22:0 | C22:1n9 | | | |
| Crua | 0,03 ± 0,00 | 5,02 ± 0,01 | 0,19 ± 0,00 | 0,19 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 1,89 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 79,57 ± 0,01 | 12,72 ± 0,01 | 0,18 ± 0,01 | 0,16 ± 0,00 | 0,08 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 7,33 | 80,03 | 12,80 |
| 125 °C/15 min | 0,04 ± 0,00 | 5,33 ± 0,01 | 0,20 ± 0,01 | 0,20 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 2,18 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 81,06 ± 0,02 | 10,59 ± 0,02 | 0,19 ± 0,01 | 0,16 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 7,95 | 81,55 | 10,66 |
| 125 °C/30 min | 0,04 ± 0,00 | 4,76 ± 0,01 | 0,16 ± 0,01 | 0,16 ± 0,00 | 0,06 ± 0,01 | 1,95 ± 0,00 | 0,07 ± 0,01 | 80,98 ± 0,01 | 11,47 ± 0,01 | 0,19 ± 0,02 | 0,17 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 0,02 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 | 7,11 | 81,49 | 11,54 |
| 145 °C/15 min | 0,03 ± 0,00 | 5,41 ± 0,03 | 0,22 ± 0,01 | 0,22 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 1,84 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 82,16 ± 0,05 | 9,76 ± 0,01 | 0,18 ± 0,01 | 0,16 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 7,70 | 82,68 | 9,82 |
| 165 °C/15 min | 0,03 ± 0,00 | 5,23 ± 0,04 | 0,22 ± 0,01 | 0,22 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 1,69 ± 0,01 | 0,05 ± 0,01 | 79,50 ± 0,04 | 12,69 ± 0,01 | 0,18 ± 0,01 | 0,17 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 7,38 | 80,05 | 12,76 |
| 165 °C/30 min | 0,03 ± 0,00 | 5,26 ± 0,01 | 0,19 ± 0,00 | 0,19 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 2,28 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 80,12 ± 0,01 | 11,53 ± 0,01 | 0,20 ± 0,01 | 0,15 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,04 ± 0,01 | 7,99 | 80,58 | 11,59 |
| 185 °C/15 min | 0,03 ± 0,00 | 5,51 ± 0,02 | 0,20 ± 0,00 | 0,20 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 1,97 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | 77,89 ± 0,01 | 13,77 ± 0,02 | 0,20 ± 0,01 | 0,16 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 7,94 | 78,39 | 13,84 |
| 200 °C/5 min | 0,03 ± 0,00 | 4,98 ± 0,03 | 0,18 ± 0,00 | 0,18 ± 0,00 | 0,07 ± 0,00 | 2,07 ± 0,01 | 0,01 ± 0,00 | 82,14 ± 0,09 | 10,00 ± 0,04 | 0,22 ± 0,01 | 0,16 ± 0,00 | 0,05 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 | 7,49 | 82,61 | 10,05 |

média ± desvio padrão de três determinações. Designação das amostras segundo a torra a que forma submetidas.

TABELA 7.3. Efeito da torra na composição em TAG.

| | Triacilgliceróis | | | | | | | | | | | |
|---------------|------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|--|
| | LLL | OLL | PLL | OOL | POL | PPL | OOO | POO | PPO | SOO | SPO | |
| Crua | 0,58 ± 0,02 | 4,26 ± 0,05 | 0,19 ± 0,01 | 19,96 ± 0,11 | 2,15 ± 0,05 | 0,02 ± 0,00 | 60,43 ± 0,31 | 9,82 ± 0,13 | 0,08 ± 0,01 | 2,44 ± 0,19 | 0,07 ± 0,01 | |
| 125 °C/15 min | 0,42 ± 0,02 | 3,29 ± 0,12 | 0,13 ± 0,01 | 19,21 ± 0,08 | 1,72 ± 0,05 | 0,02 ± 0,00 | 63,71 ± 0,22 | 9,20 ± 0,09 | 0,06 ± 0,00 | 2,18 ± 0,08 | 0,07 ± 0,00 | |
| 125 °C/30 min | 0,34 ± 0,02 | 2,78 ± 0,07 | 0,13 ± 0,00 | 17,42 ± 0,34 | 1,87 ± 0,03 | 0,02 ± 0,00 | 63,56 ± 0,10 | 10,46 ± 0,16 | 0,09 ± 0,00 | 3,22 ± 0,01 | 0,10 ± 0,01 | |
| 145 °C/15 min | 0,28 ± 0,01 | 2,19 ± 0,04 | 0,10 ± 0,00 | 16,49 ± 0,26 | 1,69 ± 0,03 | 0,02 ± 0,00 | 65,63 ± 0,22 | 10,81 ± 0,05 | 0,09 ± 0,00 | 2,63 ± 0,06 | 0,07 ± 0,00 | |
| 165 °C/15 min | 0,45 ± 0,03 | 3,84 ± 0,06 | 0,15 ± 0,01 | 21,05 ± 0,24 | 2,15 ± 0,02 | 0,02 ± 0,00 | 60,19 ± 0,39 | 9,77 ± 0,04 | 0,08 ± 0,01 | 2,24 ± 0,03 | 0,06 ± 0,00 | |
| 165 °C/30 min | 0,35 ± 0,02 | 3,06 ± 0,06 | 0,13 ± 0,00 | 19,07 ± 0,32 | 1,98 ± 0,03 | 0,02 ± 0,00 | 61,21 ± 0,28 | 10,47 ± 0,10 | 0,08 ± 0,00 | 3,52 ± 0,04 | 0,10 ± 0,00 | |
| 185 °C/15 min | 0,73 ± 0,05 | 4,61 ± 0,06 | 0,26 ± 0,00 | 20,76 ± 0,23 | 2,57 ± 0,02 | 0,02 ± 0,00 | 57,29 ± 0,30 | 10,50 ± 0,10 | 0,11 ± 0,00 | 3,05 ± 0,29 | 0,09 ± 0,01 | |
| 200 °C/5 min | 0,37 ± 0,04 | 2,54 ± 0,15 | 0,11 ± 0,01 | 16,84 ± 0,14 | 1,69 ± 0,04 | 0,02 ± 0,00 | 64,74 ± 0,16 | 10,21 ± 0,25 | 0,08 ± 0,00 | 3,32 ± 0,04 | 0,09 ± 0,00 | |

média ± desvio padrão de três determinações. Designação das amostras segundo a torra a que forma submetidas.

Os resultados obtidos são ainda consistentes com a composição em AG apresentada na Tabela 7.2, uma vez que, com o aumento da temperatura e do período de torra se observou uma diminuição dos TAG com moléculas de ácido linoleico na sua composição, verificando-se simultaneamente um aumento da generalidade dos TAG contendo moléculas de ácido oleico, palmítico ou esteárico. Novamente a torra conduzida a 185 °C durante 15 min mostrou ser uma excepção, evidenciando um comportamento oposto ao das restantes torras, de forma algo similar à observada para a composição em AG.

Os resultados apresentados na Tabela 7.3 estão de acordo com os previamente descritos por Yoshida e colaboradores relativamente aos efeitos, em termos da composição em TAG, da torra de rebentos de soja, sementes de sésamo, sementes girassol e amendoins (Yoshida *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 2000a; Yoshida *et al.*, 2000b; Yoshida *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2003). Estes autores observaram que, na generalidade das amostras estudadas, com o aumento do tempo de torra se verificava uma diminuição mais acentuada dos TAG contendo mais do que quatro ligações duplas, provavelmente porque com o aumento do grau de insaturação dos diferentes TAG aumenta a sua velocidade de oxidação bem como a quantidade de AG livres libertados através de reacções de hidrólise. A composição de TAG das sementes de sésamo (Yoshida *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 2000b) permaneceu idêntica à inicial, após torra a 180 °C, tendo-se no entanto verificado uma diminuição acentuada dos TAG contendo AG com duas ou três ligações duplas após 25 min de torra a 220 °C; em ambos os casos os autores não verificaram quaisquer mudanças significativas relativamente aos TAG com AG saturados, nomeadamente os ácidos palmítico e esteárico. Durante a torra de amendoins, os mesmos autores (Yoshida *et al.*, 2003) não observaram perdas significativas em termos de TAG, alegadamente devido às pequenas quantidades de TAG com mais do que quatro ligações duplas presentes nestes frutos secos. Pelo contrário, os autores descreveram perdas significativas dos referidos TAG em rebentos de soja (Yoshida *et al.*, 2000a) e em sementes de girassol (Yoshida *et al.*, 2002).

O efeito das diferentes torras no teor de fitosteróis da avelã (mg/100g de óleo) é apresentado na Tabela 7.4. Os valores obtidos para a amostra crua estão de acordo com os apresentados no capítulo 4, relativamente às diferentes cultivares estudadas.

A diminuição do teor de fitosteróis pode ocorrer devido a reacções de oxidação, hidrólise, isomerização e desidratação destes compostos (Bernardo-Gil *et al.*, 2002). Em geral, considerando os valores absolutos (mg/100 g óleo), observou-se um pequeno decréscimo do teor total nas amostras submetidas às diferentes torras. Assistiu-se igualmente a uma diminuição da quantidade individual de cada composto, com excepção do Δ^7 -estigmastenol, o qual apresentou valores mais elevados nas avelãs submetidas a processamento térmico. Com base nos dados descritos por Piironen *et al.* (2000), concluiu-se que muito provavelmente este aumento se deve à ocorrência de fenómenos de isomerização do β -sitosterol.

Apesar dos mesmos autores referirem que a aplicação de condições severas durante a refinação física de óleos vegetais pode originar a isomerização do Δ^5 -avenasterol a Δ^7 -avenasterol, não se observou o aumento deste último nas avelãs torradas.

As avelãs torradas distinguiram-se da amostra controlo pela presença característica de um pico, o qual segundo os dados disponíveis na bibliografia (Firestone e Reina, 1996, NP EN ISO 12228, 1999) foi tentativamente identificado como $\Delta^{5,23}$ -estigmastadienol. Os estigmastadienóis são produtos dos esteróis, frequentemente formados quando os alimentos são submetidos a elevadas temperaturas (Piironen *et al.*, 2000). Por exemplo a presença de estigmastadienóis está documentada em óleos vegetais refinados, onde podem estar presentes entre 1 a 100 mg/kg de óleo (Piironen *et al.*, 2000).

Uma vez que Mohamed e Awatif (1998) referiram que no óleo de sésamo obtido de sementes torradas a 180 °C durante 30 min, quando considerados os resultados em termos de percentagens relativas de cada composto, se observava um decréscimo dos níveis de β -sitosterol e campesterol e um aumento dos níveis de estigmasterol, Δ^5 -avenasterol e Δ^7 -avenasterol, procedeu-se à comparação dos resultados obtidos, para as avelãs cruas e submetidas a torra, em termos de percentagens relativas de cada esteroide. Constatou-se existirem apenas ligeiras diferenças entre a amostra controlo e as amostras submetidas aos diferentes processos de torra: os compostos $\Delta^{5,23}$ -estigmastadieno, clerosterol e Δ^7 -estigmastenol apresentaram, regra geral, valores superiores nas amostras torradas, no entanto, e contrariamente ao descrito por Mohamed e Awatif (1998) no óleo de sésamo, não se verificou qualquer aumento relativamente às percentagens de estigmasterol e Δ^7 -avenasterol. Comparativamente à amostra crua, verifica-se um ligeiro decréscimo da percentagem de β -sitosterol e um ligeiro aumento da percentagem de Δ^5 -avenasterol nas amostras torradas a 145°C (15 min), 165 °C (15 e 30 min) e 185 °C (15 min).

Em estudos prévios, os esteróis que apresentam um grupo etilideno na cadeia lateral (Δ^5 e Δ^7 -avenasteróis) foram associados a propriedades antipolimerizantes (Mohamed e Awatif, 1998; Akintayo, 2004), aumentando a protecção contra a oxidação lipídica durante o processamento térmico. Ambos os fitosteróis referidos apresentaram pequenos decréscimos com a torra, no entanto, e apesar de existirem em muito pequenas quantidades, a sua presença continua ainda a ser benéfica, contribuindo para uma melhor estabilidade do óleo de avelã.

A Tabela 7.5 mostra a composição em tocoferóis e tocotrienóis (mg/kg avelã, peso seco) de cada uma das amostras estudadas. Foram detectados e quantificados sete compostos: α -, β -, γ - e δ -tocoferóis e α -, β - e γ -tocotrienóis.

TABELA 7.5. Efeito da torra na composição de fitosteróis (mg/100g de óleo).

| Amostra | Fitosteróis | | | | | | | | | |
|---------------|-------------|--------------|---------------|-----------------|-------------|---------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-------|
| | Coolesterol | Campesterol | Estigmasterol | Estigmastadieno | Clesterol | β -sitosterol | Δ^5 -avenasterol | Δ^7 -estigmasterol | Δ^7 -avenasterol | Total |
| crua | 0,29 ± 0,02 | 10,09 ± 0,16 | 1,85 ± 0,06 | nd | 1,15 ± 0,08 | 155,96 ± 0,19 | 12,23 ± 0,28 | 1,05 ± 0,03 | 0,98 ± 0,04 | 183,6 |
| 125 °C/15 min | 0,29 ± 0,04 | 9,57 ± 0,08 | 1,69 ± 0,03 | 0,21 ± 0,02 | 1,13 ± 0,05 | 139,66 ± 1,06 | 9,94 ± 0,99 | 1,62 ± 0,01 | 0,58 ± 0,05 | 164,7 |
| 125 °C/30 min | 0,32 ± 0,01 | 8,97 ± 0,08 | 1,56 ± 0,05 | 0,29 ± 0,04 | 1,13 ± 0,04 | 136,98 ± 0,90 | 9,89 ± 0,19 | 1,02 ± 0,04 | 0,20 ± 0,02 | 160,4 |
| 145 °C/15 min | 0,34 ± 0,01 | 8,76 ± 0,04 | 1,78 ± 0,02 | 0,32 ± 0,01 | 1,25 ± 0,06 | 141,71 ± 0,59 | 12,43 ± 0,05 | 1,25 ± 0,01 | 0,91 ± 0,01 | 168,7 |
| 165 °C/15 min | 0,42 ± 0,04 | 8,96 ± 0,22 | 1,61 ± 0,01 | 0,75 ± 0,02 | 1,33 ± 0,00 | 130,18 ± 1,00 | 10,85 ± 0,48 | 1,93 ± 0,05 | 1,09 ± 0,08 | 157,1 |
| 165 °C/30 min | 0,22 ± 0,02 | 8,45 ± 0,19 | 1,66 ± 0,04 | 0,87 ± 0,01 | 1,20 ± 0,06 | 134,89 ± 0,68 | 13,27 ± 1,31 | 1,64 ± 0,13 | 0,90 ± 0,10 | 163,1 |
| 185 °C/15 min | 0,17 ± 0,02 | 9,06 ± 0,03 | 1,54 ± 0,01 | 0,19 ± 0,02 | 1,14 ± 0,08 | 134,92 ± 0,62 | 11,67 ± 0,35 | 1,17 ± 0,01 | 0,38 ± 0,01 | 160,2 |
| 200 °C/5 min | 0,16 ± 0,01 | 8,91 ± 0,08 | 1,67 ± 0,04 | 0,32 ± 0,02 | 1,21 ± 0,08 | 140,89 ± 0,68 | 9,23 ± 0,34 | 1,44 ± 0,09 | 0,27 ± 0,02 | 164,1 |

média ± desvio padrão de três determinações. Designação das amostras segundo a torra a que foram submetidas. nd: não determinado.

