

Lisete Machado e Silva

Determinação da estabilidade de óleos e de compostos com actividade anti-aterosclerótica do azeite durante o processamento de alimentos

U. PORTO

FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

QD255.4
SILI D
2008

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
NOVEMBRO / 2008



FC

Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto



D000120226

Lisete Machado e Silva

Determinação da estabilidade de óleos e de compostos com actividade anti-aterosclerótica do azeite durante o processamento de alimentos

U. PORTO

FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção do grau de Mestre em Química

*Confirme o texto
aprovado pelo júri
21 Dezembro de 2009
Para os vossos
Ribeiro de An*

UNIVERSIDADE DO PORTO
BIBLIOTECA
Sala <u>IQVP-204</u>
Coloc. _____
N.º <u>10412</u>
Depart. Química

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
NOVEMBRO / 2008

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que, de forma directa ou indirecta, contribuíram para o bom desempenho deste trabalho:

Em primeiro lugar, desejo expressar o meu sincero reconhecimento à **Professora Doutora Fátima Paiva**, orientadora desta dissertação, pelo enorme e incansável apoio científico, pelos seus imprescindíveis ensinamentos e disponibilidade para a realização deste trabalho.

À Dra. Adelina Macedo, agradeço sincera e profundamente toda a assistência técnica disponibilizada ao longo de todo este trabalho de investigação, assim como a sua enorme simpatia e amizade sempre demonstradas.

À Dra. Zélia, pela preciosa ajuda com a análise de compostos por LC-DAD-MS.

Ao Professor Doutor Carlos Corrêa e Professora Doutora Maria Augusta Oliveira, o meu eterno agradecimento pelos ensinamentos facultados, pela boa disposição e incentivo com que leccionavam as suas aulas de Química Orgânica, sendo os principais responsáveis pela minha entrada no "mundo" da investigação nesta área da Química.

A todos os professores do Departamento de Química, da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, que directa ou indirectamente contribuíram para a realização desta tese.

Aos meus colegas de laboratório, Susana Barbosa, Joana Coelho, Joana Pinto, Mafalda Correia e Aníbal Silva, pela amizade, companheirismo e pelo excelente ambiente de trabalho proporcionado.

Aos restantes colegas da Faculdade, que de um modo directo ou indirecto, contribuíram para o meu desempenho neste trabalho.

Por fim, desejo expressar um especial e sincero reconhecimento aos meus pais e irmã, pelo apoio e confiança depositados, aos meus amigos e ao Hélder, pelos diversos momentos e vivências inesquecíveis, reflectidos de um modo directo e positivo na minha vida pessoal e profissional.

RESUMO

Estudos epidemiológicos efectuados em países mediterrânicos mostraram que a sua dieta tradicional está associada a uma baixa incidência de certos tumores e de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose.

O azeite, rico em ácidos gordos monoinsaturados e com baixo teor em ácidos gordos saturados, é a maior fonte de gordura desta dieta. Este óleo tem o privilégio de poder ser consumido virgem e cru, possuindo deste modo compostos fenólicos (polifenóis e tocoferóis) que, de outro modo, serão destruídos durante os processos de refinação. Estudos clínicos revelam que grande parte dos efeitos benéficos do azeite se deve à presença destes compostos com actividade antioxidante que contribuem, igualmente, para a estabilidade e valor nutricional do referido óleo. No entanto, o efeito do processamento sobre o extracto fenólico do azeite virgem nas condições estudadas neste trabalho nunca foi reportado.

A culinária portuguesa integra o azeite e alguns óleos de sementes oleaginosas na preparação de uma vasta gama de alimentos. Duas das mais importantes técnicas de processamento utilizadas, tanto a nível doméstico, como industrial, são a preparação de carne e da batata na presença destas gorduras em forno, a 180-220 °C ("assados") e a cozedura de vegetais, como a cenoura e a cebola na presença de azeite, a 100 °C ("sopas").

Numa primeira fase deste estudo, pretendeu-se avaliar a extensão da degradação do conteúdo fenólico do azeite extra-virgem (AEV) ao longo do tempo, antes e após o seu processamento a 180 °C e durante 60 minutos, comparando o benefício da sua utilização relativamente ao azeite virgem (AV) e ao azeite comum (A), menos ricos em polifenóis, e aos óleos de girassol (OG), milho (OM), soja (OS) e amendoim (OA). Após o processamento a 180 °C, todas as amostras de azeite, independentemente da sua qualidade, se encontravam quimicamente estáveis, isto é, não oxidadas, apresentando-se ainda aptas para consumo. No entanto, atendendo ao elevado conteúdo fenólico das amostras de AEV, o tempo de "prateleira" destas amostras foi superior à das amostras de AV e de A. Ainda devido à presença considerável deste tipo de antioxidantes, os extractos obtidos a partir do AEV mostraram possuir uma maior capacidade anti-radicalar, comparativamente aos dos restantes azeites analisados. Por outro lado, todas as amostras processadas nos outros óleos vegetais apresentaram-se oxidadas ou com um "tempo de prateleira" mais curto. A maior concentração em tocoferóis destas amostras não foi suficiente para evitar a degradação oxidativa destes óleos, muito mais ricos em ácidos gordos polinsaturados. Observou-se ainda um efeito protector das batatas no conteúdo de tocoferol presente nos óleos de oleaginosas, o que provavelmente contribuiu para uma melhor estabilidade oxidativa destas amostras. Verificou-se, igualmente, que a presença de alimentos (batata e

carne) contribuiu para o aumento da estabilidade oxidativa das várias amostras processadas em todos os óleos alimentares testados. É ainda interessante referir que a quantidade de tocoferóis presente nas amostras, não foi drasticamente afectada com o processamento, ao contrário do que aconteceu com os polifenóis. Durante o processamento dos azeites, a concentração do hidroxitirosol e dos secoiridóides, em geral, baixou drasticamente e os alimentos contribuíram para uma maior destruição do extracto fenólico. Verificou-se o aparecimento de dois compostos desconhecidos (1 e 2) no extracto fenólico dos azeites durante o processamento, em especial nas amostras contendo alimentos. Um destes compostos (1) foi identificado por LC-DAD-MS como um derivado do ácido elenólico, o ácido 4-formil-3-[(1-metiloxycarbonil-2-oxo)etil]-hex-4-enoico, provavelmente derivado da degradação, por hidrólise, dos secoiridóides. Não foi, no entanto, possível a identificação do outro composto desconhecido (2) devido à co-eluição de outros compostos.

A segunda parte deste trabalho teve como objectivo o mesmo tipo de avaliação aos polifenóis das amostras de AEV, antes e após a cozedura dos alimentos, a 100 °C, durante 60 minutos e comparar o benefício da sua utilização relativamente ao A. A adição deste óleo foi efectuada logo no início e a 15 minutos do fim do processamento, visando uma melhor utilização desta gordura. No entanto, os resultados obtidos para as amostras de azeite processadas nos dois tempos diferentes não foram significativos. Após o processamento, a 100 °C, nenhuma das amostras se encontravam oxidadas. À semelhança do que aconteceu na primeira parte deste trabalho, o processamento afectou a quantidade de compostos fenólicos das amostras, sobretudo naquelas em que os alimentos estavam presentes. Mais uma vez foi observada uma diminuição drástica da concentração em hidroxitirosol e secoiridóides com o processamento. No entanto, e ao contrário do que foi observado no processamento a 180 °C na ausência de água adicionada, os alimentos contribuíram para uma maior destruição do extracto fenólico. Confirmou-se ainda o carácter hidrofílico destes compostos, uma vez que grande parte da sua quantidade (40-70%) migrou para a fase aquosa das amostras. Foi igualmente detectada a presença dos compostos desconhecidos 1 e 2, tanto nas fases aquosas como nas fases oleosas, mas em maior concentração total do que a observada no processamento a 180 °C na ausência de água adicionada, o que confirma a ocorrência de uma forte degradação por hidrólise dos secoiridóides presentes no azeite. Os alimentos parecem contribuir para um aumento desta hidrólise. No entanto, e apesar da grande destruição do compostos fenólicos pelo processamento, a capacidade anti-radicalar destes extractos foi elevada, tendo sido tanto maior quanto maior a quantidade de fenóis ainda presentes. Após o processamento, a concentração em α -tocoferol manteve-se praticamente inalterada em todas as amostras.