TABELA 7.6. Efeito da torra na composição de tocoferóis e tocotrienóis (mg/ kg avelã).

| Amostra | Tocoferóis e Tocotrienóis | | | | | | | |
|---------------|---------------------------|---------------|-------------|-------------|--------------|---------------|-------------|-------|
| | α -T | α -TTR | β -T | γ -T | β -TTR | γ -TTR | δ -T | Total |
| Crua | 167,13 ± 3,58 | 1,29 ± 0,01 | 5,79 ± 0,05 | 6,64 ± 0,05 | 0,21 ± 0,00 | 0,84 ± 0,01 | 0,68 ± 0,03 | 182,6 |
| 125 °C/15 min | 161,58 ± 0,58 | 1,58 ± 0,05 | 5,61 ± 0,04 | 4,72 ± 0,06 | 0,24 ± 0,00 | 0,81 ± 0,02 | 0,57 ± 0,01 | 175,1 |
| 125 °C/30 min | 168,97 ± 0,20 | 1,66 ± 0,02 | 6,40 ± 0,03 | 8,22 ± 0,02 | 0,22 ± 0,01 | 0,85 ± 0,02 | 0,94 ± 0,01 | 187,3 |
| 145 °C/15 min | 157,75 ± 0,13 | 1,94 ± 0,05 | 5,11 ± 0,06 | 4,90 ± 0,05 | 0,21 ± 0,01 | 0,79 ± 0,02 | 0,50 ± 0,01 | 171,2 |
| 165 °C/15 min | 157,65 ± 0,43 | 4,16 ± 0,02 | 5,35 ± 0,01 | 5,22 ± 0,04 | 0,19 ± 0,01 | 1,70 ± 0,03 | 0,73 ± 0,01 | 175,0 |
| 165 °C/30 min | 155,36 ± 0,21 | 3,12 ± 0,03 | 5,17 ± 0,02 | 3,82 ± 0,01 | 0,16 ± 0,01 | 0,93 ± 0,01 | 0,67 ± 0,00 | 169,2 |
| 185 °C/15 min | 151,71 ± 0,12 | 2,50 ± 0,05 | 4,77 ± 0,01 | 3,89 ± 0,02 | 0,17 ± 0,01 | 0,75 ± 0,01 | 0,42 ± 0,01 | 164,2 |
| 200 °C/5 min | 158,45 ± 0,72 | 2,84 ± 0,07 | 5,84 ± 0,06 | 4,57 ± 0,00 | 0,23 ± 0,00 | 1,46 ± 0,00 | 0,44 ± 0,00 | 173,8 |

média ± desvio padrão de três determinações. Designação das amostras segundo a torra a que foram submetidas. T: tocoferol; TTR: tocotrienol.

Em todas as amostras o α -tocoferol foi o composto predominante, seguindo-se os tocoferóis β e γ . Para todas as torras efectuadas, a diminuição do teor total em vitamina E foi sempre inferior a 10% da quantidade inicialmente existente na amostra crua, tendo-se verificado a diminuição mais acentuada na amostra de avelãs torradas a 185 °C durante 15 min.

Neste estudo verificou-se que, com o aumento da temperatura e tempo de torra, os diferentes vitâmeros apresentaram comportamentos diversos. Relativamente ao α -tocoferol, vitâmero mais abundante, observou-se uma ligeira diminuição da sua quantidade inicial, tendo-se atingido a maior perda para a amostra torrada a 185 °C durante 15 min (menos 9,2 % do que o controlo). Esta amostra foi igualmente a que evidenciou maiores perdas de β e δ -tocoferóis (17,6% e 37,5%, respectivamente). Relativamente ao γ -tocoferol, a amostra que apresentou teores inferiores foi a correspondente à torra efectuada a 165 °C durante 30 min (42,5%), se bem que, foram atingidas perdas quase idênticas na torra a 185 °C durante 15 min (41,4%). Relativamente à estabilidade dos diferentes tocoferóis quando submetidos a processamento térmico, verifica-se que as conclusões obtidas em alguns estudos não são coincidentes, sendo até por vezes contraditórias. Alguns estudos sugerem que durante o processamento térmico (Niki *et al.*, 1986; Barrera-Arellano *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 1991), o tocoferol menos estável é o vitâmero α , ao passo que outros demonstram que este vitâmero é até bastante estável a elevadas temperaturas (Holownia *et al.*, Seybold *et al.*, 2004). Relativamente à estabilidade dos vários tocoferóis, Yoshida *et al.*, (1991) e Barrera-Arellano *et al.* (2002) sugerem a seguinte ordem: $\delta > \beta > \gamma \gg \alpha$, apresentando os vitâmeros β e γ perdas não muito distintas. Considerando os resultados apresentados na Tabela 7.5, constata-se que, neste trabalho, o vitâmero menos afectado pelas condições de torra mais drásticas foi o α -tocoferol.

Também contrariamente aos resultados descritos por Yoshida *et al.* (1991) e Barrera-Arellano *et al.* (2002), as velocidades de degradação dos tocoferóis β e γ parecem ser bastante distintas, uma vez que o γ -tocoferol apresenta valores superiores de perdas (% relativamente ao controlo), o que parece indicar a sua maior susceptibilidade ao processamento térmico comparativamente ao β -tocoferol. Também como já referido, verificou-se que o γ -tocoferol foi o que apresentou perdas superiores (em %, comparativamente com a amostra crua), seguido pelo δ -tocoferol.

Observando os valores apresentados na Tabela 7.5, verifica-se um aumento da quantidade de α -tocotrienol com o aumento da temperatura e tempo de torra. Na verdade, está descrito na literatura que o pré-tratamento térmico de algumas matrizes pode aumentar a extractibilidade de alguns dos vitâmeros da vitamina E. Por exemplo, o teor em α -tocoferol no óleo de açafraão, obtido por prensagem da semente torrada, aumenta gradualmente de 441 para 520 mg/kg com o aumento de temperatura de torra de 140 °C até 180 °C (Lee *et al.*, 2004); Seybold *et al.* 2004 verificou perdas significativas durante o processo de esterilização

do sumo de tomate ao passo que o aquecimento breve realizado durante a produção de molho de tomate e de sopa de tomate originou um aumento significativo (em peso seco) dos teores de α -tocoferol. Estes autores sugeriram que os vitâmeros para os quais se verificaram os aumentos poderiam estar ligados a proteínas membranares ou outros compostos, nomeadamente fosfolípidos, ocorrendo a quebra destas ligações em consequência do tratamento térmico, obtendo-se consequentemente extracções com rendimentos superiores. Os resultados descritos no Capítulo 6, parecem confirmar a ocorrência deste fenómeno para alguns dos vitâmeros, em consequência do processo de torra. Como se pode observar na Tabela 6.3 do referido capítulo (pág. 207), verifica-se que, comparativamente à extracção com *n*-hexano, a saponificação da amostra permitiu a extracção de quantidades superiores de γ -tocoferol (> 7%) e de γ -tocotrienol (> 27%), e que com a extracção em Soxhlet o rendimento da extracção do α -tocotrienol foi cerca de 42% superior. Estes resultados parecem sustentar a hipótese de que se consegue uma melhor eficácia de extracção de alguns dos vitâmeros nas amostras torradas.

No entanto, esta hipótese não justifica os níveis de α -tocotrienol obtidos na amostra 165 °C/15 min, cerca de três vezes superiores aos da amostra crua. Pela análise dos espectros obtidos no DAD verificou-se que, para as torras realizadas acima dos 145 °C o pico correspondente ao α -tocotrienol continha um outro composto, provavelmente um produto de degradação de algum dos tococromanóis existentes na amostra. Este composto, não identificado, apresentou um máximo de absorção a 270 nm e não a 293 nm como seria esperado para o α -tocotrienol. Como os compostos co-eluem, foram ambos quantificados como α -tocotrienol, explicando os valores anormalmente elevados verificados em algumas das amostras submetidas a torra.

De forma algo similar, o teor em γ -tocotrienol foi superior em algumas amostra torradas quando comparado com a amostra crua, provavelmente devido a uma melhor extractibilidade do composto em consequência do tratamento térmico. Refira-se neste ponto que, à semelhança com o referido para o γ -tocotrienol, também o γ -tocoferol apresenta teores mais elevados em algumas das amostras torradas indicando uma melhor extractibilidade do composto com o processamento térmico, mas ao mesmo tempo os dados parecem sugerir que este composto será mais facilmente afectado pela temperatura utilizada no processo de torra. Como se pode verificar na Tabela 7.5, comparando os resultados obtidos com o mesmo tempo de torra (15 min) verifica-se um aumento gradual do teor em γ -tocoferol para temperaturas crescentes de torra até aos 165 °C (isto é, comparando os valores obtidos para 125°C, 145 °C e 165 °C), no entanto para temperaturas mais elevadas (185 °C) verifica-se um decréscimo do valor deste composto. Estes resultados parecem indicar uma melhor extractibilidade do composto com o tratamento térmico até certo ponto. A temperaturas mais elevadas, a velocidade de degradação do composto será superior, e apesar de uma maior quantidade ser extraída não compensa a degradação dos compostos que ocorre.

Comparativamente à amostra crua, todas as amostras, à exceção da torra 125 °C/30 min, apresentaram valores de γ -tocoferol consideravelmente inferiores, o que parece indicar a grande susceptibilidade deste composto ao processamento térmico. Tal como referido para o α -tocotrienol, os valores anormalmente elevados da amostra torrada a 125 °C durante 30 min, explicam-se pela co-eluição de um composto que não o γ -tocoferol. O β -tocotrienol apresentou teores muito baixos, quer na amostra crua quer naquelas submetidas a torra, sendo o seu teor idêntico em todas as amostras estudadas.

Como referido anteriormente, estão disponíveis na literatura vários estudos relativamente à avaliação dos efeitos do processamento térmico nos teores de vitamina E. Estes estudos referem matrizes muito diversas bem como diversos processamentos térmicos. Alguns estudos referem-se apenas ao impacto no teor total de vitamina E, outros explicitam o comportamento dos diferentes isómeros, frequentemente apenas dos tocoferóis, sendo mais rara a referência a tocotrienóis. Alguns desses estudos encontram-se referidos na Tabela 7.7.

TABELA 7.7. Efeito do processamento térmico na composição em tocoferóis e tocotrienóis de diversas matrizes.

| Matriz | Processamento térmico | Resultado | Bibliografia |
|--|--|---|--------------------------------|
| Amendoim | Torra, 20 min, microondas (2450 MHz) | ↓ 15% do total de tocoferóis inicial | Yoshida <i>et al.</i> , 2003 |
| Óleo de sésamo (semente torrada) | Torra, 30 min, forno eléctrico a 180 °C | ↓ de 18% a 28% do total de tocoferóis, dependendo da cultivar utilizada | Mohamed e Awatif, 1998 |
| Óleo de girassol (semente torrada) | Torra durante 12 e 30 min, microondas (2450 MHz) | 12 min: não se verificaram alterações 30 min: ↓ de 8% do total de tocoferóis | Yoshida <i>et al.</i> , 2002 |
| Óleo de semente de abóbora (semente torrada) | Torra, 60 min, recipiente com agitação e manta a 150 °C | ↓ entre 25 a 40% (α -T, α -TTR, γ -T e γ -TTR) nos primeiros 40 min, seguindo-se um ↑ até valores próximos dos originais. | Murkovic <i>et al.</i> , 2004 |
| Azeite | Aquecimento, 10 min, microondas (2450 MHz) | ↓ de α -T superiores a 60% | Brenes <i>et al.</i> , 2002 |
| Mistura de azeite/água | Panela de pressão, 30 a 60 min | Não se verificaram alterações significativas de α -T | Brenes <i>et al.</i> , 2002 |
| Filetes de salmão | Cozido a vapor, 12 min | Não se verificaram alterações significativas de α -T, β -T e δ -T | Al-saghir <i>et al.</i> , 2004 |
| Molho de tomate | Placa de fogão eléctrico, 210 min | Até 60 min, ↑ significativo (4,8 para 9,9 mg/100g) de α -T, diminuindo em seguida (até 7,8 mg/100) | Seybold <i>et al.</i> , 2004 |
| Óleo de grão de uva | Microondas, 9 e 12 min | Total de tococromonóis aumenta 2,5 vezes (9 min) e 2 vezes (12 min). Perda significativa de δ T (até 85%) em ambos os casos. Aumentos significativos de α -T, β -T, γ -T, α -TTR e γ TTR, atingindo os valores máximos aos 9 min e diminuindo aos 12 min, no entanto apresentando valores superiores aos iniciais. | Oomah <i>et al.</i> , 1998 |
| Farelo de arroz | Microondas, 15 a 120 s; forno eléctrico a 170 °C, 180 °C e 190 °C, 5 a 120 min | No geral: ↑ de α -T e γ -T; sem alterações: β -T, δ -T e δ -TTR; α -TTR e γ -TTR inicialmente ↑ e depois ↓, em alguns casos para valores inferiores aos originais. | Ko <i>et al.</i> , 2003 |

6. CONCLUSÕES

- De acordo com os resultados apresentados pode concluir-se que o valor nutricional das avelãs torradas não é substancialmente alterado em consequência do processamento térmico, mesmo considerando as torras efectuadas, à escala laboratorial, utilizando temperaturas superiores às utilizadas na indústria.
- Apesar de se assistir a uma tendência de perdas crescentes com os aumentos de temperatura e tempo de torra, verificou-se uma diminuição relativamente modesta do teor total de compostos benéficos, nomeadamente fitosteróis e vitamina E.
- O aumento de AG *trans*, potencialmente prejudiciais para a saúde, foi considerado insignificante.
- Apesar de se observarem pequenas alterações, quer a nível dos TAG, quer a nível da composição em AG, ambos os perfis se mantiveram basicamente idênticos aos apresentados pela amostra de avelãs não processada.
- Concluiu-se que em cada grupo de compostos, AG, TAG, fitosteróis, tocoferóis e tocotrienóis, as proporções relativas de cada composto foram globalmente idênticas às existentes na amostra de avelãs cruas, daí se inferindo que a torra das avelãs não parece induzir alterações intensas na composição química das avelãs, no que diz respeito aos grupos de compostos avaliados.

CONCLUSÕES GLOBAIS

A dissertação apresentada pretendeu contruibuir para um melhor conhecimento das espécies *Corylus avellana* L. (aveleira) e *Juglans regia* L. (nogueira), procurando valorizar e divulgar os produtos delas obtidos e, conseqüentemente, estimular a sua produção e consumo. Assim, estudaram-se as suas sementes, vulgo designadas como frutos secos, e as suas folhas, utilizadas em medicinal tradicional.

As plantas medicinais têm, desde há muito, desempenhado um importante papel de saúde pública, continuando a ser frequentemente utilizadas pelas populações de países com fracos recursos económicos. Nos países desenvolvidos, actualmente assiste-se a uma franca ascensão do uso da fitoterapia. Algumas pessoas começam a encarar com uma certa contrariedade e desconfiança o uso de substância obtidas por síntese química optando por alternativas consideradas “mais naturais”, como é o caso das plantas medicinais.