ABSTRACT

Epidemiological studies conducted in the Mediterranean countries showed that their traditional diet is associated with a low incidence of certain tumours and cardiovascular diseases, such as atherosclerosis.

Olive oil, which is rich in monounsaturated and low in saturates fatty acids, is the major source of fat in this diet. This oil has the privilege to be consumed virgin and raw, containing, consequently, phenolic compounds (polyphenols and tocopherols) that would, otherwise, be destroyed by the refining processes. Clinical studies have shown that a large number of the beneficial effects of olive oil consumption are due to the presence of these compounds with antioxidant activity, which also contribute to the stability and nutritional value of the oil. However, the effect of processing on the olive oil phenolic extracts, under the conditions studied in this work, has never been reported.

Portuguese cuisine includes olive oil and some seed oils in a preparation of a wide range foods. Two of the most important processing techniques used in Mediterranean countries, at both domestic and industrial, are the preparation of meat and potatoes in the presence of these oils in oven, at 180-220 °C ("roasted food") and boiling vegetables, such as carrot and onion in the presence of olive oil at 100 °C ("soups").

The first aim of this study was to assess the extent of degradation of the phenolic content of extra-virgin olive oil (EVOO) after processing at 180 °C for 60 minutes and to compare the relative benefit of its use with the use of virgin olive oil (VOO) and olive oil (OO), less rich in polyphenols, and with the use of sunflower oil (SFO), corn oil (CO), soybean oil (SO) and peanut oil (PO). After processing at 180 °C, all olive oil samples, regardless of their quality, were chemically stable and were suitable for consumption. However, owing to high phenolic content of samples of EVOO, the shelf life of these samples was higher than that of samples of VOO and OO. Also due to the considerable presence of such antioxidants, extracts obtained from the EVOO has shown a greater radical scavenging activity, compared to the VOO and OO. Furthermore, after processing, all other vegetable oil samples were oxidized or with a shorter shelf life. The highest concentration in tocopherols in these samples was not enough to prevent oxidative degradation of these oils, much more rich in polyunsaturated fatty acids. It was also observed a spearing effect of potatoes on the tocopherol content of seed oils, what probably contributes for the better oxidative stability of these samples. In fact, the presence of food (meat and potato) contributed to the increase in oxidative stability of the several samples processed in all edible oils tested. It was also interesting to note that the content in tocopherols was not dramatically affected by the thermal treatment as it was the polyphenolic content. In olive oils, the concentration of

hydroxytyrosol and secoiridoids in general, fell dramatically and food contributed to a greater destruction of phenolic extract. It was observed the appearance of two unknown compounds (1 and 2) in the olive oil phenolic extracts obtained after processing, especially in samples containing foods. One of these compounds (1) was identified by LC-DAD-MS as a derivative of elenolic acid, the 4-formyl-3-[(1-metiloxycarbonil-2-oxo) ethyl]-hex-4-enoic acid, probably derived from degradation of secoiridoids by hydrolysis. However, it was not possible to identify the other unknown compound (2) due to co-elution of other compounds.

The second part of this work aimed to evaluate the extent of degradation of the phenolic content of EVOO after processing at 100 °C in water for 60 minutes, in the presence and absence of vegetables, and compare the benefits of its use against the OO use. The addition of olive oils was made at the beginning and 15 minutes to the end of the process in order to make the better use of this fat. However, the results from olive oil samples processed at the two different times were not significantly different. After processing at 100 °C, none of the samples were oxidized. Similar to what happened in the first part of this work, processing affected the amount of phenolic compounds of the samples, especially those in which food was present. Again, we observed a sharp drop in the concentration of hydroxytyrosol and secoiridoids with the thermal treatment. As observed in the processing operation at 180 °C in the absence of added water, food have contributed to a greater destruction of phenolic extract but shown a spear effect on tocopherol content. It was confirmed also the hydrophilic character of polyphenolic compounds, since much of their quantity (40-70%) migrated to the aqueous phase of the samples. It was detected the presence of unknown compounds 1 and 2, both in aqueous and oil phases, but in a higher total concentration than that observed in the processing operation at 180 °C in the absence of added water, which confirms the occurrence of a strong degradation by hydrolysis of secoiridoids present in olive oil. Foods seem to contribute for the increase of this hydrolysis. However, despite the great destruction of phenolic compounds by processing, radical scavenging ability of these extracts was high and was the greater, the greater the amount of phenols still present. After processing, α -tocopherol content of olive oils remained virtually unchanged in all samples.

RÉSUMÉ

Des études épidémiologiques réalisées dans des pays méditerranéens ont montré que la diète traditionnelle est associée à une baisse d'incidence chez certaines tumeurs et aussi de maladies cardiovasculaires, comme l'athérosclérose.

La plus grande source de la graisse qui compose cette diète, elle vient de l'huile d'olive vu que celle est riche en acides gras monoinsaturés et aussi avec une basse proportion d'acides gras saturés. Cette huile a le privilège de pouvoir être consommée en vierge et en cru, possédant ainsi des composés phénoliques (poliphénols et tocophérols) qu'autrement, ils seront détruits pendant le processus de raffinage. Des études cliniques révèlent qu'une grande partie des effets bénéfiques de l'huile d'olive se doivent à la présence de ces composés qui ont une activité antioxydante en contribuant, également, à la stabilité et à la valeur nutritionnelle de cette huile. Cependant, dans cette recherche, l'effet de la procédure sur l'extrait phénolique de l'huile d'olive vierge n'a jamais été reporté.

La gastronomie portugaise inclut l'huile d'olive et quelques autres huiles de semences oléagineuses dans la préparation d'une gamme très vaste d'aliments. Deux des plus importantes techniques de la procédure utilisée, tant au niveau domestique, aussi bien qu'au niveau industriel, ce sont la préparation de la viande et de la pomme de terre en présence de ces graisses mises au four, à 180-220 ° C ("es rôtis") et la cuisson de végétaux, comme la carotte et l'ognon en présence de l'huile d'olive, à 100 °C ("des soupes").

Premièrement, on a voulu évaluer l'extension de la dégradation du contenu phénolique de l'huile d'olive extra-vierge (HOEV) tout au long de cette procédure à 180 °C, avant et après, pendant 60 minutes, en comparant le bénéfice de son utilisation avec l'huile d'olive vierge (HOV), l'huile d'olive commun (HO), ceux-ci moins riches en poliphénols, et aussi avec les huiles de tournesol (HT), de maïs (HM), de soja (HS) et de cacahuète (HC) . Après la procédure à 180 °C, tous les échantillons d'huile d'olive, indépendamment de sa qualité, ils se trouvaient chimiquement stables, cela veut dire qu'ils n'étaient pas oxydés, donc, encore propres à la consommation. Néanmoins, étant donné le haut contenu phénolique des exemplaires d' HOEV, le temps "d'étagère" de ces échantillons a été supérieur à ceux d' HOV et d' HO. Dû encore à la présence considérable de ce type d'antioxydants, les extraits obtenus à partir de l' HOEV, ont montré qu'ils possèdent une plus grande capacité anti-radicalaire, comparativement à ceux des autres huiles d'olive analysés. D'un autre côté, tous les échantillons étudiés dans les autres huiles végétaux, celles-ci se sont présentées oxydées ou avec un "temps d'étagère" plus court. La plus grande concentration en tocophérols de ces échantillons n'a pas été suffisante pour éviter la dégradation oxydative de ces huiles, beaucoup plus riches en acides gras polinsaturés.