A jeito de conclusão, no estudo realizado nas folhas de aveleira e de noqueira, são de destacar os seguintes pontos:

- Na folha de aveleira, foram identificados, pela técnica HPLC/DAD/ESI-MS/MS, um total de 11 compostos fenólicos: ácidos 5-cafeoilquínico, 3-cafeoilquínico, cafeoiltartárico e *p*-cumaroiltartárico, miricetina 3-ramnósido, quercetina 3-ramnósido, quercetina 3-glúcósido, campferol-3-ramnósido e três compostos parcialmente identificados como derivados da miricetina. Na folha de noqueira foram identificados, pela mesma técnica, um total de 9 compostos fenólicos: ácidos 3-*O*-cafeoilquínico, 3-*p*-cumaroilquínico e 4-*p*-cumaroilquínico, quercetina 3-galactósido, quercetina 3-arabinósido, quercetina 3-xilósido, quercetina 3-ramnósido, quercetina 3-pentósido e campferol 3-pentósido. Ambas as espécies apresentaram um perfil qualitativamente e quantitativamente característico que, conjuntamente, definem um “fingerprint” fenólico. Este estudo permite confirmar, uma vez mais, a utilidade do perfil fenólico como parâmetro de autenticidade de produtos de origem vegetal.
- A análise estatística demonstrou a existência de correlações entre todos os flavonóides identificados na folha de aveleira, bem como fortes correlações entre alguns dos compostos presentes na folha de noqueira. A observação destas correlações reforçam, em cada um dos casos, a existência de um perfil fenólico característico. A análise estatística permitiu ainda concluir que, em ambas as espécies, o factor “ano de colheita” parece ser o que mais influência a composição fenólica das folhas. Pelo contrário, o factor “localização geográfica” parece não exercer influência significativa. A análise de regressão logística permitiu verificar que o factor “cultivar” parece afectar, ainda que de forma moderada, a composição fenólica das folhas de aveleira.

- Apesar de existirem diferenças quantitativas ao longo dos meses estudados (Maio-Setembro), o perfil qualitativo das folhas de ambas as espécies não foi influenciado pelo mês de colheita das amostras. Em ambos os casos, as cultivares estudadas apresentaram um padrão de variações quantitativas globalmente idêntico entre si. Na folha de aveleira obtiveram-se teores fenólico totais máximos em Julho e mínimos em Agosto, ao passo que nas de noqueira os valores máximos corresponderam às amostras colhidas nos meses Maio e Julho e os valores mínimos nos meses Agosto e Setembro.

“*Que o teu alimento seja o teu remédio e que o teu remédio seja o teu alimento*”. Esta frase, atribuída a Hipócrates, há cerca de três mil anos, traduz o sentimento actual de um crescente número de pessoas que procura ter uma dieta cuidada e diversificada, seleccionando cuidadosamente os alimentos que consomem. E são já muitas as pessoas que acreditam nas virtudes da chamada dieta Mediterrânica. Nesta dieta incluem-se, entre outros alimentos, os frutos secos estudados neste trabalho, avelãs e nozes. Com este trabalho procurou-se contribuir para a caracterização, em termos químicos, destes frutos secos, incidindo nas cultivares com maior representatividade em Portugal.

Uma vez que ao longo da tese se sumariaram as conclusões dos vários capítulos, apenas se fará aqui uma resenha global dos principais pontos merecedores de enfoque:

- Os resultados demonstram que qualquer dos frutos secos estudados são importantes fontes de AG essenciais. Ambos apresentam perfis em AG característicos, que contudo divergem significativamente entre si. Na avelã foram detectados os seguintes AG: C_{14:0}, C_{15:0}, C_{16:0}, C_{16:1n7}, C_{17:0}, C_{17:1n7}, C_{18:0}, C_{18:1n9}, C_{18:1n7}, C_{18:2n6}, C_{20:0}, C_{20:1n9}, C_{18:3n3}, C_{22:0} e C_{22:1n9}. Verificou-se que a avelã é um alimento rico em lípidos monoinsaturados, essencialmente devido às elevadas percentagens de ácido oleico. Por sua vez, a noz caracteriza-se pela presença dos AG: C_{14:0}, C_{16:0}, C_{16:1n7}, C_{17:0}, C_{18:0}, C_{18:1n9t}, C_{18:1n9}; C_{18:1n7}, C_{18:2ct}; C_{18:2n6}, C_{20:0}, C_{18:3n6}; C_{20:1n9}, C_{18:3n3}, C_{20:2n6}; C_{22:0}, revelando ser um alimento rico em AG polinsaturados, com teores elevados de ácido linoleico e teores consideráveis de ácido α -linolénico.
- Em consonância com as diferenças observadas na composição em AG, também o perfil de TAG se mostrou significativamente diferente entre os frutos secos estudados. Na avelã foram determinados os TAG: LLL, OLL, PLL, OOL, POL, PPL, OOO, POO, PPO, SOO e PSO, e na noz os TAG: LLnLn, LLLn, PLnLn, LLL, OLLn, PLLn, OLL, PLL, OOL, POL, OOO.

- Ambos frutos secos contêm teores consideráveis de fitoesteróis, os quais estão associados à diminuição dos níveis de colesterol e à prevenção de DCV. As duas espécies apresentaram perfis qualitativos idênticos, estando presentes os seguintes compostos: colesterol, campesterol, estigmasterol, clerosterol, β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol, β -sitostanol, Δ^7 -estigmasterol e Δ^7 -avenasterol. De qualquer forma, o perfil quantitativo das espécies revelou-se diferente.
- As avelãs e as nozes são, respectivamente, uma boa fonte de α -tocoferol e de γ -tocoferol. O consumo de qualquer dos frutos secos fornece ainda outros tocoferóis e tocotrienóis, embora em menor quantidade,. Regra geral, na avelã identificaram-se 7 vitâmeros: α -, β -, γ - e δ -tocoferóis e α -, β - e γ -tocotrienóis, enquanto que na noz se identificaram os seguintes: α -, β -, γ - e δ - tocoferóis e γ -tocotrienol.
- Este trabalho, para além de representar uma contribuição para o conhecimento dos perfis químicos das cultivares, de avelãs e nozes, cultivadas no nosso país, permitiu recolher dados que poderão ser úteis em trabalhos futuros, como por exemplo em estudos de adulteração de azeite com óleo de avelã.
- Uma vez que diversos factores podem afectar a composição química das plantas, foi objectivo deste trabalho aplicar técnicas de quimiometria, isto é, utilizar métodos estatísticos no tratamento e interpretação dos dados provenientes das análises químicas, de forma a avaliar a influência dos factores estudados (ano de produção, cultivar e localização geográfica). Relativamente às amostras estudadas verificou-se que, de uma forma geral, as composições em AG, TAG, fitosteróis e tococromanóis das sementes de aveleira são influenciadas de forma significativa por factores genéticos. Os resultados obtidos apontam no sentido da fraca (ou até mesmo nula) influência de factores edafoclimáticos. Pelo contrário, verificam-se fortes influências dos factores “ano de produção” e “localização geográfica” e uma diminuta influência do factor “cultivar” na composição em AG e TAG das nozes. Relativamente à composição em fitosteróis os resultados foram algo inconclusivos devido à grande dispersão de resultados, verificada sobretudo em 2001. Todos os factores avaliados parecem afectar, ainda que moderadamente, a composição em tococromanóis das sementes de noqueira.
- A variação de resultados que por vezes ocorreu de ano para ano, evidencia a importância de realizar estes estudos num período temporal o mais abrangente possível.

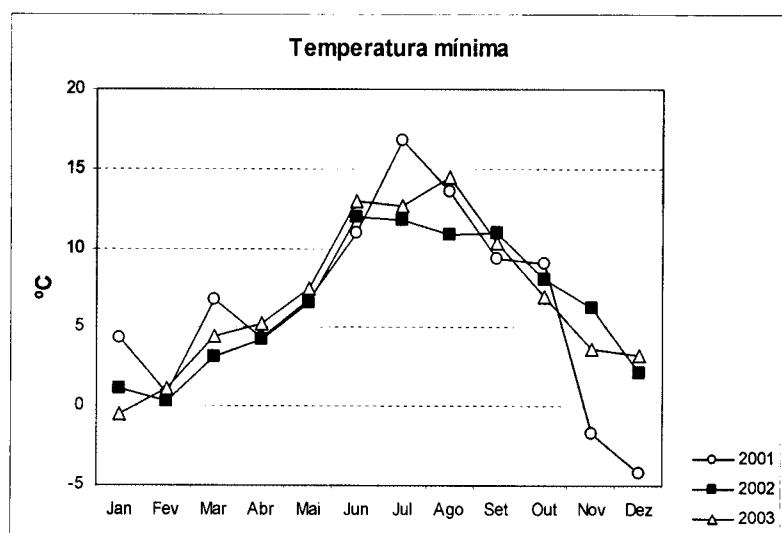
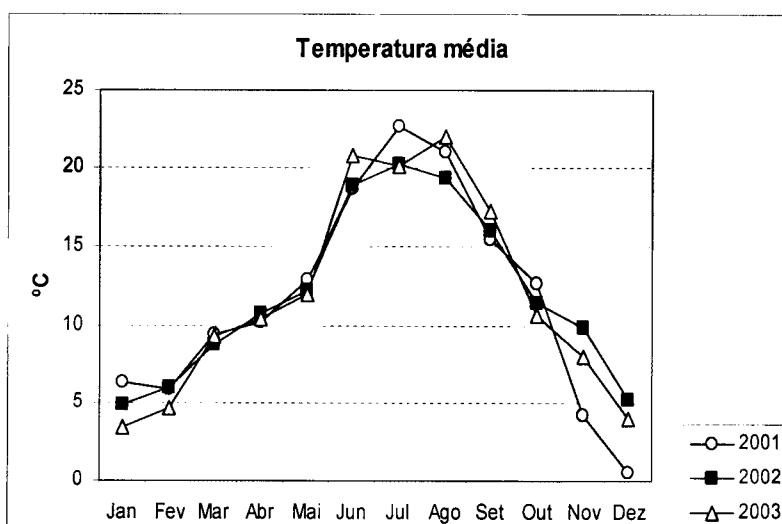
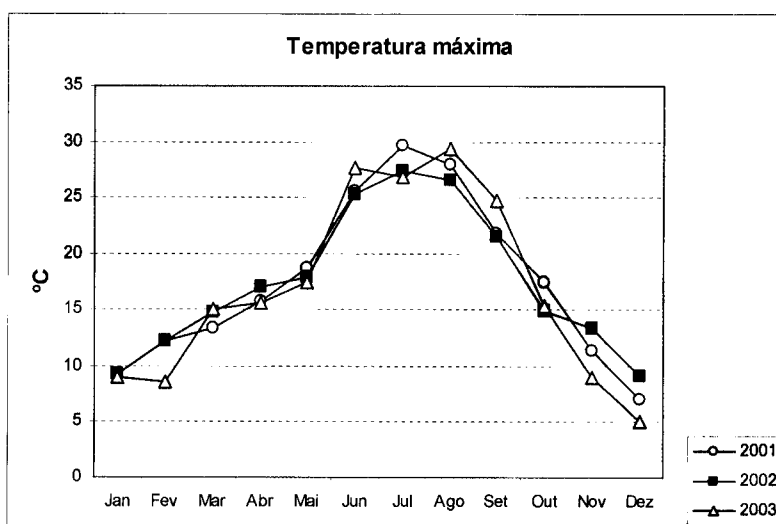
Por último, pretendeu-se avaliar a influência do processo de torra na composição da fracção lipídica das avelãs, uma vez que estas são maioritariamente consumidas torradas.

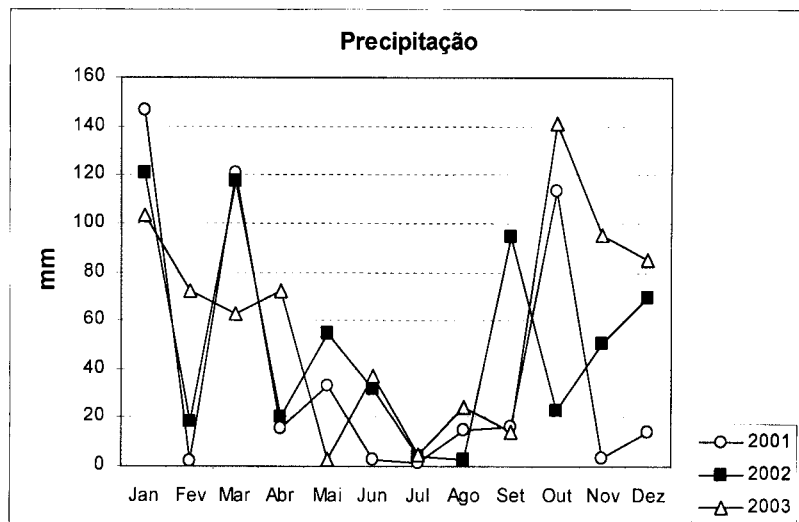
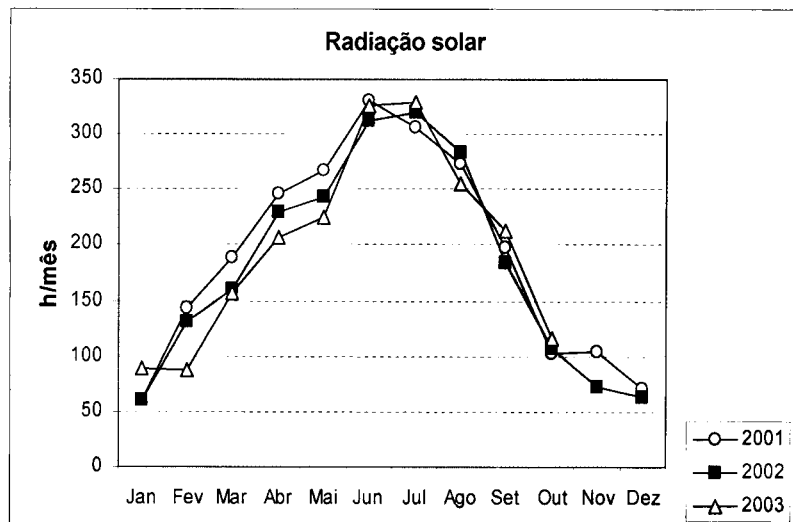
- Concluiu-se que o valor nutricional das avelãs torradas não é substancialmente alterado em consequência da torra, uma vez que apenas se verificaram diminuições modestas do teor total dos compostos benéficos avaliados, nomeadamente AG, fitosteróis e tococromanóis. O aumento de ácidos gordos *trans*, potencialmente prejudiciais para a saúde, foi considerado insignificante.