Également, on a vérifié que la présence d'aliments (des pommes de terre et de viande) a contribué à l'augmentation de la stabilité oxydative des différents échantillons étudiés, dans toutes les huiles alimentaires testées. En général, pendant la procédure des huiles d'olive, la concentration de l'hydroxytyrosol et des secoiridoids a baissé drastiquement. On a vérifié l'apparition de deux composés inconnus (1 et 2) dans l'extrait phénolique des huiles d'olive pendant la procédure, en particulier, chez les échantillons qui contenaient des aliments. Un de ces composés (1) a été identifié par LC-DAD-MS comme un dérivé de l'acide elenólic, l'acide 4-formyl-3-[(1-méthoxy-carbonyl-2-oxo)éthyl]-hex-4-énoïque, probablement, lui, un dérivé de la dégradation par hydrolyse des secoiridoids. Pourtant, ce n'a pas été possible l'identification de l'autre composé inconnu (2) dû à la co-élution d'autres composés.

La deuxième partie de cette recherche a eu comme but le même type d'évaluation aux polyphénols des échantillons d'HOEV, avant et après la cuisson des aliments, à 100 °C, pendant 60 minutes et comparer le bénéfice de son utilisation concernant l'HO. L'addition de cette huile a été effectuée dès le début et à 15 minutes de la fin de la procédure, tout en visant une utilisation meilleure de cette graisse. Toutefois, les résultats obtenus dans les échantillons de l'huile d'olive procédés dans les deux temps différents n'ont pas été importants. Après la procédure à 100 °C, aucun des échantillons se trouvait oxydé. À l'imitation de ce qui est arrivé dans la première partie de ce travail, la procédure a affecté la quantité de composés phénoliques des échantillons, surtout chez ceux où les aliments étaient présents. Une fois de plus, on a observé une diminution drastique de la concentration en hydroxytyrosol et en secoiridoids avec la procédure. Cependant, et au contraire de ce qu'on a observé dans la procédure à 180 °C en l'absence d'eau ajoutée, les aliments ont contribué à une plus grande destruction de l'extrait phénolique. On a encore confirmé le caractère hydrophile de ces composés, vu qu'une grande partie de sa quantité (40 – 70%) a migré vers la phase aqueuse des échantillons. On a également détecté la présence des composés inconnus 1 et 2, autant dans les phases aqueuses comme dans les phases huileuses, mais dans une concentration totale majeure à celle qu'on a pu observer dans la procédure à 180 °C en l'absence d'eau ajoutée, ce qui confirme l'événement d'une forte dégradation par hydrolyse des secoiridoids présents dans l'huile d'olive. Il paraît que les aliments contribuent à l'augmentation de cette hydrolyse. Cependant, et malgré la grande destruction des composés phénoliques par la procédure, la capacité anti-radicalaire de ces extraits a été élevée, ayant été plus grande autant que la quantité de phénols y présents. Après la procédure, la concentration en α -tocophérol s'est maintenue pratiquement inaltérée dans tous les échantillons.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. ÓLEOS VEGETAIS	19
1.1.1. O AZEITE.....	19
1.1.1.1. Constituição do azeite.....	23
1.1.1.1.1. Ácidos gordos no azeite.....	24
1.1.2. ÓLEOS DE OEAGINOSAS.....	25
1.2. ANTIOXIDANTES	26
1.2.1. CAROTENÓIDES.....	29
1.2.2. FOSFOLÍPIDOS.....	30
1.2.3. COMPOSTOS FENÓLICOS.....	30
1.2.3.1. Álcoois fenólicos.....	31
1.2.3.2. Ácidos fenólicos.....	31
1.2.3.3. Flavonóides.....	32
1.2.3.4. Lignanós.....	32
1.2.3.5. Secoiridóides.....	33
1.2.3.6. Tocoferóis.....	35
1.2.3.7. A importância dos compostos fenólicos.....	37
1.2.3.7.1. Na qualidade do azeite virgem.....	37
1.2.3.7.2. Na saúde humana.....	37
1.2.4. MÉTODOS PARA A AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	42
1.2.4.1. Teste de DPPH [*]	42
1.2.4.2. Método da estufa de Schaal ("Schaal Oven Test").....	44
1.3. OXIDAÇÃO LIPÍDICA	44
1.3.1. DECOMPOSIÇÃO DOS HIDROPERÓXIDOS.....	49
1.3.2. FACTORES QUE INFLUENCIAM A VELOCIDADE DE OXIDAÇÃO DOS LÍPIDOS NOS ALIMENTOS.....	50
1.3.3. OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM EMULSÕES.....	51
1.3.4. OXIDAÇÃO LIPÍDICA NA CARNE.....	53
1.3.5. MÉTODOS PARA A AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO LIPÍDICA.....	54
1.3.5.1. Métodos para a determinação dos produtos primários da oxidação.....	55
1.3.5.1.1. Determinação do índice de peróxidos.....	55
1.3.5.1.2. Determinação do conteúdo em dienos conjugados.....	55
1.3.5.2. Métodos para a determinação dos produtos secundários da oxidação.....	55
1.3.5.2.1. Determinação do índice de p-anisidina.....	56
2. OBJECTIVOS	57
3. MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE ÓLEOS ALIMENTARES APÓS O	

PROCESSAMENTO, A 180 °C, NA PRESENÇA DE ALIMENTOS (“ASSADOS”).....	60
3.1.1. REAGENTES.....	61
3.1.2. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS DOS ÓLEOS ALIMENTARES	61
3.1.3. DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ DOS ÓLEOS ALIMENTARES.....	63
3.1.4. PROCESSAMENTO DA CARNE VERMELHA E DA BATATA NOS DIFERENTES ÓLEOS ALIMENTARES.....	63
3.1.5. EXTRACÇÃO DA GORDURA DAS AMOSTRAS DE CARNE.....	64
3.1.6. AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA DOS DIFERENTES ÓLEOS ALIMENTARES E DA GORDURA DA CARNE.....	64
3.1.6.1. Determinação do índice de peróxidos.....	65
3.1.6.2. Determinação do conteúdo em dienos conjugados.....	65
3.1.6.3. Determinação do índice de <i>p</i> -anisidina.....	66
3.1.7. EXTRACÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS POLIFENÓIS POR HPLC.....	66
3.1.7.1. Extracção dos polifenóis das amostras de azeite.....	66
3.1.7.2. Extracção dos polifenóis das fases aquosas das amostras de carne.....	67
3.1.7.3. Determinação dos polifenóis por HPLC.....	67
3.1.7.4. Identificação dos compostos desconhecidos por LC-DAD-MS.....	68
3.1.8. EXTRACÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS TOCOFERÓIS NOS DIFERENTES ÓLEOS ALIMENTARES POR HPLC.....	69
3.1.9. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRACTOS FENÓLICOS DAS AMOSTRAS APÓS O PROCESSAMENTO, A 180 °C.....	70
3.1.9.1. Teste da estufa de Schaal (“Schaal Oven Test”).....	70
3.1.9.2. Teste de DPPH [•]	71
3.1.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	71
3.2. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE AZEITES APÓS O PROCESSAMENTO, A 180 °C, NA PRESENÇA DE ÁGUA E DE ALIMENTOS (“SOPAS”).....	72
3.2.1. REAGENTES.....	73
3.2.2. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS DOS AEV E A.....	73
3.2.3. PROCESSAMENTO DA BATATA, CENOURA E DE CEBOLA EM AEV E A.....	73
3.2.4. AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA NAS AMOSTRAS DE AZEITE.....	74
3.2.4.1. Determinação do conteúdo em dienos conjugados.....	74
3.2.4.2. Determinação do índice de <i>p</i> -anisidina.....	75
3.2.5. DETERMINAÇÃO DO pH DAS FASES AQUOSAS DAS AMOSTRAS.....	75
3.2.6. EXTRACÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS POLIFENÓIS POR HPLC.....	75
3.2.6.1. Extracção dos polifenóis das amostras de azeite.....	75
3.2.6.2. Extracção dos polifenóis das fases aquosas.....	75
3.2.6.3. Determinação dos polifenóis por HPLC dos polifenóis das fases aquosas.....	75
3.2.7. EXTRACÇÃO E DETERMINAÇÃO DO α -TOCOFEROL NAS AMOSTRAS DE AZEITE POR HPLC.....	76
3.2.8. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRACTOS FENÓLICOS DAS AMOSTRAS APÓS O PROCESSAMENTO, A 100 °C.....	76

3.2.8.1. Teste da estufa de Schaal ("Schaal Oven Test").....	76
3.2.8.2. Teste de DPPH [•]	76
3.2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	76
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
4.1. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE ÓLEOS ALIMENTARES APÓS O PROCESSAMENTO, A 180 °C, NA PRESENÇA DE ALIMENTOS ("ASSADOS").....	78
4.1.1. DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DOS ÓLEOS ALIMENTARES ESTUDADOS...	79
4.1.2. AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA DEGRADAÇÃO DOS POLIFENÓIS.....	80
4.1.2.1. Determinação dos polifenóis nas amostras de azeite.....	80
4.1.2.2. Determinação dos polifenóis nas fases aquosas das amostras de carne.....	85
4.1.2.3. Identificação dos compostos desconhecidos por LC-DAD-MS.....	85
4.1.3. DETERMINAÇÃO DOS TOCOFERÓIS NOS DIFERENTES ÓLEOS ALIMENTARES.....	89
4.1.4. AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA DOS DIFERENTES ÓLEOS ALIMENTARES APÓS O PROCESSAMENTO A 180 °C.....	92
4.1.4.1. Determinação do conteúdo em dienos conjugados.....	92
4.1.4.2. Determinação do índice de <i>p</i> -anisidina.....	93
4.1.5. AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA NAS AMOSTRAS DE CARNE PROCESSADAS NOS DIFERENTES ÓLEOS ALIMENTARES.....	94
4.1.6. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRACTOS FENÓLICOS DAS AMOSTRAS APÓS O PROCESSAMENTO A 180 °C.....	95
4.1.6.1. Teste da estufa de Schaal ("Schaal Oven Test").....	95
4.1.6.2. Teste de DPPH [•]	98
4.2. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE AZEITES APÓS O PROCESSAMENTO, A 100 °C, NA PRESENÇA DE ÁGUA E DE ALIMENTOS ("SOPAS").....	102
4.2.1. DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DOS AZEITES ESTUDADOS.....	103
4.2.2. AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA DEGRADAÇÃO DOS POLIFENÓIS.....	103
4.2.3. DETERMINAÇÃO DO α -TOCOFEROL NAS AMOSTRAS DE AZEITE.....	120
4.2.4. AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA DOS AEV E A APÓS O PROCESSAMENTO A 100 °C.....	121
4.2.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRACTOS FENÓLICOS DO AZEITE APÓS O PROCESSAMENTO A 100 °C.....	122
4.2.5.1. Teste da estufa de Schaal ("Schaal Oven Test").....	123
4.2.5.2. Teste de DPPH [•]	124
5. CONCLUSÕES.....	127
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	133
7. REFERÊNCIAS.....	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Formação de um triacilglicerol.....	22
Figura 1-2: Fórmulas de estrutura de alguns antioxidantes sintéticos.....	27
Figura 1-3: Estabilização de um fenol alquilado por deslocalização electrónica.....	28
Figura 1-4: Estrutura química dos álcoois fenólicos e seus derivados presentes no azeite virgem.....	31
Figura 1-5: Estruturas químicas de ácidos benzóicos.....	31
Figura 1-6: Estruturas químicas de ácidos cinâmicos.....	32
Figura 1-7: Estrutura química de um flavonóide.....	32
Figura 1-8: Estrutura química dos lignanos presentes no azeite virgem.....	33
Figura 1-9: Estruturas químicas dos secoiridóides presentes no azeite virgem.....	34
Figura 1-10: Estruturas químicas dos secoiridóides presentes na azeitona.....	34
Figura 1-11: Estrutura química do nüzhenide.....	35
Figura 1-12: Estruturas químicas dos tocoferóis presentes nos óleos alimentares.....	36
Figura 1-13: Artéria normal e outra com ateroma.....	41
Figura 1-14: Estrutura química do DPPH [•]	43
Figura 1-15: Etapas da oxidação lipídica.....	46
Figura 1-16: Mecanismo da fotoxidação dos sensibilizadores do tipo I.....	47
Figura 1-17: Mecanismo da fotoxidação dos sensibilizadores do tipo II.....	47
Figura 1-18: Decomposição dos hidroperóxidos em compostos secundários voláteis.....	49
Figura 1-19: Formação de radicais lipídicos a partir de metais de transição.....	50
Figura 1-20: Emulsões óleo/água e água/óleo.....	51
Figura 1-21: Fenómeno da interface para explicar a acção antioxidante em óleo e em emulsões óleo/água.....	53
Figura 3-1: Transesterificação dos ácidos gordos em MeOH / BF ₃	61
Figura 4-1: Cromatograma de uma solução metanólica de padrões fenólicos.....	80
Figura 4-2: Cromatograma dos extractos fenólicos dos AEV, AV e A.....	81
Figura 4-3: Quantidade de polifenóis totais nas amostras de AEV, AV e A, em mg kg ⁻¹ azeite.....	82
Figura 4-4: Quantidade de álcoois fenólicos nas amostras, em mg kg ⁻¹ azeite.....	82
Figura 4-5: Quantidade de lignanos nas amostras, em mg kg ⁻¹ azeite.....	83
Figura 4-6: Quantidade de secoiridóides nas amostras, em mg kg ⁻¹ azeite.....	84
Figura 4-7: Quantidade de composto desconhecido 1 nas amostras de AEV, AV e A, em mg kg ⁻¹ óleo.....	86
Figura 4-8: Cromatograma referente ao extracto fenólico da amostra AEVB com o espectro de massa do pico correspondente ao composto desconhecido 1 (tr ≈ 28 min.) e o esquema de fragmentação proposto.....	87
Figura 4-9: Quantidade de composto desconhecido 2 nas amostras de AEV, AV e A, em mg	

kg ⁻¹ óleo.....	88
Figura 4-10: Quantidade de tocoferóis totais nas amostras, em mg kg ⁻¹ óleo.....	89
Figura 4-11: Quantidade de α , γ e δ -tocoferol nas amostras, em mg kg ⁻¹ óleo.....	91
Figura 4-12: Variação da percentagem de dienos conjugados das amostras logo após o processamento a 180 °C.....	92
Figura 4-13: Variação do índice de <i>p</i> -anisidina logo após o processamento a 180 °C.....	93
Figura 4-14: Percentagem de dienos conjugados das amostras de carne processadas nos diferentes óleos alimentares, relativamente à percentagem de dienos conjugados das amostras de carne fresca.....	94
Figura 4-15: Variação da percentagem de dienos conjugados das amostras ao fim de 15 dias na estufa a 60 °C.....	96
Figura 4-16: Variação do índice de <i>p</i> -anisidina ao fim de 15 dias na estufa a 60 °C.....	97
Figura 4-17: Percentagem de DPPH [·] por reagir nos extractos fenólicos das amostras de AEV, AV e A ao fim de 15 minutos de reacção.....	98
Figura 4-18: Percentagem de DPPH [·] por reagir nos extractos de tocoferol das amostras de OG, OM, OS e OA ao fim de 15 minutos de reacção.....	99
Figura 4-19: Percentagem de DPPH [·] por reagir nos extractos de tocoferol do AEV ao fim de 15 minutos de reacção.....	100
Figura 4-20: Cromatograma dos extractos fenólicos dos AEV e A.....	104
Figura 4-21: Quantidade de polifenóis totais nas amostras, em mg kg ⁻¹ azeite.....	105
Figura 4-22: pH das fases aquosas das amostras de AEV e A.....	106
Figura 4-23: Quantidade de polifenóis na fase oleosa das amostras, em mg kg ⁻¹ azeite.....	107
Figura 4-24: Quantidade de polifenóis na fase aquosa das amostras, em mg kg ⁻¹ azeite.....	107
Figura 4-25: Quantidade de HyTy, em mg kg ⁻¹ azeite.....	108
Figura 4-26: Quantidade de Ty, em mg kg ⁻¹ azeite.....	109
Figura 4-27: Quantidade de HyTyAc, em mg kg ⁻¹ azeite.....	110
Figura 4-28: Quantidade de Py, em mg kg ⁻¹ azeite.....	111
Figura 4-29: Quantidade de HyTy-EDA, em mg kg ⁻¹ azeite.....	112
Figura 4-30: Quantidade de HyTy-EA, em mg kg ⁻¹ azeite.....	113
Figura 4-31: Quantidade de Ty-EDA, em mg kg ⁻¹ azeite.....	114
Figura 4-32: Quantidade de Ty-EA, em mg kg ⁻¹ azeite.....	115
Figura 4-33: Quantidade de composto desconhecido 1, em mg kg ⁻¹ azeite.....	116
Figura 4-34: Quantidade de composto desconhecido 1 na fase oleosa das amostras, em mg kg ⁻¹ azeite.....	117
Figura 4-35: Quantidade de composto desconhecido 1 na fase aquosa das amostras, em mg kg ⁻¹ azeite.....	117
Figura 4-36: Quantidade de composto desconhecido 2, em mg kg ⁻¹ azeite.....	118
Figura 4-37: Quantidade de composto desconhecido 2 na fase oleosa das amostras, em mg kg ⁻¹ azeite.....	119
Figura 4-38: Quantidade de composto desconhecido 2 na fase aquosa das amostras, em mg	119