ANEXOS

DADOS CLIMÁTICOS

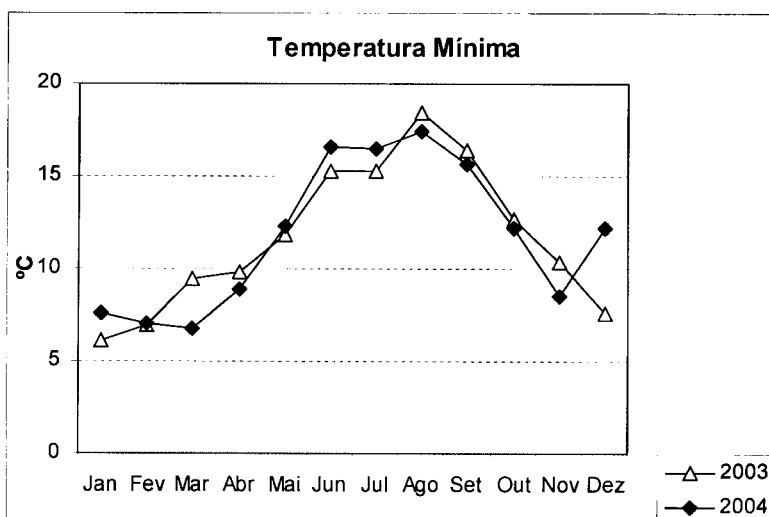
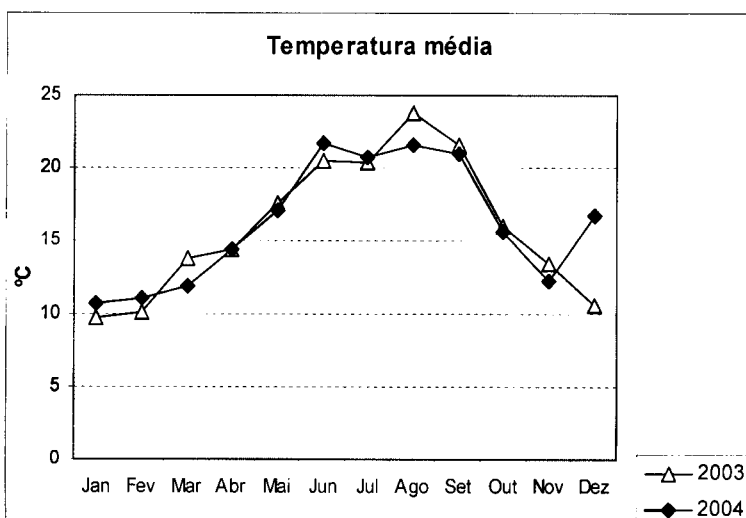
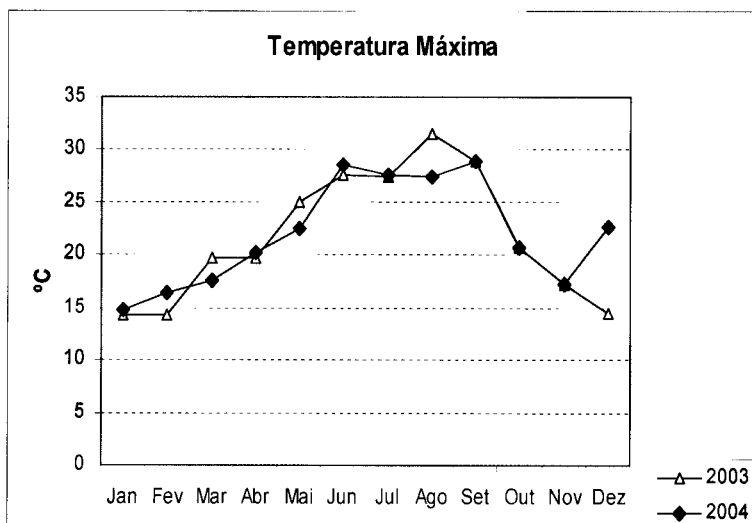
REFERENTES À REGIÃO DE BRAGANÇA

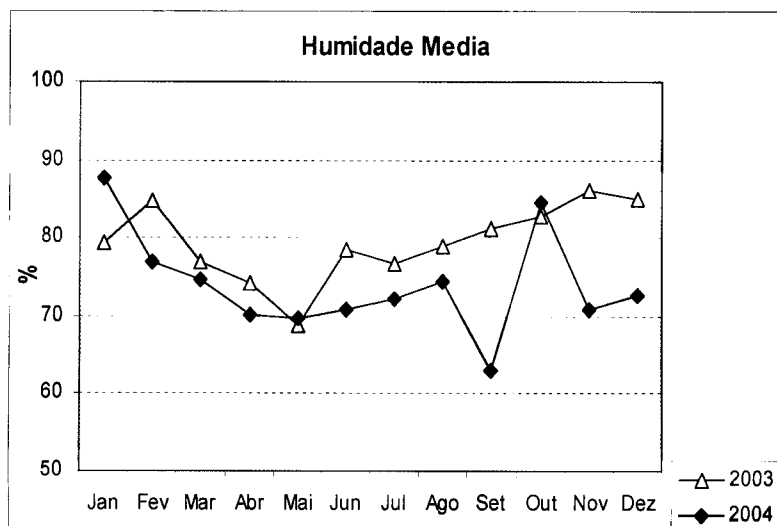
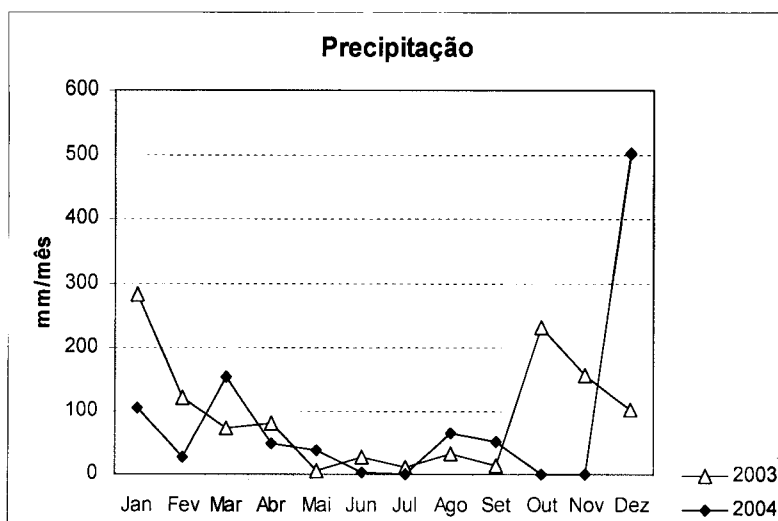
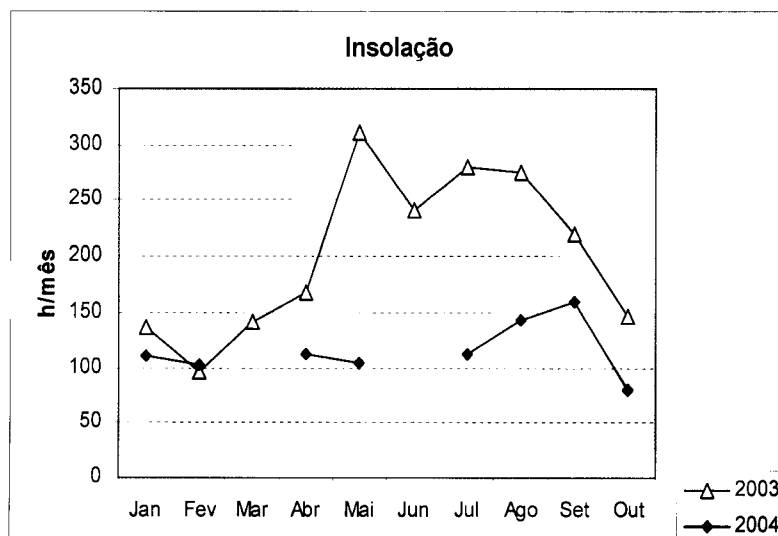




DADOS CLIMÁTICOS

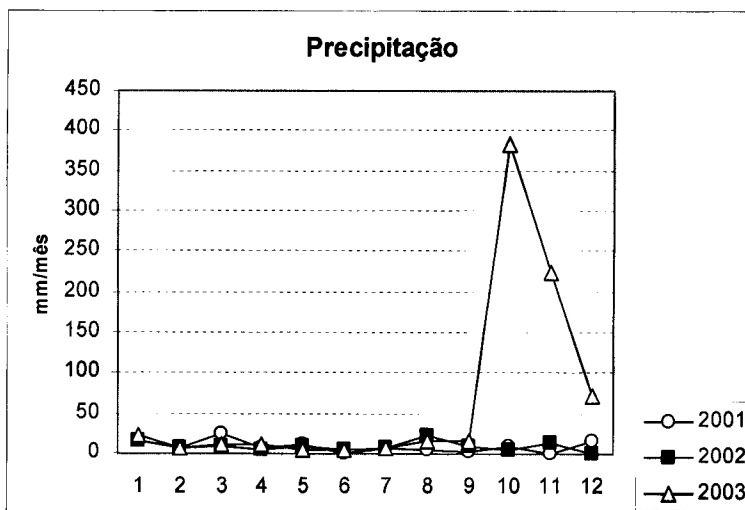
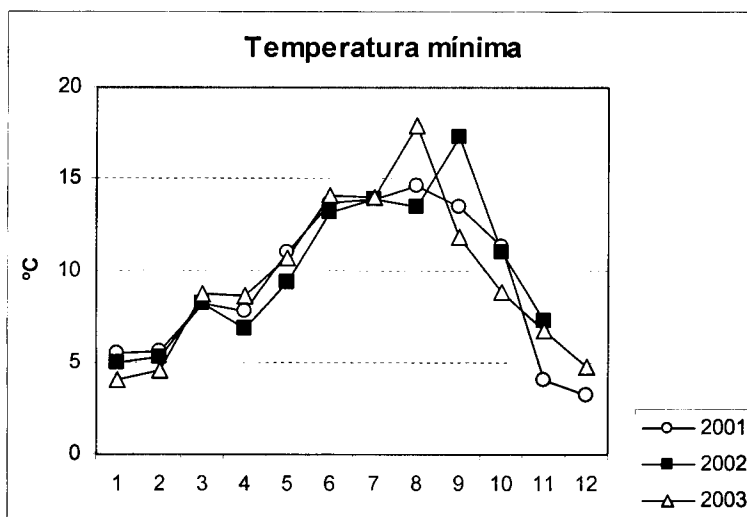
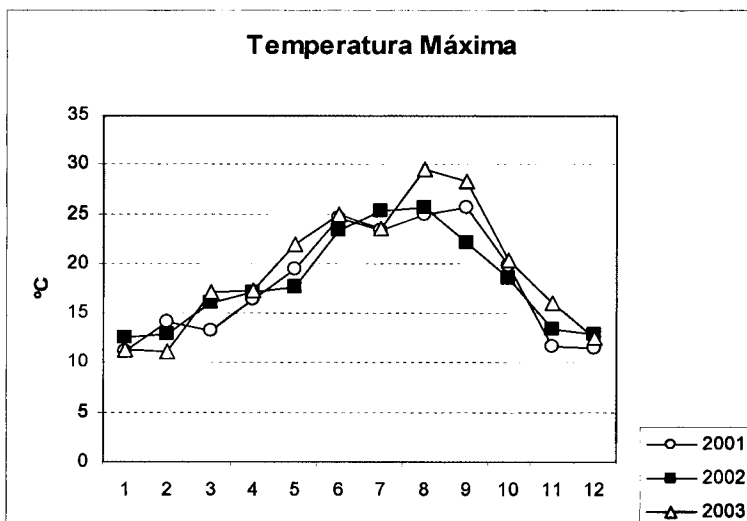
REFERENTES À REGIÃO DE COIMBRA





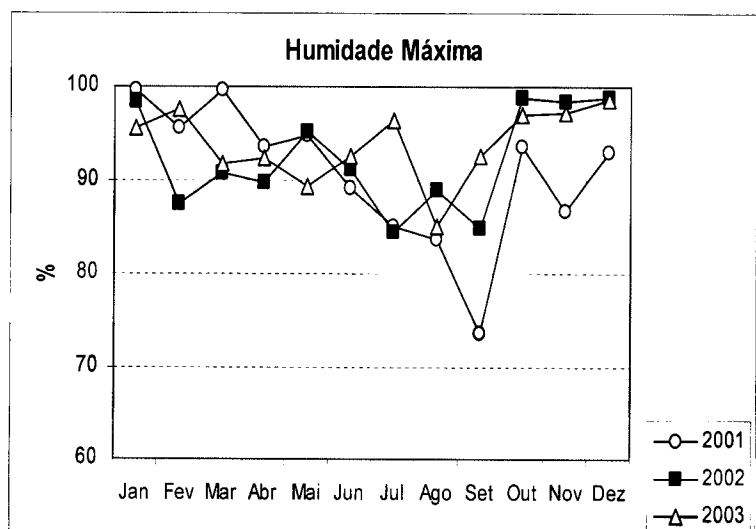
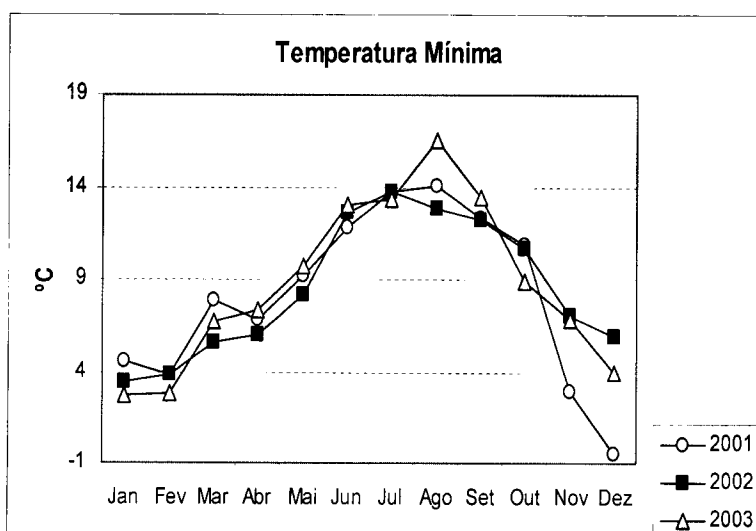
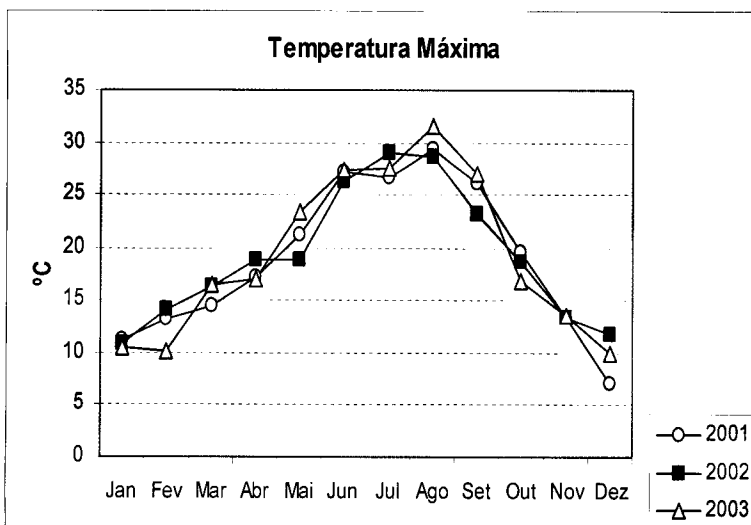
DADOS CLIMÁTICOS

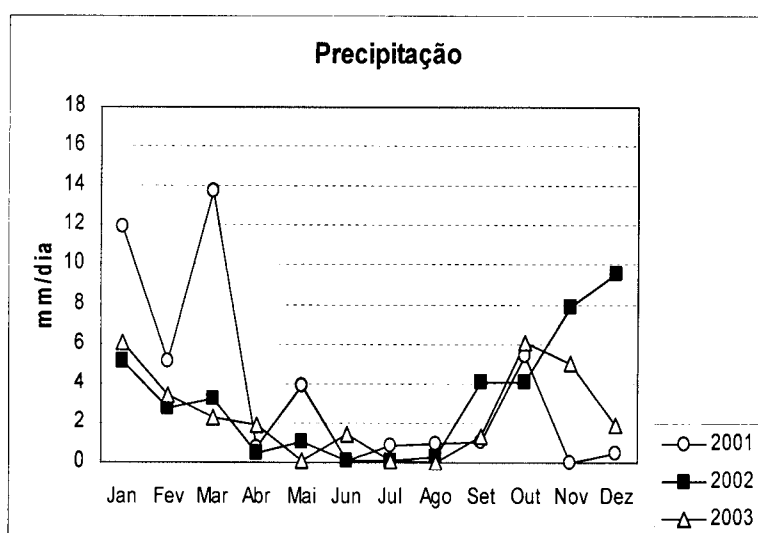
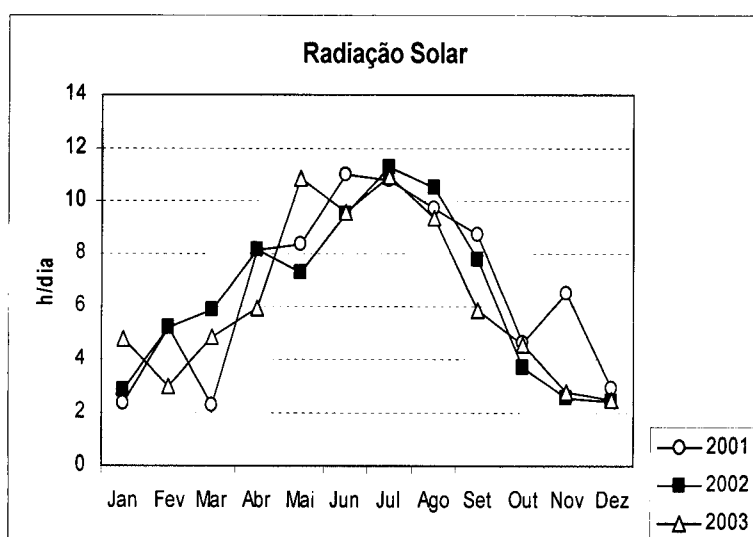
REFERENTES À REGIÃO DE FELGUEIRAS



DADOS CLIMÁTICOS

REFERENTES À REGIÃO DE VILA REAL





BIBLIOGRAFIA

2

- Abbey, M.; Noakes, M.; Belling, G.B.; Nestel, P.J. Partial replacement of saturated fatty acids with almonds or walnuts lowers total plasma cholesterol and low-density-lipoprotein cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**, *59*, 995-999.
- Abidi, S.L. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *J. Chromatogr. A* **2001**, *935*, 173-201.
- Abidi, S.L. Review. Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 197-216.
- Abidi, S.L.; Mounts, T.L. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations of tocopherols. *J. Chromatogr. A*, **1997**, *782*, 25-32.
- Açkurt, F.; Ozdemir, M.; Birigen, G.; Loker, M. Effects of geographical origin and variety on vitamin and mineral composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey. *Food Chem.* **1999**, *65*, 309-313.
- Ahmed, M.K.; Daun, J.K.; Przybylski, R. FT-IR based methodology for quantitation of total tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8 in vegetable oils. *J. Food Compos. Anal.* **2005**, *18*, 359-364.
- Akintayo; E.T. Characteristics and composition of *Parkia biglobbosa* and *Jatropha curcas* oils and cakes. *Bioresource Technol.* **2004**, *92*, 307-310.
- Álamo, R.M.R.; Fregapane, G.; Aranda, F.; Gómez-Alonso, S.; Salvador, M.D. Sterol and alcohol composition of Cornicabra virgin olive oil: the campesterol content exceeds the upper limit of 4% established by EU regulations. *Food Chem.* **2004**, *84*, 533-537.
- Alamprese, C.; Pompei, C. Influence of processing variables on some characteristics of nocino liqueur. *Food Chem.* **2005**, *92*, 203-209.
- Alasalvar, C.; Shahidi, F.; Ohshima, T.; Wanasundara U.; Yurttas, H.C.; Liyanapathirana, C.M.; Rodrigues F.B. Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). 2. Lipid characteristics and oxidative stability. *J. Agric. Food Chem.* **2003a**, *51*, 3797-3805.
- Alasalvar, C.; Shahidi, F.; Cadwallader, K. R. Comparison of natural and roasted Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.) volatiles and flavor by DHA/GC/MS and descriptive sensory analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2003b**, *51*, 5067-5072.
- Albert, C.M.; Gaziano, M.; Willett, W.C., Manson; J.E. Nut consumption and decreased risk of sudden cardiac death in the physicians health study. *Arch. Intern. Med.* **2002**, *162*, 1382-1387.
- Almario, R.U.; Vonghavaravat, V.; Wong, R.; Kasim-Karakas, S.E. Effects of walnut consumption on plasma fatty acids and lipoproteins in combined hyperlipidemia. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *74*, 72-79.

Al-Saghir, S.; Thurner, K.; Wagner, K.-H.; Frisch, G.; Luf, W.; Razzazi-Fazeli, E.; Elmadfa, I. Effects of different cooking procedures on lipid quality and cholesterol oxidation of farmed salmon fish (*Salmo salar*). *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5290-5296.

Al-Saqer, J.M.; Sidhu, J.S.; Al-Hooti, S.N.; Al-Amiri, H.A.; Al-Othman, A.; Al-Haji, L.; Ahmed, N.; Mansour, I.B.; Minal, J. Developing functional foods using red palm olein. IV. Tocopherols and tocotrienols. *Food Chem.* **2004**, *85*, 579-583.

Alves, M.R.; Oliveira, M.B. Interpolative biplots applied to principal component analysis and canonical correlation analysis. *J. Chemometr.* **2003**, *17*, 1-9.

Alves, M. R.; Casal, S.; Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, M.A. Contribution of FA profile obtained by high-resolution GC/chemometric techniques to the authenticity of green coffee varieties. *JAOAC* **2003**, *80*, 511-517.

Alves, M.R.; Oliveira, M.B. Predictive and interpolative biplots applied to canonical variate analysis in the discrimination of vegetable oils by their fatty acid composition. *J. Chemometr.* **2004**, *18*, 393-401.

Alves, M.R.; Cunha, S.C.; Amaral, J.S.; J.A. Pereira; Oliveira, M.B. Classification of PDO Olive oils on the basis of their sterol composition by multivariate analysis. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *549*, 166-178.

Andrade, P.; Ferreres, F.; Amaral, M.T. Analysis of honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **1997**, *20*, 2281-2288.

Andrade, P.B.; Seabra, R.M.; Valentão, P.; Areias, F. Simultaneous determination of flavonoids, phenolic acids, and coumarins in seven medicinal species by HPLC/Diode-Array detector. *J. Liq. Chrom. R. T.* **1998a**, *21*, 2813-2820.

Andrade, P.B.; Leitão, R.; Seabra, R.M.; Oliveira, M.B.; Ferreira, M.A. 3,4-Dimethoxycinnamic acid level as a tool for differentiation of *Coffea canephora* var. *robusta* and *Coffea Arabica*. *Food Chem.* **1998b**, *61*, 511-514.

Andrade, P.B.; Seabra, R.M. Phenolic compounds, analysis by HPLC. In *Encyclopedia of Chromatography*, Marcel Dekker: New York, **2003**.

Andrikopoulos, N. K. Chromatographic and spectroscopic methods in the analysis of triacylglycerol species and regiospecific isomers of oils and fats. *Crit. Rev. Food Sci.* **2002**, *42*, 473-505.

AOAC. In *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th Edition, Vol. II, 40. William Horwitz Ed., AOAC: Arlington, VA, **2000**.

- Aparicio, R.; Aparicio-Ruiz, R. Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 93-104.
- Areias, F.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Ferreres, F.; Seabra, R.M. Flavonoids and phenolic acids from Sage: influence of some agricultural factors. *J. Agric. Food Chem.* **2000a**, *48*, 6081-6084.
- Areias, F.M.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Ferreres, F.; Seabra, R.M. Phenolic fingerprint of peppermint leaves. *Food Chem.* **2001**, *73*, 307-311.
- Areias, F.M.; Valentão, P.; Andrade, P.B.; Moreira, M.M.; Amaral, J.; Seabra, R. HPLC/DAD analysis of phenolic compounds from Lavender and its application to quality control. *J. Liq. Chrom. R. T.* **2000b**, *23*, 2563-2572.
- Awad, A.B.; Herrmann, T.; Fink, C.S.; Horvath, P.J. 18:1n7 fatty acids inhibit growth and decrease inositol phosphate release in HT-29 cells compared to n9 fatty acids. *Cancer Lett.* **1995**, *91*, 55-61.
- Ayorinde, F.O.; Eribo, B.E.; Balana, K.V.; Johnson, J.H.; Wan, L.W. Determination of major triacylglycerol components of polyunsaturated specialty oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 937-942.
- Azzi, A.; Stocker, A. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog. Lipid Res.* **2000**, *39*, 231-255.
- Bada, J.C.; León-Camacho, M.; Prieto, M.; Alonso, L. Characterization of oils of hazelnut from Asturias, Spain. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 294-300.
- Barrera-Arellano, D; Ruiz-Méndez, V.; Velasco, J.; Márquez-Ruiz G.; Dobarganes, C. Loss of tocopherols and formation of degradation compounds at frying temperatures in oils differing in degree of unsaturation and natural antioxidant content. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, *82*, 1696-1702.
- Benitez-Sánchez, P.L.; León-Camacho, M.; Aparicio, R. A comprehensive study of hazelnut oil composition with comparisons to other vegetable oils, particularly olive oil. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *218*, 13-19.
- Bergougnoux, F.; Germain, E.; Sarraquigne, J.P. In *Le Noisetier, production et culture*. CTIFL Ed.; Inluvec: Paris, **1978**.
- Bernardo-Gil, M.G.; Grenha, J.; Santos, J.; Cardoso, P. Supercritical fluid extraction and characterisation of oil from hazelnut. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, *104*, 402-409.
- Blanch, G.P.; Caja, M.M.; Castillo, M.L.R.; Herraiz, M. Comparison of different methods for the evaluation of the authenticity of olive oil and hazelnut oil. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3153-3157.
- Box, G.; Hunter, W.; Hunter, J. In *Statistics for Experimenters*. Wiley: New York, **1978**.

Bramley, P.M.; Elmadfa, I.; Kafatos, A.; Kelly, F.J.; Manios, Y.; Roxborough, H.E.; Schuch, W.; Sheehy, P.J.A.; Wagner, K.H. Review: Vitamin E. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 913-938.

Brandsteterová, E.; Ziaková-Caniová, A. Phenolic Acids in natural Plants. In *Encyclopedia of Chromatography*, Marcel Dekker: New York, US, **2003**.

Bray, J.H.; Maxwell, S.E. Multivariate analysis of variance. A Sage University Paper, Series: Quantitative applications in the social sciences, **1985**, *54*, 27-29.

Breinholder, P.; Mosca, L.; Lindner, W. Concept of sequential analysis of free and conjugated phytosterols in different plant matrices. *J. Chromatogr. B* **2002**, *777*, 67-82.

Brenes, M.; Garcíä, A; Dobarganes, MC; Velasco, J; Romero, C. Influence of thermal treatments simulating cooking processes on the polyphenol content in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5962-5967.

Broncz, I. Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *465*, 1-37.

Bruneton, J. In *Pharmacognosie phytochimie, plantes médicinales*. Tec. & Doc.- Lavoisier: Paris, **1993**.

Bruni, R.; Medici, A.; Guerrini, A.; Scalia, S.; Poli, F.; Romagnoli, C.; Muzzoli, M.; Sacchetti, G. Tocopherol, fatty acids and sterol distributions in wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* (Sterculiaceae) seeds. *Food Chem.* **2002**, *77*, 337-341.

Buchgraber, M.; Ulberth, F.; Emons, H.; Anklam, E. Triacylglycerol profiling by using chromatographic techniques. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 621-648.

Campbell, S.; Stone, W.; Whaley, S.; Krishnan, K. Development of gamma (γ)-tocopherol as a colorectal cancer chemopreventive agent. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* **2003**, *47*, 249-259.

Cardon, D.; Chatenet, G. In *Guide des teintures naturelles*. Delachaux et Niestlé: Lausanne, **1990**.

Caristi, C.; Bellocco, E.; Panzera, V.; Toscano, G.; Vadala, R.; Leuzzi, U. Flavonoids detection by HPLC-DAD-MS-MS in lemon juices from sicilian cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3528-3534.

Casas, J.S.; Bueno, E.O.; García, M.M.; Cano, M.M. Sterol and erythodiol + uvaol content of virgin olive oils from cultivars of Extremadura (Spain). *Food Chem.* **2004**, *87*, 225-230.

Cercaci, L.; Rodriguez-Estrada, M.T.; Lercker, G. Solid-phase extraction-thin-layer chromatography-gas chromatography methos for the detection of hazelnut oil in olive oils by determination of esterified sterols. *J. Chromatogr. A* **2003**, *985*, 211-220.

Charlot, G., Germain, E. In *Le Noyer Nouvelles techniques*. CTIFL: Paris, **1988**.

Chen, S. Evaporative light scattering detection for liquid chromatography. In *Encyclopedia of Chromatography*, Marcel Dekker: New York, **2003**.

Chisholm, A.; Mann, J.; Skeaff, M.; Frampton, C.; Sutherland, W.; Duncan A.; Tiszavari S. A diet rich in walnuts favourably influences plasma fatty acid profile in moderately hyperlipidaemic subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1998**, *52*, 12-16.

Christie, W.W. **2005**. (URL: www.lipidlibrary.co.uk) (consultado em Setembro 2005)

Christopoulou, E.; Lazaraki, M.; Komaitis, M.; Kaselimis, K. Effectiveness of determination of fatty acids and triglycerides for the detection of adulteration of olive oils with vegetable oils. *Food Chem.* **2004**, *84*, 463-474.

Chu, Y.; Sun, J.; Wu, X.; Liu, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6910-6916.

Cichon, R.M. Lipids in Human nutrition. In *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*. Sikorski, Z.E.; Kolakowska, A. Eds; CRC Press: Boca Raton, US, **2003**.

Cioffi, G.; D'Auria, M.; Braca, A.; Mendez, J.; Castillo, A.; Morelli, I.; De Simone, F.; De Tommasi, N. Antioxidant and free-radical scavenging activity of constituents of the leaves of *Tachigalia paniculata*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1526-1529.

Clifford, M.N.; Johnston, K.L.; Knight, S.; Kuhnert, N. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2900-2911.

Clifford, M.N.; Kellard B.; Birch, G.G. Characterisation of chlorogenic acids by simultaneous isomerisation and transesterification with tetramethylammonium hydroxide. *Food Chem.* **1989**, *33*, 115-123.

Clifton, P.M.; Keogh, J.B.; Noakes, M. Trans fatty acids in adipose tissue and the food supply are associated with myocardial infarction. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 874-879.

Comissão das Comunidades Europeias. Commission Staff Working Paper, Analysis of the nut sector. In *SEC (2002) 797*, Bruxelas, **2002**.

Costa, A. F. In *Farmacognosia*, vol. I. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, **1975**.