kg ⁻¹ azeite.....	
Figura 4-39: Quantidade de α -tocoferol nas amostras, em mg kg ⁻¹ azeite.....	120
Figura 4-40: Variação da percentagem de dienos conjugados das amostras de AEV e A desde os 0 até aos 70 dias na estufa a 60 °C.....	123
Figura 4-41: Variação do índice de <i>p</i> -anisidina das amostras de AEV e A desde os 0 até aos 70 dias na estufa a 60 °C.....	124
Figura 4-42: Percentagem de DPPH [*] por reagir nos extractos fenólicos da fase oleosa das amostras.....	125
Figura 4-43: Percentagem de DPPH [*] por reagir nos extractos fenólicos das fases oleosa e aquosa das amostras.....	125

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1-1: Tipos de azeite e suas características.....	21
Tabela 1-2: Composição dos ácidos gordos no azeite.....	24
Tabela 1-3: Composição dos ácidos gordos nos óleos de girassol, milho, soja e amendoim....	25
Tabela 1-4: Quantidade de tocoferóis nos óleos alimentares.....	36
Tabela 1-5: Hidroperóxidos dos ácidos gordos insaturados formados por autoxidação e fotoxidação.....	48
Tabela 3-1: Designação das amostras de azeite e de óleo processadas a 180 °C.....	64
Tabela 3-2: Gradiente utilizado na determinação de polifenóis nas amostras por HPLC.....	67
Tabela 3-3: Gradiente utilizado na tentativa de identificação de 2 compostos fenólicos desconhecidos nas amostras por LC-DAD-MS.....	69
Tabela 3-4: Gradiente utilizado na determinação de tocoferóis nas amostras por HPLC.....	70
Tabela 3-5: Designação das amostras de azeite não processado e processado a 100 °C.....	74
Tabela 4-1: Características dos seguintes óleos alimentares: AEV, AV, OG, OM, OS e OA.....	79
Tabela 4-2: Efeito anti-radicalar do DPPH [·] com os tocoferóis e com o β-caroteno após vários tempos de reacção (15, 60 e 250 minutos).....	101
Tabela 4-3: Características dos AEV e A.....	102
Tabela 4-4: Variação da percentagem de dienos conjugados (Δ%DC) das amostras de AEV e de A logo após o processamento, a 100 °C.....	121
Tabela 4-5: Variação do índice de <i>p</i> -anisidina (ΔIA) das amostras de AEV e de A logo após o processamento, a 100 °C.....	122
Tabela 5-1: Quantidade (%) de compostos fenólicos nas fases oleosa e aquosa das amostras de AEVP e AP.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A – Azeite

ABTS⁺ – Radical catião obtido a partir do ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzoatiazolina)-6-sulfónico

AEV – Azeite extra-virgem

AV – Azeite virgem

A / O – água em óleo

B – Batata

BHA – butilhidroxianisol

BHT – 2,6-di-*t*-butil-4-metoxifenol

C – Carne

CEN – Cenoura

CEB – Cebola

GC – Cromatografia em fase gasosa (*Gas Chromatography*)

Glu – Glucose

DC – Dienos conjugados

DPPH[•] – Radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo

EDL – Energia de dissociação de ligação

HDL – Lipoproteína de alta densidade (*High Density Lipoprotein*)

HyTy – Hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol ou 3,4-DHPEA)

HyTyAc – Acetato de hidroxitirosol

HyTy-EA – isómero da oleuropeína aglicona (ou 3,4-DHPEA-EA)

HyTy-EDA – forma dialdeídica do ácido elenólico ligado ao 3,4-DHPEA (ou 3,4-DHPEA-EDA)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

IA – Índice de *p*-anisidina

IP – Índice de peróxidos

LC-DAD-MS – Cromatografia líquida com detector com barra de díodos acoplado à Espectrometria de Massa (*Liquid Chromatography – Diode Array Detector – Mass Spectrometry*)

LDL – Lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein*)

m / z – Razão massa / carga

MUFA – Ácido gordo monoinsaturado (*Monounsaturated Fatty Acid*)

O / A – óleo em água

OA – Óleo de amendoim

OG – Óleo de girassol
OI – Oleuropeína
OM – Óleo de milho
OS – Óleo de soja
P – Processado
p.a – para análise
PI – Potencial de ionização
PUFA – Ácido gordo polinsaturado (*Polyunsaturated Fatty Acid*)
Py – Pinosesinol
PyAc – Acetoxipinosesinol
SFA – Ácido gordo saturado (*Saturated Fatty Acid*)
TAG – Triacilglicerol
TAH – Transferência do átomo de hidrogénio
TBA – Ácido tiobarbitúrico
TBHQ – *t*-butilhidroquinona
TE – Transferência electrónica
Ty – Tirosol (*p*-hidroxifeniletanol ou *p*-HPEA)
Ty-EA – isómero do ligstrósido aglicona (ou *p*-HPEA-EA)
Ty-EDA – forma dialdeídica do ácido elenólico ligado ao *p*-HPEA (ou *p*-HPEA-EDA)
tr – tempo de retenção
UV-Vis – ultravioleta – visível
VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade (*Very Low Density Lipoprotein*)

1. INTRODUÇÃO

1.1. ÓLEOS VEGETAIS

Os óleos vegetais representam actualmente um dos principais produtos extraídos de plantas, sendo cerca de 2/3 usados em produtos alimentares.

Fazem parte da sua constituição triacilgliceróis (TAGs, cerca de 95%) e componentes em menor proporção como mono e diacilgliceróis, que actuam fundamentalmente como emulsionantes, ácidos gordos livres, tocoferóis, polifenóis (importantes antioxidantes), proteínas, esteróis e vitaminas ^[1, 2, 3].

O uso diário dos óleos vegetais, conduziu à necessidade de se avaliar melhor o seu grau de resistência, sobretudo, no que respeita à sua estabilidade no processamento e armazenamento.

Os óleos oriundos de frutos, como o óleo da azeitona, são denominados azeites e os óleos provenientes de sementes, nomeadamente, de milho, soja, amendoim e girassol, serão designados de óleos de oleaginosas ^[4].

1.1.1. O AZEITE

O azeite é uma gordura líquida à temperatura de 20 °C, obtida directamente do fruto da oliveira (*Olea europea Linaeus*), mediante processos de extracção, depuração e refinação ^[4]. É um alimento antigo, clássico da culinária contemporânea e utilizado cada vez mais em grande parte das cozinhas. Sendo a principal gordura da dieta mediterrânica, é de todo a mais saudável para a alimentação humana e a única que pode ser consumida virgem e crua. Deste modo, é-lhe conferida uma grande vantagem sobre os restantes óleos vegetais ^[5].