Crews, C., Hough, P., Godward, J., Brereton, P., Lees, M., Guiet, S., Winkelmann, W. Study of the main constituents of some authentic hazelnut oils. *J. Agric. Food Chem.* **2005a**, *53*, 4843-4852.

Crews, C.; Hough, P.; Godward, J.; Brereton, P.; Lees, M.; Guiet, S.; Winkelmann, W. Study of the main constituents of some authentic walnut oil. *J. Agric. Food Chem.* **2005b**, *53*, 4853-4860.

Cunha, A.P.; Pereira, A. In *Plantas e produtos vegetais em fitoterapia*. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, **2003**.

Cunha, S.C.; Oliveira, M.B.P.P. Discrimination of vegetable oils by triacylglycerols evaluation of profile using HPLC/ELSD. *Food Chem.* **2006**, *95*, 518-524.

Dashti, N.; Feng, Q.; Freeman, M.R.; Gandhi, M.; Franklin F.A. *Trans* polyunsaturated fatty acids have more adverse effects than saturated fatty acids on the concentration and composition of lipoproteins secreted by Human hepatoma HepG2 cells. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 2651-2659.

Delgado-Zamarreno, M.M.; Bustamante-Rangel, M.; Sanchez-Perez, A.; Hernandez-Mendez, J. Analysis of vitamin E isomers in seeds and nuts with and without coupled hydrolysis by liquid chromatography and coulometric detection. *J. Chromatogr. A* **2001**, *935*, 77-86.

Delgado-Zamarreño, M.M.; Bustamante-Rangel, M.; Sánchez-Pérez, Carabias-Martínez, R. Pressurized liquid extraction prior to liquid chromatography with electrochemical detection for the analysis of vitamin E isomers in seeds and nuts. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1056*, 249-252.

DellaPenna, D. A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. *J. Plant Physiol.* **2005**, *162*, 729-737.

Demir, A.D.; Baucour, P.; Cronin, K.; Abodayeh, K. Analysis of temperature variability during the thermal processing of hazelnuts. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2003**, *4*, 69-84.

Demir, A.D.; Celayeta, J.M.F.; Cronin, K.; Abodayeh, K. Modelling of the kinetics of colour change in hazelnuts during air roasting. *J. Food Eng.* **2002**, *55*, 283-292.

Department of Agriculture (USDA) and Department of Health and Human Services (HHS). Dietary Guidelines for Americans 2005, **2005**.

(URL: www.health.gov/dietaryguidelines/dga2005/document; consultado em Setembro 2005)

deVries, J.H.M.; Jansen, A.; Kromhout, D.; van de Bovenkamp, P.; van Staveren, W.A.; Mensink, R.P.; Katan, M.D. The fatty acid and sterol content of food composites of middle-aged men in seven countries. *J. Food Compos. Anal.* **1997**, *10*, 115-141.

Direcção Geral de Saúde, **2005**. (URL: www.dgsaude.pt/, consultado em Setembro 2005)

Dobson, G. Analysis of fatty acids in functional foods with emphasis on ω -3 fatty acids and conjugated linoleic acid. In *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. Hurst, W.J. Ed.; CRC Press: Boca Raton, US, **2002**.

Durak, I.; Koksal, I.; Kaçmaz, M.; Buyukkoçak, S.; Çimen, B.M.Y.; Ozturk, H.S. Hazelnut supplementation enhances plasma antioxidant potential and lowers plasma cholesterol levels. *Clin. Chim. Acta* **1999**, *284*, 113-115.

Eitenmiller, R.R.; Landen, W.O. Vitamin E Tocopherols and Tocotrienols. In *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*. Eitenmiller, R.R.; Landen, W.O., Eds., CRC Press: Boca Raton, US, **1998**.

Escrivá, M.; Esteve, J.; Farré, R.; Frigola, A. Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, *947*, 313-318.

Eskin, N.A.M.; Przybylski, R. Antioxidants and Shelf Life of Foods. In *Food Shelf Life Stability: Chemical, Biochemical, and Microbiological Changes*. Eskin, N.A.M.; Robinson, D.S., Eds., CRC Press: Boca Raton, US, **2001**.

Evans, R.J. Optimizing lipid stability with natural antioxidants. In *Natural Antioxidants. Chemistry, Health Effects, and Applications*. Shahidi, F., Ed., AOCS Press: Champaign, Illinois, US, **1997**.

Food and Agriculture Organization (FAO), FAOSTAT data. [http:// faostat.fao.org/faostat](http://faostat.fao.org/faostat) (última atualização em Fevereiro de 2005; consultado em Agosto de **2005**).

Farmacopeia Francesa, 10^a Edição, **1989**.

Feldman, E.B. LSRO Report: the scientific evidence for a beneficial health relationship between walnuts and coronary heart disease. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 1062S-1101S.

Fellows, P. Roasting and Baking. In *Food Processing Technology, Principles and Practice, Second Edition*. CRC Press: Boca Raton, US, **2000**.

Fieldson, A.F.; Morrison, J.I.L. Climatic conditions during seed growth significantly influence oil content and quality in winter and spring evening primrose crops (*Oenothera* spp.). *Ind. Crop. Prod.* **2000**, *12*, 137-147.

Firestone, D. Liquid chromatographic method for determination of triglycerides in vegetable oils in terms of their partition numbers: summary of collaborative study. *J. AOAC. Int.* **1994**, *77*, 954-957.

Firestone, D.; Reina, R.J. Authenticity of vegetable oils. In *Food authentication*. Ashurst, P.R.; Dennis, M.J., Eds., Chapman & Hall: London, **1996**.

Food and Drug Administration. Rules and Regulations, Federal Register **2000**, Volume 65, Number 175, 54686-54739. (URL: http://www.access.gpo.gov/su_docs/fedreg/a000908c.html, consultado em Setembro 2005).

Forde, H.I. Walnuts. In *Advances in fruit breeding*. Janick, J.; Moore, J.N, Eds., Purdue University Press: West Lafayette, p. 439-455, **1975**.

Fraisse, D.; Carnat, A.; Carnat, A.P.; Lamaison, J.L. Standardization of the hazel leaf. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **1999**, *57*, 406-409.

Fraser, G.E.; Linsted, K.D.; Beeson, W.L. Effect of risk factor values on lifetime risk of and age at first coronary event: the Adventist Health Study. *Am. J. Epidemiol.* **1995**, *42*, 746-758.

Fraser, G.E.; Sabaté, J.; Beeson, W.L.; Strahan, M. A possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease. *Arch. Intern. Med.* **1992**, *152*, 1416-1424.

Fuentes, F.; Lopez-Miranda, J.; Delgado, J.; Fernandez-Puebla, R.; Lucena, M.; Arias, M.; Pérez, P.; Gómez, P.; Paniagua, J.; Pérez-Jimenez, F. A high-mufa mediterranean diet prevents endothelial dysfunction during postprandial lipemia. *Atherosclerosis Supp.* **2004**, *5*, 67-67.

Fujisaki, M.; Mohri, S.; Endo, Y.; Fujimoto, K. The effect of oxygen concentration on oxidative deterioration in heated high-oleic safflower oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, *77*, 231-234.

Gama, P.; Casal, S.; Oliveira, B.; Ferreira, M.A. Development of an HPLC/diode-array/ fluorimetric detector method for monitoring tocopherols and tocotrienols in edible oils. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **2000**, *23*, 3011-3022.

García-Lorda, P.; Megias Rangil, I.; Salas-Salvado, J. Nut consumption, body weight and insulin resistance. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2003**, *57*, S8-S11.

Gillen, L.J.; Tapsell, L.C. ; Patch, C.S. ; Owen, A.; Batterham, M. Structured dietary advice incorporating walnuts achieves optimal fat and energy balance in patients with type 2 *Diabetes Mellitus*. *J. Am. Diet. Assoc.* **2005**, *105*, 1087-1096.

Gimeno, E.; Calero, E.; Castellote, A.I.; Lamuela-Raventós, R.M.; de la Torre, M.C.; López-Sabater, M.C. Simultaneous determination of α -tocopherol and β -carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 255-259.

Gîrzu, M.; Carnat, A.; Privat, A.M.; Fialip, J.; Carnat, A.P.; Lamaison, J.L. Sedative effect of walnut leaf extract and juglone, an isolated constituent. *Pharm Biol.* **1998**, *36*, 280-286.

Gliszczynka-Swiglo, A.; Sikorska, E. Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1048*, 195-198.

González, A.G.; Pablos, F.; Martin, M.J.; León-Camacho, M.; Valdenebro, M.S. HPLC analysis of tocopherols and triglycerides in coffee and their use as authentication parameters. *Food Chem.* **2001**, *73*, 93-101.

Gordon, M.H. Fats. Classification. In *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. Woollard, D.C.; Indyk, H.E., Eds., Academic Press: London, UK, **2003**.

Gower, J.C.; Hand, D.J. In *Biplots*. Chapman and Hall: London, **1996**.

Greyt, W.F.; Petrauskaitė, V.; Kellens, M.; Huyghebaert, A.D. Analysis of tocopherols by gas-liquid and high-performance liquid chromatography: a comparative study. *Fett/Lipid* **1998**, *100*, 503-507.

- Gutnikov, G. Fatty acid profiles of lipid samples. *J. Chromatogr. B* **1995**, *671*, 71-89.
- Hall III, C. Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. In *Antioxidantes in food. Practical applications*. Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M., Eds., CRC Press: Boca Raton, US, **2001**.
- Hallikainen, M.A., Uusitupa, M.I.J. Effects of 2 low-fat stanol ester-containing margarines on serum cholesterol concentrations as part of a low-fat diet in hypercholesterolemic subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, *69*, 403-410.
- Harborne, J.B. General procedures and measurement of total phenolics. In *Methods in plant biochemistry, vol. I: plant phenolics*. Dey, P.M.; Harborne, J.B., Eds., Academic Press: London, UK, **1989**.
- Hensley, K.; Benaksas, E.J.; Bolli, R.; Comp, P.; Grammas, P.; Hamdheydari, L.; Mou, S.; Pye, Q. N.; Stoddard, M.F.; Wallis, G.; Williamson, K.S.; West, M.; Wechter, W.J.; Floyd, R.A. New perspectives on vitamin E: γ -tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radical Med.* **2004**, *36*, 1-15.
- Hepburn, P.A.; Horner, S.A.; Smith, M. Safety evaluation of phytosterol esters. Part 2. Subchronic 90-day oral toxicity study on phytosterol esters - a novel functional food. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, *37*, 521-532.
- Hertog, M.G.L.; Feskens, E.J.M.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *The Lancet* **1993**, *342*, 1007-1011.
- Hertog, M.G.L.; Kromhout, D.; Aravanis, C.; Blackburn, H.; Buzina, R.; Fidanza, F.; Giampaoli, S.; Jansen, A.; Menotti, A.; Nedeljkovic, S.; Pekkarinen, M.; Simic, B.S.; Toshima, H.; Feskens, E.J.M.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries study. *Arch. Intern. Med.* **1995**, *155*, 381-386.
- Hewavitharana, K. Simple solutions to problems encountered in quantitative analysis of tocopherols and tocotrienols using silica columns. *Anal. Biochem.* **2003**, *313*, 342-344.
- Hewavitharana, K.; Lanari, M.C.; Becu, C. Simultaneous determination of Vitamin E homologs in chicken meat by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1025*, 313-317.
- Holcapek, M.; Jandera, P.; Zderadicka, P.; Hrubá, L. Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1010*, 195-215.

Holland, B.; Welch, A.A.; Unwin, I.D.; Buss, D.H.; Paul, A.A.; Southgate, D.A.T. In *The composition of Foods*, McCance and Widdowson's Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, London, UK, **1991**.

Holownia, K.I.; Erickson, M.C.; Chinnan, M.S.; Eitenmiller, R.R. Tocopherol losses in peanut oil during pressure frying of marinated chicken strips coated with edible films. *Food Res. Int.* **2001**, *34*, 77-80.

Hosmer, D.W.; Lemeshow, S. In *Applied Logistic Regression*, Wiley: Chichester, UK, **1989**.

Hu, F.B.; Stampfer, M.J.; Manson, J.E.; Rimm, E.B.; Colditz, G.A.; Rosner, B.A.; Speizer, F.E.; Hennekens, C.H.; Willett, W.C. Frequent nut consumption and risk of coronary heart disease in women: prospective cohort study. *Br. Med. J.* **1998**, *317*, 1341-1345.

Institute of Medicine of the National Academies (IOM). Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (macronutrients). The National Academies Press: Washington D.C, **2005**.

Instituto Nacional de Estatística de Portugal (INE), **2003**. (URL: <http://www.ine.pt/>, consultado em Agosto de 2005)

Instituto Português de Meteorologia. (URL: <http://web.meteo.pt/previsao/inicial.jsp>; consultado: Setembro, **2005**).

IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. The Nomenclature of Lipids. *J. Lipid Res.* **1967**, *8*, 523-528.

Iwamoto, M.; Imaizumi, K.; Sato, M.; Hirooka, Y.; Sakai, K.; Takeshita A.; Kono M. Serum lipid profiles in Japanese women and men during consumption of walnuts. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2002**, *56*, 629-637.

Iwamoto, M.; Sato, M.; Imaizumi, K.; Hirooka, Y.; Sakai, K.; Takeshita A.; Imaizumi, K. Walnuts lower serum cholesterol in Japanese men and women. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 171-176.

Iwashina, T. The structure and distribution of flavonoids in plants. *J. Plant Res.* **2000**, *113*, 287-299.

Johnson, I.T. Antioxidants and antitumour properties. In *Antioxidantes in food. Practical applications*. Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M., Eds., CRC Press: Boca Raton, US, **2001**.

Jong, A.; Plat, J.; Mensink, R.P. Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *J. Nutr. Biochem.* **2003**, *14*, 362-369.

- Kamal-Eldin, A.; Gorgen, S.; Petterson, J.; Lampi, A. Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols: Comparison of different chromatographic columns. *J. Chromatogr. A*, **2000**, *881*, 217-227.
- Kamm, W.; Dionisi, F.; Hischenhuber, C.; Engel, K. Authenticity assessment of fats and oils. *Food Rev. Int.* **2001**, *17*, 249-290.
- Khor, H.T.; Chieng, D.Y. Effect of dietary supplementation of tocotrienols and tocopherols on serum lipids in the hamster. *Nutr. Res.* **1996**, *16*, 1393-1401.
- Kirbaslar, F.G.; Erkmen, G. Investigation of the effect of roasting temperature on the nutritive value of hazelnuts. *Plant Food Human Nut.* **2003**, *58*, 1-10.
- Ko, S.; Kim, C.J.; Kim, C.T.; Kim, H.; Chung, S.H.; Lee, S.M.; Yoon, H.H.; Kim, I.H. Changes of vitamin e content in rice bran with different heat treatment. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2003**, *105*, 225-228.
- Kohler, M.; Haerdi, W. The evaporative light scattering detector: some applications in pharmaceutical analysis. *Trends in analytical chemistry* **1997**, *16*, 475-484
- Kris-Etherton, P.M.; Pearson, T.A.; Wan, Y.; Hargrove, R.L.; Moriarty, K.; Fishell, V.; Etherton, T.D. High monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, *70*, 1009-1015.
- Kritchevsky, D. *Trans* fatty acids and cardiovascular risk. *Prostag. Leukotr. Ess.* **1997**, *57*, 399-402.
- Kritchevsky, D.; Chen, S.C. Phytosterols - health benefits and potential concerns: a review. *Nutr. Res.* **2005**, *25*, 413-428.
- Kushi, L.H.; Folsom, A.R.; Prineas, R.J.; Mink, P.J.; Wu, Y.; Bostick, R.M. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 1156-1162.
- Lagerstedt, H.B. Filberts. In *Advances in fruit breeding*. Janick, J.; Moore, J.N, Eds., Purdue University Press: West Lafayette, p. 456-489, **1975**.
- Langourieux, S.; Perren, R.; Escher, F. Influence of processing parameters on the aroma of dry-roasted hazelnuts. In *Frontiers of flavour science: Proceedings of the ninth Weurman flavour research symposium*. Schieberle, P.; Engel, K.H., Ed., Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie: Germany, **2000**, p. 527-535.
- Lauritzen, L.; Hansen, H.S.; Jürgensen, M.H.; Michaelsen K.F. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Progr. Lipid Res.* **2001**, *40*, 1-94.

Lavendrine, F.; Ravel, A.; Poupard, A.; Alary, J. Effect of geographic origin, variety and storage on tocopherol concentrations in walnuts by HPLC. *Food Chem.* **1997**, *58*, 135-140.

Lee, D.; Lee, E.; Kim, H.; Kim, S.; Kim, K. Reversed phase liquid chromatographic determination triacylglycerol composition in sesame oils and the detection of adulteration. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *429*, 321-330.

Lee, Y.; Oh, S.; Chang, J.; Kim, I. Chemical composition and oxidative stability of safflower oil prepared from safflower seed roasted with different temperatures. *Food Chem.* **2004**, *84*, 1-6.

Li, D.; Saldeen, T.; Mehta, J.L. γ -Tocopherol decreases Ox- LDL-mediated activation of nuclear factor- κ B and apoptosis in human coronary artery endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *259*, 157-161.

Ling, W.H.; Jones, P.J.H. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci.* **1995**, *57*, 195-206.

Llorach, R.; Gil-Izquierdo, A.; Ferreres, F.; Tomas-Barberan, F.A. HPLC-DAD-MS/MS ESI characterization of unusual highly glycosylated acylated flavonoids from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) agroindustrial byproducts. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3895-3899.

Lopes, C.; Casal, S.; Oliveira, B.; Barros, H. Retinol, beta-carotene and alpha-tocopherol in heart disease. In *Nutrition and Heart Disease. Causation and Prevention*; Watson, R.R., Preeedy, V.R., Eds.; CRC Press: Boca Raton, US, **2004**.

López-Díez, E.C.; Bianchi, G.; Goodacre, R. Rapid quantitative assessment of the adulteration of virgin olive oils with hazelnut oils using raman spectroscopy and chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6145-6150.

López-Miranda, J.; Fuentes, F.; Sánchez, F.; Gómez, P.; Paz, E.; Martínez, P.P.; Marin, C.; Castro, P.; Ordovás, J.M.; Pérepez, J.J.; Pérez-Jiménez F. Mediterranean diet, high in monounsaturated-fat and a low fat diet improve endothelial function in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* **2000**, *151*, 214-215.

Määttä, K.; Lampi, A.M.; Petterson, J.; Fogelfors, B.M.; Piironen, V.; Kamal-Eldin, A. Phytosterol content in seven oat cultivars grown at three locations in Sweden. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 1021-1027.

Macheix, J.J.; Fleuriet, A.; Billot, J. In *Fruit phenolics*. CRC Press: Boca Raton, Florida, **1990**.

Mannina, L.; Dugo, G.; Salvo, F.; Cicero, L.; Ansenelli, G.; Calgagni, C.; Segre, A. Study of the cultivar-composition relationship in sicilian olive oils by GC, NMR, and statistical methods. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 120-127.

Megahed, M.G. Microwave roasting of peanuts: Effects on oil characteristics and composition. *Nahrung/Food* **2001**, *45*, 255- 257.

- Meirinhos, J.; Silva, B.M.; Valentão, P.; Seabra, R.M.; Pereira, J.A.; Dias, A.; Andrade, P.B.; Ferreres, F. Analysis and quantification of flavonoidic compounds from Portuguese olive (*Olea Europaea* L.) leaf cultivars. *Nat. Prod. Res.* **2005**, *19*, 189-195.
- Merken, H.M.; Beecher, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 577-599.
- Miller, N.J.; Ruiz-Larrea, M.B. Flavonoids and other plant phenols in the diet: their significance as antioxidants. *J. Nutr. Environm. Med.* **2002**, *12*, 39-51.
- Mishima, K.; Tanaka, T.; Pu, F.; Egashira, N.; Iwasaki, K.; Hidaka, R.; Matsunaga, K.; Takata, J.; Karube, Y.; Fujiwara, M. Vitamin E isoforms α -tocotrienol and γ -tocopherol prevent cerebral infarction in mice. *Neurosci. Lett.* **2003**, *337*, 56-60.
- Moghadasian, M.H. Pharmacological properties of plant sterols. In vivo and in vitro observations. *Life Sci.* **2000**, *67*, 605-615.
- Moghadasian, M.H.; Frohlich, J.J. Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: Clinical and experimental evidence. *Am. J. Med.* **1999**, *107*, 588-594.
- Moghadasian, M.H.; McManus, B.M.; Pritchard, P.H.; Frohlich, J.J. Tall oil-derived phytosterols reduce atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1997**, *17*, 119- 26.
- Mohamed, H.M.A.; Awatif, I.I. The use of sesame oil unsaponifiable matter as a natural antioxidant. *Food Chem.* **1998**, *62*, 269-276.
- Moreau, R.A.; Whitaker, B.D.; Hicks, K.B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progr. Lipid Res.* **2002**, *41*, 457-500.
- Morgan, J.M.; Horton, K.; Reese, D.; Carey, C.; Walker, K.; Capuzzi, D.M. Effects of walnut consumption as part of a low-fat, lowcholesterol diet on serum cardiovascular risk factors. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2002**, *72*, 341-347.
- Muñoz, S.; Merlos, M.; Zambón, D.; Rodríguez, C.; Sabaté, J.; Ros, E.; Laguna, J.C. Walnut-enriched diet increases the association of LDL from hypercholesterolemic men with human HepG2 cells. *J. Lipid Res.* **2001**, *42*, 2069-2076.
- Murkovic, M.; Piironen, V.; Lampi, A.M.; Kraushofer, T.; Sontag, G. Changes in chemical composition of pumpkin seeds during the roasting process for production of pumpkin seed oil (Part 1: non-volatile compounds). *Food Chem.* **2004**, *84*, 359-365.
- Myher, J.J.; Kuksis, A. General strategies in chromatographic analysis of lipids. *J. Chromatogr. B* **1995**, *671*, 3-33.

Naes, T.; Indhal, U. A unified description of classical classification methods for multicollinear data. *J. Chemometr.* **1998**, *12*, 205-220.

Naito, Y.; Shimosawa, M.; Kuroda, M.; Nakabe, N.; Manabe, H.; Katada, K.; Kokura, S.; Ichokawa, H.; Yosida, N.; Noguchi, N.; Yoshikawa, T. Tocotrienols reduce 25-hydroxycholesterol-induced monocyte-endothelial cell interaction by inhibiting the surface expression of adhesion molecules. *Atherosclerosis* **2005**, *180*, 19-25.

Nakamura, M.T.; Cheon, Y.; Li, Y.; Nara, T.Y. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids* **2004**, *39*, 1077-1083.

Neff, W.E.; List, G.R.; Byrdwell, W.C. Quantitative composition of high palmitic and stearic acid soybean oil triacylglycerols by reversed phase high performance liquid chromatography: utilization of evaporative light scattering and flame ionization detectors. *J. Liq. Chrom. R. T.* **1999**, *22*, 1649-1662.

Nelis, H.J.; D'Haese, E.; Vermis, K.. Vitamin E. In *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins, 3rd Edition*. DeLeenheer, A.P.; Lambert, W.E.; Van Bocxlaer, J., Eds., Marcel Dekker: New York, **2000**.

Nesaretnam, K.; Ambra, R.; Selvaduray, K.R.; Radhakrishnan, A.; Reimann, K.; Razak, G.; Virgili, F. Tocotrienol-rich fraction from palm oil affects gene expression in tumors resulting from MCF-7 cell inoculation in athymic mice. *Lipids* **2004**, *39*, 459-67.

Neter, J.; Kutner, M.; Natchtsheim, C.; Wasserman, N. Correlation Analysis. In *Applied linear statistical models, 4th edition*. Irwin: Chicago, **1996**.

Niki E., Saito T., Kawakami A., Kamiya Y. Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 4177-4182.

Nogala-Kalucka, M. Fat-Soluble Vitamins. In *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*. Sikorski, Z.E.; Kolakowska, A., Eds.; CRC Press: Boca Raton, USA, **2002**.

NP EN ISO 12228. Animal and vegetable fats and oils – Determination of individual and total sterols contents – Gas chromatographic method, **1999**.

Okuyama, H.; Kobayashi, T.; Watanabe, S. Dietary fatty acids - the n-6/n-3 balance and chronic elderly diseases. Excess linoleic acid and relative n-3 deficiency syndrome seen in Japan. *Prog. Lipid Res.* **1997**, *35*, 409-457.

Oliveira, M.B.; Alves, M.R.; Ferreira, M.A. Multivariate analysis of fatty acids cis and trans isomers in margarines determined by HRGC/FID/capillary column. *J. Chemometrics* **2001**, *15*, 71-84.

Oliveira, M.B.P.P. Estudo de qualidade de lípidos alimentares. Toxicidade e avaliação dos teores de isómeros *trans* dos ácidos gordos insaturados. Tese de doutoramento. Porto, **1994**.

Ollivier, D.; Artaud, J.; Pinatel, C.; Burbec, J.P.; Guérère, M.J. Triacylglycerol and fatty acid compositions of french virgin olive oils. characterization by chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5723–5731.

Oomah, D.; Liang, J.; Godfrey, D.; Mazza, G. Microwave heating of grapeseed: effect on oil quality. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4017-4021.

Organização Mundial de Saúde (OMS). General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. World Health Organization, Geneva, **2000**.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Avoiding heart attacks and strokes: don't be a victim - protect yourself. World Health Organization, Geneva, **2005**.

(URL: www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/avoid_heart_attack_part2.pdf, consultado em Setembro, 2005).

Oomen, C.M., Ocké, M.C., Feskens, E.J.M.; van Erp-Baart, M.J.; Kok, F.J.; Kromhout, D. Association between trans fatty acid intake and 10-year risk of coronary heart disease in the Zutphen Elderly Study: a prospective population-based study. *Lancet* **2001**, *357*, 746–51.

Ozdemir, M.; Devres, O. The thin layer drying characteristics of hazelnuts during roasting. *J. Food Eng.* **1999**, *42*, 225-233.

Ozdemir, M.; Devres, O. Analysis of color development during roasting of hazelnuts using response surface methodology. *J. Food Eng.* **2000**, *45*, 17-24.

Ozdemir, F.; Açkurt, F.; Kaplan M.; Yildiz, M.; Loker, M.; Gurcan, T.; Birigen, G.; Okay, A.; Seyhan, F.G. Evaluation of new Turkish hybrid hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties: fatty acid composition, α -tocopherol content, mineral composition and stability. *Food Chem.* **2001a**, *73*, 411-415.

Ozdemir, M.; Açkurt, F.; Yildiz, M.; Biringen, G.; Gurcan, T.; Loker, M. Effect of roasting on some nutrients of hazelnuts (*Corylus avellana* L.). *Food Chem.* **2001b**, *73*, 185-190.

Ozdemir, F.; Akinci, I. Physical and nutritional properties of four major commercial Turkish hazelnut varieties. *J. Food Eng.* **2004**, *63*, 341–347.

Ozen, B.F.; Mauer, L.J. Detection of hazelnut oil adulteration using FT-IR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3898-3901.

Panfili, G.; Manzi, P.; Pizzoferrato, L. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of tocopherols, carotenes, and retinol and its geometric isomers in Italian cheeses. *Analyst*, **1994**, *119*, 1161-1165.

Panfili, G.; Fratianni, A.; Irano, M. Normal Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Cereals. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 3940-3944.

Parcerisa, J., Casals, I., Boatella, J., Codony, R., Rafecas, M. Analysis of olive and hazelnut oil mixtures by high-performance liquid chromatography of triacylglycerols and gas-liquid chromatography of non-saponifiable compounds (tocopherols and sterols). *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 149-158.

Parcerisa, J.; Boatella, J.; Codony, R.; Rafecas, M.; Castellote, A.I.; García, J.; López, A.; Romero, A. Comparison of fatty acid and triacylglycerol compositions of different hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.) cultivated in Catalonia (Spain). *J. Agric. Food Chem.* **1995a**, *43*, 13-16.

Parcerisa, J.; Codony, R.; Boatella, J.; Rafecas, M. Triacylglycerol and phospholipid composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) lipid fraction during fruit development. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1410-1415.

Parcerisa, J.; Rafecas, M.; Castellote, A.I.; Codony, R.; Farràn, A.; García, J.; López, A.; Romero, A.; Boatella, J. Influence of variety and geographical origin on the lipid fraction of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) from Spain: (II). Triglyceride composition. *Food Chem.* **1994**, *50*, 245-249.

Parcerisa, J.; Rafecas, M.; Castellote, A.I.; Codony, R.; Farràn, A.; García, J.; Gonzalez, C.; López, A.; Romero, A.; Boatella, J. Influence of variety and geographical origin on the lipid fraction of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) from Spain: (III) Oil stability, tocopherol content and some mineral contents (Mn, Fe, Cu). *Food Chem.* **1995b**, *53*, 71-74.

Parcerisa, J.; Richardson, D.G.; Rafecas, M.; Codony, R.; Boatella, J. Fatty acid distribution in polar and nonpolar lipid classes of hazelnut oil (*Corylus avellana* L.). *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3887-3890.

Parcerisa, J.; Richardson, D.G.; Rafecas, M.; Codony, R.; Boatella, J. Fatty acid, tocopherol and sterol content of some hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.) harvested in Oregon (USA). *J. Chromatogr. A* **1998**, *805*, 259-268.

Parikh, P.; McDaniel, M.C.; Ashen, M.D.; Miller, J.I.; Sorrentino, M.; Chan, V.; Blumenthal, R.S.; Sperling, L.S. Diets and cardiovascular disease, an evidence-based assessment. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2005**, *45*, 1379-87.

Peña, F.; Cárdenas, S.; Gallego, M.; Valcárcel, M. Direct olive oil authentication: Detection of adulteration of olive oil with hazelnut oil by direct coupling of headspace and mass spectrometry, and multivariate regression techniques. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1074*, 215-221.

Pereira, J.A.; Casal, S.; Bento, A.; Oliveira, M.B.P.P. Influence of olive storage period on oil quality of three portuguese cultivars of *Olea europea*, Cobrançosa, Madural, and Verdeal Transmontana. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6335-6340.