A oliveira é uma árvore típica da costa mediterrânica que exige uma grande luminosidade e um clima caracterizado por Invernos amenos, Outonos ou Primaveras chuvosas e Verões quentes e secos. Assim, na Primavera de cada ano, surgem flores a partir dos ramos que nasceram e cresceram no ano anterior. Muitas originam frutos, formando-se e endurecendo primeiro o caroço, e só posteriormente se assiste a um aumento do volume, com definição da forma da polpa. Em pleno Verão, observa-se a uma alteração gradual da cor da azeitona, desde o verde ao violáceo e do roxo escuro ao negro. Entre Setembro e Outubro, a azeitona atinge o tamanho final. No decurso deste processo de maturação, acumulam-se lípidos, gotícula a gotícula, sobretudo nas células da polpa. Esses lípidos são constituídos essencialmente por glicéridos de elevado valor energético.

Simultaneamente, formam-se também vitaminas, hidrocarbonetos, esteróis, pigmentos, polifenóis, álcoois, ceras, cetonas e aldeídos que, juntamente com os lípidos, irão engrossar as gotículas de gordura (azeite). O grau de maturidade do fruto condiciona o respectivo sabor e, conforme a variedade e a zona de exploração, a azeitona é destinada à produção de conserva ou de azeite ^[4].

A oliveira possui um crescimento lento e nas condições mais favoráveis, produz azeitonas ao fim de 5 anos de plantação, mas o seu auge de produção só é alcançado ao fim de 20. Neste contexto, o seu período de maturação e de plena produção ocorre entre os 35 e os 150 anos. Findo este período, inicia-se o seu envelhecimento com um rendimento que passa a ser irregular.

Em média, uma oliveira adulta produz cerca de 20 kg de azeitonas por ano, sendo necessário cerca de 5 a 6 kg para se obter 1 litro de azeite ^[4].

Para a obtenção de um azeite de boa qualidade, as azeitonas devem chegar aos lagares inteiras, maduras, sãs para serem divididas e classificadas conforme a variedade e o seu estado de salubridade e serem laboradas até 24 horas após a apanha. Seguidamente são ventiladas para a retenção das folhas e lavadas com água corrente. Segue-se a moenda, que consiste na trituração das azeitonas até à formação de uma pasta, decorrente da ruptura das células da polpa (que tende a facilitar a saída do azeite pelos vacúolos formando-se gotas de maiores dimensões, que podem facilitar a respectiva separação, face às outras fases). Esta etapa é efectuada por moinhos de martelo metálicos ou de pedra (mós). Para assegurar a manutenção das características organolépticas do azeite virgem durante a moenda deve evitar-se uma exposição muito prolongada da pasta da azeitona ao ar, minimizando as reacções de peroxidação que posteriormente originam o ranço, e reduzir ao máximo a superfície livre de pasta, limitando deste modo as perdas de aroma do azeite. Após a moenda, a pasta é batida e aquecida (termobatedura), a fim de facilitar a separação do azeite. Posteriormente, procede-se à separação da fase sólida (bagaço) das fases líquidas (azeite e água de vegetação) por sistemas de pressão realizados por intermédio de capachos, seguidos de uma decantação (método clássico), por centrifugação (método contínuo) ou por percolação ou filtração selectiva (método descontínuo).

Ao contrário do que acontece com os outros óleos vegetais, não são admitidos para o azeite, solventes ou métodos químicos de extracção.

O azeite virgem assim obtido, é um produto natural que conserva inalteráveis todos os seus componentes e propriedades biológicas incluindo vitaminas, antioxidantes e características organolépticas. Para tal, deve ser armazenado em depósitos de aço inoxidável, em que estes devem ficar cheios, com um espaço de cabeça preenchido com gás inerte e permanecer entre 15 – 18 °C, permitindo, deste modo, uma correcta maturação

do azeite sem favorecer a sua oxidação. A ausência de cobre e de ferro são fundamentais, pois são dois metais que contribuem para o desenrolar deste fenómeno. A luminosidade também deve ser diminuta para evitar que reacções de fotoxidação ocorram ^[4].

De acordo com a legislação (Reg (CE) nº 1638/98 de 28/07/98), os azeites são classificados e denominados do seguinte modo:

Azeite Virgem - é o sumo das azeitonas, extraídas unicamente por processos mecânicos ou outros processos físicos – em condições nomeadamente térmicas, que não alterem a composição do azeite – e que não tenham sofrido outros tratamentos para além da lavagem, da decantação, da centrifugação e da filtração, com exclusão dos azeites obtidos com solventes ou por processos de reesterificação e de qualquer mistura com óleos de outra natureza.

- Azeite Virgem Extra: azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oléico, não superior a 1 g por 100 g, com odor e sabor perfeitos.

- Azeite Virgem: azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oléico, não superior a 2 g por 100 g, com odor e sabor perfeitos.

- Azeite Virgem corrente: azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oléico, não superior a 3,3 g por 100 g, com um bom sabor e odor.

- Azeite Virgem lampante: azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oléico, superior a 3,3 g por 100 g, com um sabor e odor impróprios para consumo ^[6].

Azeite refinado - é o azeite obtido por refinação do azeite virgem que apresente defeitos, por métodos que não provoquem alterações na estrutura glicérida inicial, com uma acidez livre, expressa em ácido oléico, não superior a 0,5 g por 100 g e com outras características conforme as previstas para esta categoria.

A refinação destina-se a eliminar do azeite substâncias que podem conferir aromas, cor, sabor e acidez elevada devido à influência de vários factores, como condições climáticas, colheita tardia das azeitonas, erros no processo de armazenamento e/ou extracção, entre outros, o que não permite a sua comercialização. Na refinação dos azeites virgens, desenvolvem-se processos de:

1) Neutralização dos ácidos gordos livres (acidez), com soluções alcalinas;

2) **Descoloração**, com adsorventes inertes ou membranas, que retira a cor, tornando o azeite um líquido semi-transparente;

3) **Desodorização**, pela passagem de vapor de água ou outros gases inertes, que retiram o odor do azeite, tornando-o inodoro [4, 6].

Azeite - composto por uma mistura de azeite refinado com azeite virgem (excluindo o lampante), com uma acidez livre, expressa em ácido oléico, não superior a 1,5 g por 100 g e com outras características conforme as previstas para esta categoria [6].

Na tabela 1-1 estão resumidos os vários tipos de azeite de acordo com as suas características.

Tabela 1-1: Tipos de azeite e suas características [6 adaptado].

TIPO DE AZEITE	ACIDEZ LIVRE (% ÁCIDO OLÉICO)	APLICAÇÃO
Azeite Extra-Virgem	≤ 1	Venda directa ao consumidor
Azeite Virgem	≤ 2	Venda directa ao consumidor
Azeite Virgem corrente	$\leq 3,3$	Para lotear com azeite refinado
Azeite Virgem lampante	$>3,3$	Farmácia, cosmética. Depois de refinado, pode ser para consumo
Azeite refinado	$\leq 0,5$	Para lotear com azeite virgem não lampante
Azeite	$\leq 1,5$	Azeite refinado enriquecido com azeite virgem. Venda ao consumidor

Para se definir a qualidade de um azeite, recorre-se à análise **química** e **sensorial**. São vários os factores que influenciam as características organolépticas de um azeite, tais como: a variedade de oliveiras, o clima, o solo, a altitude e as técnicas culturais. As principais análises químicas realizadas ao azeite são, entre outros, o grau de acidez, o índice de peróxidos, a absorção no UV a determinados comprimentos de onda, análise aos ácidos gordos esterificados e aos fitoesteróides (importantes na identificação de adulterações).

Antes de ser embalado, o azeite é classificado tendo em conta os parâmetros referidos anteriormente ^[6].

1.1.1.1. CONSTITUIÇÃO DO AZEITE

Quimicamente o azeite é constituído essencialmente por TAGs (98%), responsáveis pela viscosidade e densidade do referido óleo alimentar. Estes possuem um elevado teor em ácidos gordos monoinsaturados (MUFAs, cerca de 78%), baixo teor em ácidos gordos saturados (SFA, cerca de 14%), quantidades reduzidas de ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), em particular o ácido linolénico (<1,5%), principal responsável pela alteração das gorduras por processos oxidativos e ainda 2% de outros compostos, como álcoois alifáticos e triterpénicos, esteróis, ceras, fosfolípidos, pigmentos (clorofilas e feofitinas, responsáveis pela cor esverdeada do azeite), hidrocarbonetos como o esqualeno, compostos voláteis (associados ao mau sabor do azeite) e compostos antioxidantes (carotenóides, fenóis lipofílicos, hidrofílicos e tocoferóis, que apesar de se encontrarem presentes em muito baixa quantidade, protegem o nosso organismo dos radicais livres ^[6, 7].