Pérez-Jiménez, F.; Castro, P.; López-Miranda, J.; Paz-Rojas, E.; Blanco, A.; López-Segura, F.; Velasco, F.; Marín, C.; Fuentes, F.; Ordovás, J.M. Circulating levels of endothelial function are

- modulated by dietary monounsaturated fat. *Atherosclerosis* **1999**, *145*, 351-358.
- Pérez-Jiménez, F.; López-Miranda, J.; Mata, P. Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: beyond cholesterol. *Atherosclerosis* **2002**, *163*, 385-398.
- Phillips, K.M.; Ruggio, D.M.; Toivo, J.I.; Swank, M.A.; Simpkins, A.H. Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. *J. Food Compos. Anal.* **2002**, *15*, 123-142.
- Piironen, V.; Lindsay, D.G.; Miettinen, T.A.; Toivo, J.; Lampi, A. Review. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 939-966.
- Pokorný, J. The impact of food processing in phytochemicals: the case of antioxidants. In *Phytochemical functional foods*. Johnson, I.; Williamson, G. Eds.; CRC Press: Florida, USA, **2003**.
- Pokorný, J. Natural antioxidant functionality during food processing. In *Antioxidants in food*. Pokorný, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. Eds.; CRC Press: Florida, USA, **2001**.
- Pons, S. M.; Bargalló, A.I.C.; Sabater, M.C.L. Analysis of human milk triacylglycerols by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection. *J. Chromatogr. A* **1998**, *823*, 475-482.
- Projecto Agro 162. *O incremento da produtividade da aveleira em Portugal*. Tipografia Guerra: Viseu, Portugal, *in press*.
- Pryor, W.A. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Rad. Biol. Med.* **2000**, *28*, 141-164.
- Psomiadou, E.; Tsimidou, M. Simultaneous HPLC determination of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5132-5138.
- Pyka, A.; Sliwiok, J. Chromatographic separation of tocopherols. *J. Chromatogr. A*, **2001**, *935*, 71.
- Quilez, J.; García-Lorda, P.; Salas-Salvado, J. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clin. Nutr.* **2003**, *22*, 343-351.
- Qureshi, A. A.; Bradlow, B. A.; Salser, W. A.; Brace, L. D. Novel tocotrienols of rice bran modulate cardiovascular disease risk parameters of hypercholesterolemic humans. *J. Nutr. Biochem.* **1997**, *8*, 290-298.
- Ramos, R.; Andrade, P.B.; Seabra, R.M.; Pereira, C.; Ferreira, M.A.; Faia, M.A. A preliminary study of non-coloured phenolics in wines of varietal white grapes (códega, gouveia and malvasia fina): effects of grape variety, grape maturation and technology of winemaking. *Food Chem.* **1999**, *67*, 39-44.

Regulamento CEE nº. 2568/91 da Comissão de 11 de Julho de 1991 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados, **1991**.

Riipi, M.; Ossipov, V.; Lempa, K.; Haukioja, E.; Koricheva, J.; Ossipova, S.; Pihlaja, K. Seasonal changes in birch leaf chemistry: are there trade-offs between leaf growth and accumulation of phenolics? *Oecologia* **2002**, 130, 380-390

R-Project 2005. R: A programming environment for data analysis and graphics. **2005**. (URL: <http://www.r-project.org/>).

Ruggeri, S.; Cappelloni, L.; Gambelli, S.; Carnovale, E. Chemical composition and nutritive value of nuts grown in Italy. *Ital. J. Food Sci.* **1998**, 3, 243-252.

Ruiz-Gutiérrez, V.; Barron, L.J.R. Methods for the analysis of Triacylglycerols. *J. Chromatogr. B* **1995**, 671, 133-168.

Rupérez, F.J.; Martín, D.; Herrera, E.; Barbas, C. Chromatographic analysis of R-tocopherol and related compounds in various matrices. *J. Chromatogr. A* **2001**, 935, 45-69.

Sabaté, J.; Fraser, G.E.; Burke, K.; Knutsen, S.; Bennett, H.; Lindsted, K.D. Effect of walnuts on serum lipid levels and blood pressure in normal men. *N. Engl. J. Med.* **1993**, 328, 603-607.

Sabaté, J. Nut consumption, vegetarian diets, ischemic heart disease risk, and all-cause mortality: evidence from epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, 70, 500S-503S.

Sabaté, J.; Radak, T.; Brown Jr., J. The role of nuts in cardiovascular disease prevention. In *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. Wildman, R., Ed., CRC Press: London, **2000**.

Sabaté, J. Nut consumption and body weight. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, 78, 647S-650S.

Sakakibara, H.; Honda, Y.; Nakagawa, S.; Ashida, H.; Kanazawa K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 571-581.

Saklar, S.; Urgan, S.; Katnas, S. Microstructural changes in hazelnuts during roasting. *Food Res. Int.* **2003**, 36, 19-23.

Salvador, M.D.; Aranda, F.; Gómez-Alonso, S.; Fregapane, G. Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. *Food Chem.* **2003**, 80, 359-366.

Sano, M.; Ernesto, C.; Thomas, R.G.; Klauber, M.R.; Schafer, K.; Grundman, M.; Woodbury, P.; Growden, J.; Cotman, D.W.; Pfeiffer, E.; Schneider, L.S.; Thal, L.J. A controlled trial of selegine, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *New Engl. J. Med.* **1997**, 336, 1216-1222.

- Savage, G.P.; Dutta, P.C.; McNeil, D.L. Fatty acid and tocopherol contents and oxidative stability of walnut oils. *JAOCS* **1999**, *76*, 1059-1063.
- Savage, G.P.; McNeil, D.L. Chemical composition of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) grown in New Zealand. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **1998**, *49*, 199-203.
- Savage, G.P.; McNeil, D.L.; Dutta, P.C. Lipid composition and oxidative stability of oils in hazelnuts (*Corylus avellana* L.) grown in New Zealand. *JAOCS* **1997**, *74*, 755-759.
- Schwenke, D.C. Does lack of tocopherols and tocotrienols put women at increased risk of breast cancer? *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 2-20.
- Scientific Committee on Food. Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Vitamin E. In *SCF/CS/NUT/UPPLEV/31 Final*, **2003**.
- Seabra R.M.; Alves, A.C. Flavonoids from *Hypericum* species. *Fitoterapia* **1990**, *61*, 146-147.
- Seybold, C.; Frohlich, K.; Bitsch, R.; Otto, K.; Bohm, V. Changes in contents of carotenoids and vitamin e during tomato processing. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7005-7010.
- Seppänen-Laakso, T.; Laakso, I.; Hiltunen, R. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *465*, 39-62.
- Shahidi, F. Phytochemicals in Oilseeds. In *Phytochemicals in nutrition and health*. Meskin, M.S.; Bidlack, W.R.; Davies, A.J.; Omaye, S.T. Eds.; CRC Press: Boca Raton, Florida, **2002**.
- Shankel, S.F.; Pettit, J. Expansion of a Nutrient Database with the "New" Vitamin E. *J. Food Comp. Anal.* **2004**, *17*, 371-378.
- Shi, H.; Noguchi, N. Introducing natural antioxidants. In *Antioxidants in food*. Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. Eds.; CRC Press: Boca Raton, Florida, **2001**.
- Silano, M.; Vincenzi, M.; Vincenzi, A.; Silano, V. The new European legislation on traditional herbal medicines: main features and perspectives. *Fitoterapia* **2004**, *75*, 107-116.
- Silva, B.M.; Andrade, P.B.; Mendes, G.C.; Valentão, P.; Seabra, R.M.; Ferreira, M.A. Analysis of phenolic compounds in the evaluation of commercial quince jam authenticity. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2853-2857.
- Sivam, G. Analysis of flavonoids. In *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. Hurst, W.J. Ed.; CRC Press: Boca Raton, USA, **2002**.
- Soelaiman, I.N.; Ahmad, N.S.; Khalid, B.A. Palm oil tocotrienol mixture is better than alpha-tocopherol acetate in protecting bones against free-radical induced elevation of bone-resorbing cytokines. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2004**, *13*, S111-S116.

Stefova, M.; Stafilov, T.; Kulevanova, S.; HPLC analysis of flavonoids. In *Encyclopedia of Chromatography*, Marcel Dekker: New York, **2003**.

Stobiecki, M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry* **2000**, *54*, 237-256.

Stolyhwo, A.; Colin, H.; Guiochon, G. Analysis of triglycerides in oils and fats by liquid chromatography with laser light scattering detector. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1342-1354.

Strychar, I.; Ishac, A.; Rivard, M.; Lussier-Cacan, S.; Beauregard, H.; Aris-Jilwan, N.; Radwan, F.; Yale, J. Impact of a high-monounsaturated-fat diet on lipid. Profile in subjects with type 1 diabetes. *J. Am. Diet Assoc.* **2003**, *103*, 467-474.

Tadmor, Y.; Larkov, O.; Meir, A.; Minkoff, M.; Lastochkin, E.; Edelstein, M.; Levin, S.; Wong, J.; Rocheford, T.; Lewinsohn, E. Reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of vitamin E components in maize kernels. *Phytochem. Anal.* **2000**, *11*, 370-374.

Taibi, G.; Nicotra, C.M.A. Development and validation of a fast and sensitive chromatographic assay for all-*trans*-retinol and tocopherols in human serum and plasma using liquid-liquid extraction. *J. Chromatogr. B* **2002**, *780*, 261-267.

Takahashi, K.; Loo, G. Disruption of mitochondria during tocotrienol-induced apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol.* **2004**, *67*, 315-324.

Therriault, A.; Chao, J.; Wang, Q.; Gapor, A.; Adeli, K. Tocotrienol: A review of its therapeutic potential. *Clin. Biochem.* **1999**, *32*, 309-319.

Tissut, M.; Egger, K. Les glycosides flavoniques foliaires de quelques arbres, au cours du cycle végétatif. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 631-634.

Trautwein, E.A.; Duchateau, G.S.M.J.E.; Lin, Y.; Mel'nikov, S.M.; Molhuizen, H.O.F.; Ntanos, F.Y. Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2003**, *105*, 171-185.

Tsamouris, G.; Hatziantoniou, S.; Demetzos, C. Lipid analysis of greek walnut oil (*Juglans regia* L.). *Z. Naturforsch.* **2002**, *57*, 51-56.

Tsao, R.; Deng, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidants phytochemicals. *J. Chromatogr. B* **2004**, *812*, 85-99.

Ulberth, F.; Buchgraber, M. Authenticity of fats and oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2000**, *102*, 687-694.

USDA Nutrient Database. URL: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/> (consultado em Janeiro de **2005**).

- Valentão, P.; Andrade, P.B.; Areias, F.; Ferreres, F.; Seabra, R.M. Analysis of Vervain flavonoids by HPLC/Diode Array detector method. Its application to quality control. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, *47*, 4579-4582.
- Valentão, P.; Fernandes, E.; Carvalho, F.; Andrade, P.B.; Seabra, R.M.; Bastos, M.L. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara Cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4989-4993.
- Valentão, P.; Dias, A.; Ferreira, M.; Silva, B.; Andrade, P.B.; Bastos, M.L.; Seabra, R.M. Variability in phenolic composition of *Hypericum Androsaemum*. *Nat. Prod. Res.* **2003**, *17*, 135-140.
- Valnet J. In *Phytotherapie. Traitement des maladies par les plantes*. Maloine: Paris, p. 476, **1992**.
- Van Hellemont, J. In *Compendium de phytotherapie*. Association Pharmaceutique Belge: Bruxelles, p. 214, **1986**.
- Vanstone, C.A.; Raeini-Sarjaz, M.; Parsons, W.E.; Jones, P.J.H. Unesterified plant sterols and stanols lower LDL cholesterol concentrations equivalently in hypercholesterolemic persons. *Am J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 1271-1278.
- Vigli, G.; Philippidis, A.; Spyros, A.; Dais, P. Classification of edible oils by employing ³¹P and ¹H NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oil adulteration in virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5715-5722.
- Volker, D. H.; Garg, M. L. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and rheumatoid arthritis. In *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*, Wildman, R.E.C. Ed., CRC Press: Boca Raton, Florida, **2000**.
- Wanasundara, U.N.; Shahidi, F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chem.* **1998**, *63*, 335-342.
- Wester, I. Cholesterol-lowering effect of plant sterols. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2000**, *102*, 37-44
- Wichtl, M.; Anton, R. In *Plantes therapeutiques*. Tec. & Doc.: Paris, p. 291, **1999**.
- Willis, M.S.; Wians Jr., F.H. The role of nutrition in preventing prostate cancer: A review of the proposed mechanism of action of various dietary substances. *Clin. Chim. Acta* **2003**, *330*, 57- 83.
- Wilund, K.R., Yu, L., Xu, F., Vega, G.L.; Grundy, S.M.; Cohen, J.C.; Hobbs, H.H. No association between plasma levels of plant sterols and atherosclerosis in mice and men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, *24*, 2322-2326.
- Wold, S. Cross-validatory estimation of the number of components in factor analysis and principal components models. *Technometrics*, **1978**, *20*, 397-406.

Wolfrum, C.; Spener, F. Fatty acids as regulators of lipid metabolism. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2001**, *102*, 746-762.

Woollard, D.C.; Indyk, H.E. In *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, Academic Press: London, p. 5789, **2003**.

Yanishlieva, N.V.; Marinova, E.M. Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2001**, *103*, 752-767.

Yanishlieva, N.V. Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. In *Antioxidantes in food. Practical applications*. Pokorny, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M. Eds.; CRC Press: Boca Raton, US, **2001**.

Yao, L.H.; Jiang, Y.M.; Shi, J.; Tomás-Barberán, F.A.; Datta, N.; Singanusong, R.; Chen, S.S. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Food. Hum. Nutr.* **2004**, *59*, 113-122.

Yoshida, H.; Hirooka, N.; Kajimoto, G. Microwave heating effects on relative stabilities of tocopherols in oils. *J. Food Sci.* **1991**, *56*, 1042-1046.

Yoshida, H.; Takagi, S. Effects of seed roasting temperature and time on the quality characteristics of sesame (*Sesamum indicum*) oil. *J. Sci. Food Agric.* **1997**, *75*, 19-26.

Yoshida, H.; Takagi, S.; Hirakawa, Y. Molecular species of triacylglycerols in the seed coats of soybeans (*Glycine max* L.) following microwave treatment. *Food Chem.* **2000a**, *70*, 63-66.

Yoshida, H.; Hirakawa, Y.; Takagi, S. Roasting influences on molecular species of triacylglycerols in sesame seeds (*Sesamum indicum*). *J. Sci. Food Agric.* **2000b**, *80*, 1495-1502.

Yoshida, H.; Hirakawa, Y.; Abe, S.; Mizushima, Y. The content of tocopherols and oxidative quality of oils prepared from sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds roasted in a microwave oven. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, *104*, 116-122.

Yoshida, H.; Hirakawa, Y.; Tomiyama, Y.; Mizushima, Y. Effects of microwave treatment on the oxidative stability of peanut (*Arachis hypogaea*) oils and the molecular species of their triacylglycerols. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2003**, *105*, 351-358.

Zabaras, D.; Gordon, M.H. Detection of pressed hazelnut oil in virgin olive oil by analysis of polar components: improvement and validation of the method. *Food Chem.* **2004**, *84*, 475-483.

Zambón, D.; Sabaté, J.; Muñoz, S.; Campero, B.; Casals, E.; Merlos, M.; Laguna, J.C.; Ros, E. Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women. *Ann. Intern. Med.* **2000**, *132*, 538-546.

Zwarts, L.; Savage, G.P.; McNeil, D.L. Fatty acid content of New Zealand-grown walnuts (*Juglans regia* L.). *Int. J. Food Sci. Nutr.* **1999**, *50*, 189-194.