A esterificação do glicerol com os ácidos gordos, originando um TAG está representada na figura 1-1.

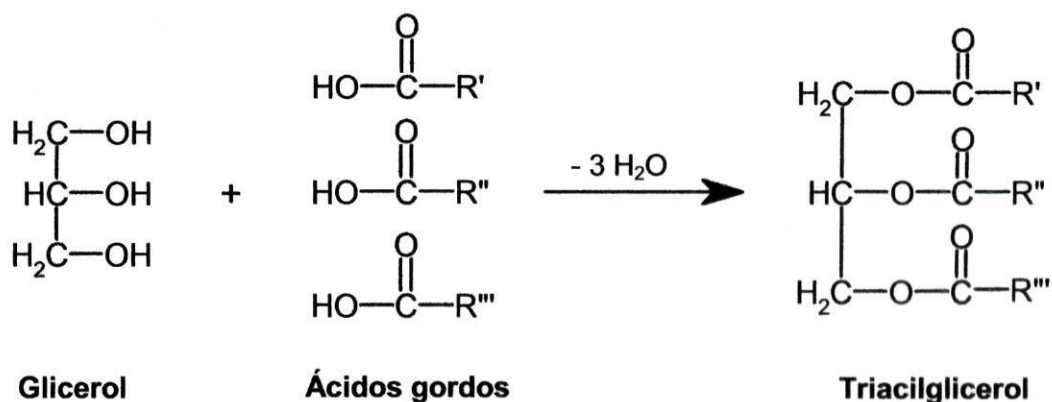


Figura 1-1: Formação de um triacilglicerol. Se $\text{R}' = \text{R}'' = \text{R}'''$ é um triacilglicerol simples, se R' , R'' e R''' são diferentes, é um triacilglicerol complexo ou misto ^[8].

São várias as reacções químicas a que os TAGs estão sujeitos, nomeadamente:

- **hidrólise**, reacção inversa da sua formação (esterificação); pode ser catalisada por ácido, originando ácidos gordos e glicerol, ou por base (saponificação), dando origem a glicerol e sais de ácidos gordos (carboxilatos de sódio e potássio)^[8];

- **hidrogenação catalítica**: método no qual se adiciona hidrogénio directamente às ligações duplas dos ácidos gordos, catalisado por Níquel (Ni) ou Platina (Pt)^[8]. O número das ligações duplas nas moléculas dos ácidos gordos é, portanto, reduzidos^[9]. Tratar a gordura com H₂ gasoso de alta pureza, na presença de um catalisador (Ni, por ex.) e sob condições de elevadas pressões e temperaturas (1-10 atm; 160-220 °C), conduz a **reacções de isomerização** – geométrica e de posição, ou seja, conversão das ligações duplas *cis* dos ácidos gordos, em *trans* (esta é a configuração termodinamicamente preferidas ligações duplas). O ponto de fusão de uma gordura hidrogenada depende do grau de saturação que se obtenha e da concentração de isómeros *trans* e posicionais que se formem^[8];

- **ranço oxidativo**, que será discutido mais adiante na oxidação lipídica.

1.1.1.1.1. Ácidos gordos no azeite

O azeite é uma substância rica em ácidos gordos, de entre os quais se destaca o **ácido oléico**, com cerca de 78% do total dos ácidos gordos que o constituem. Trata-se de um ácido gordo de 18 átomos de carbono, que tem uma só ligação dupla entre os carbonos 9 e 10. É certo que se metaboliza facilmente, constituindo uma fonte de energia de imediata utilização^[10].

Pelo facto de ser constituído maioritariamente por ácido oléico, o azeite é considerado uma gordura essencialmente monoinsaturada. No entanto, para além deste, os ácidos palmítico, palmitoléico, esteárico, linoleico e linolénico estão também presentes em quantidades consideráveis.

Na tabela 1-2 encontra-se a composição em ácidos gordos presentes no azeite e os respectivos limites.

Tabela 1-2: Composição dos ácidos gordos no azeite de acordo com a norma NP-972, 1973 [6].

ÁCIDO GORDO	ESTRUTURA	LIMITES (%)
Palmítico (C16:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	7,5 – 20,0
Palmitoléico(C16:1)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	0,3 - 3,5
Estearico (C18:0)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	0,5 - 5,0
Oleico (C18:1)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	55,0 - 83,0
Linoleico (C18:2)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	2,0 – 20,0
Linolénico (C18:3)	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	0,1 - 1,5

1.1.2. ÓLEOS DE OLEAGINOSAS

As sementes de oleaginosas, nomeadamente de **soja** (*Glycine max L.*), **amendoim** (*Arachis hypogaea L.*), **girassol** (*Helianthus annus L.*) e **milho** (*Zea mays L.*) constituem a matéria-prima essencial à produção de óleos brutos que, após a refinação, originam os óleos alimentares [4, 11].

Para o controlo de qualidade dos óleos refinados, devem efectuar-se análises para a aferição do índice de peróxidos, o qual não deve exceder os 10 mEq O_2 / kg de gordura, da acidez (expressa em ácido oleico e que deve ser inferior a 0,2 %) e da viscosidade entre outros parâmetros, procedendo-se então ao armazenamento em tanques, para posterior enchimento, capsulagem e rotulagem em garrafas [4].

Tal como o azeite, os óleos de oleaginosas possuem uma fracção saponificável, constituída maioritariamente (90-99%) por TAGs, com uma percentagem de ácidos gordos variável, que definem algumas das suas características, nomeadamente, a sua viscosidade, ponto de fusão e a sua estabilidade oxidativa. Assim, equacionando o grau de insaturação e o tamanho das moléculas dos ácidos gordos, os óleos vegetais com um elevado teor em ácido linoleico e linolénico (PUFAs), tendem a ser pouco resistentes à oxidação. Por outro lado, os óleos mais saturados (com elevadas quantidades de ácido esteárico ou palmítico) possuem uma viscosidade elevada e apresentam uma maior resistência face à oxidação.

Na tabela 1-3 podemos observar a composição em ácidos gordos existente em alguns óleos alimentares e os respectivos limites.

Tabela 1-3: Composição dos ácidos gordos nos óleos de milho, soja, amendoim e girassol. (De acordo com as normas: NP – 961,1979; NP – 1539,1978; NP – 946, 1981;NP – 945, 2004).

LIMITES (%)						
A. G. ÓLEOS	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Óleo de milho	8,0 - 19,0	máx. 0,5	0,5 - 4,0	25,0 - 50,0	34,0 - 62,0	máx. 1,9%
Óleo de soja	7,0 - 13,0	-	2,0 - 6,0	19,0 - 35,0	40,0 - 62,0	4,0 - 14,0
Óleo de amendoim	8,0 - 14,0	máx. 0,2	1,0 - 4,5	35,0 - 69,0	12,0 - 43,0	máx. 0,3
Óleo de girassol	3,0 - 10,0	0,5 - 0,1	2,0 - 8,0	14,0 - 40,0	40,0 - 75,0	máx. 0,5

1.2. ANTIOXIDANTES

O oxigénio é absolutamente necessário à vida, em particular à respiração celular. Contudo, o seu metabolismo pode originar elementos reactivos, as chamadas **espécies reactivas de oxigénio**. Estes compostos de oxigénio quimicamente instáveis, estão naturalmente presentes no nosso organismo, como resultado de reacções bioquímicas que ocorrem nos nossos sistemas orgânicos.

Felizmente, compostos denominados **antioxidantes**, rapidamente combatem estas espécies, inibindo o "stress" oxidativo (excesso de radicais livres). Portanto, antioxidantes são substâncias capazes de inibir ou retardar o desenvolvimento do processo de oxidação, bloqueando a formação de radicais livres, ou interagindo com estes, tornando-os inactivos [4,12].

A inibição da autooxidação pelos antioxidantes é uma prática importante na preservação dos lípidos polinsaturados face à deterioração oxidativa. Antioxidantes sintéticos como o butilhidroxianisol (BHA), 2,6-di-*t*-butil-4-metoxifenol (BHT) ou *t*-butilhidroquinona (TBHQ) (figura 1-2) têm vindo a ser largamente utilizados como antioxidantes em alimentos.

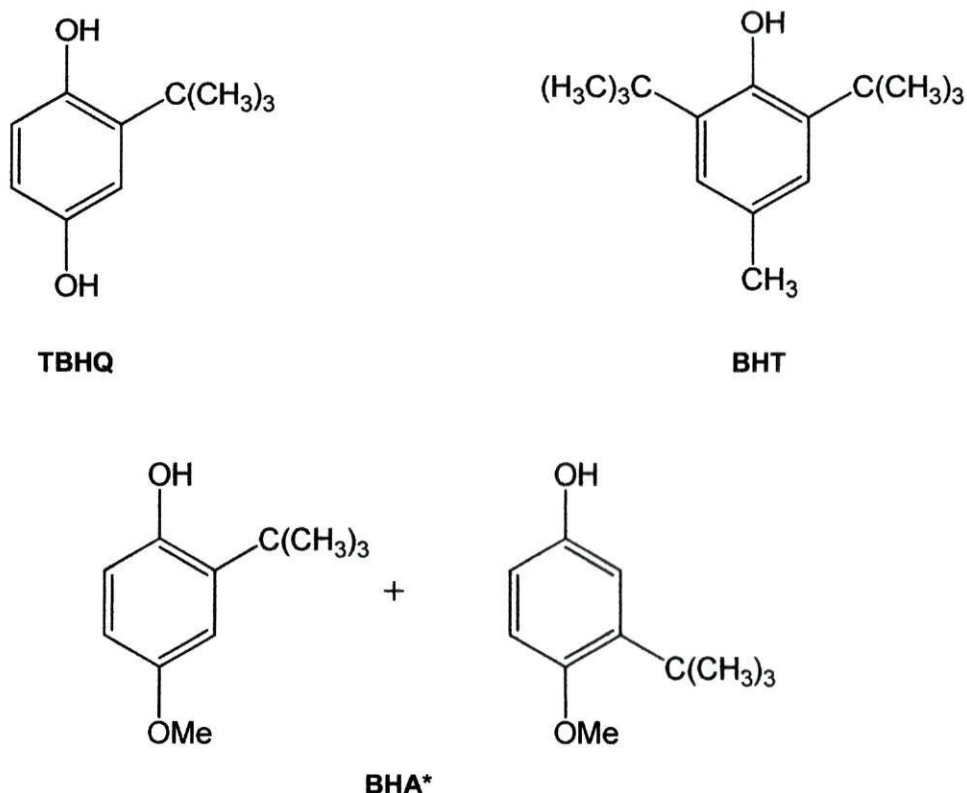


Figura 1-2: Fórmulas de estrutura de alguns antioxidantes sintéticos. * O BHA é uma mistura dos dois isómeros estruturais.

Embora estes antioxidantes sejam eficazes e relativamente baratos, tem sido dada uma especial atenção ao uso de antioxidantes naturais, como os polifenóis e os tocoferóis, uma vez que têm mostrado claros efeitos benéficos como agentes anti-carcinogénicos e como inibidores de reacções de oxidação existentes biologicamente no nosso organismo [13,14].

De acordo com a sua natureza, os antioxidantes podem ser classificados em dois grupos:

- **Primários ou “chain-breaking”**, os quais reagem com os radicais lipídicos altamente energéticos, convertendo-os em produtos termodinamicamente mais estáveis através da doação do seu hidrogénio aos radicais alquilperóxido (ROO^\bullet) ou alquilo (RO^\bullet) formados durante a iniciação da oxidação lipídica (1 e 2).



Um exemplo deste tipo de antioxidantes são os fenóis. O fenol por si só é inactivo, mas a substituição de grupos alquilo nas posições 2, 4 ou 6 aumenta a densidade electrónica no grupo hidroxilo por efeitos estéreos e indutivos, aumentando deste modo a sua reactividade com o radical lipídico. Este é estabilizado pela deslocalização de um electrão desemparelhado no anel aromático como mostra a figura 1-3.

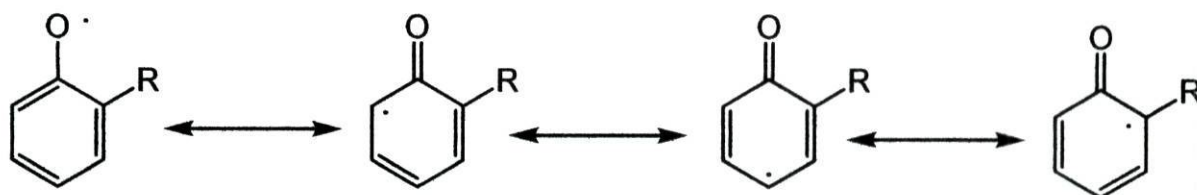
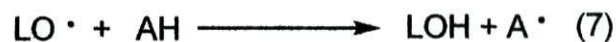
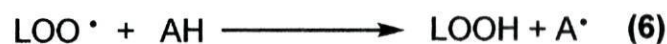
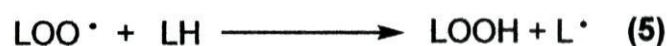


Figura 1-3: Estabilização de um fenol alquilado por deslocalização electrónica (R = grupo alquilo).

O efeito antioxidante está directamente relacionado com a estabilidade por ressonância dos radicais fenoxilo.

Os antioxidantes primários, reagem com os radicais lipídicos convertendo-os em produtos mais estáveis, como podemos observar pelas equações que se seguem (3-7):



Os lípidos polinsaturados (LH) podem formar radicais livres ($\text{L} \cdot$) quando se oxidam na presença de um iniciador ($\text{X} \cdot$) (3) (ver oxidação lipídica). Estes radicais alquilo reagem muito rapidamente com o oxigénio, formando radicais peróxido ($\text{LOO} \cdot$) (4), que por sua vez, reagem com outras moléculas lipídicas, originando hidroperóxidos (LOOH) (5). Os antioxidantes (AH), inibem esta oxidação reagindo com os radicais peróxido, terminando, deste modo, a propagação da cadeia (6) e com os radicais alcóxido ($\text{LO} \cdot$) para inibir a decomposição dos hidroperóxidos e diminuir a formação de compostos indesejáveis, como os aldeídos (7). Deste modo, os antioxidantes primários competem com o substrato lipídico, originando um

radical (A[•]) que pode formar produtos não radicalares como dímeros, peróxidos estáveis, alquilos ou derivados insaturados.

O poder antioxidante dos compostos depende de vários factores, nomeadamente da sua estrutura, concentração e da temperatura ^[15,16]. Assim, são antioxidantes eficazes a baixas concentrações, mas podem exercer uma acção pró-oxidante na presença de elevadas concentrações existentes nos óleos vegetais ^[17]. A sua actividade antioxidante também diminui com o aumento da temperatura ^[18].

• **Secundários ou preventivos**, os quais reduzem a velocidade do processo de iniciação, impedindo, ou pelo menos retardando, a formação de radicais livres resultantes da decomposição dos hidroperóxidos através de vários mecanismos, tais como:

- complexação de metais (ex. ácido cítrico, ácido ascórbico, compostos fenólicos);
- absorção de radiação UV (ex. carotenos) ^[19-21].

Uma vasta quantidade de antioxidantes está presente nos óleos alimentares ^[22]. Assim, no azeite destacam-se os carotenóides e os compostos fenólicos (fenóis e polifenóis), que por sua vez podem ser hidrofílicos, em que a sua maioria não é encontrada noutros óleos ou gorduras e lipofílicos, como os tocoferóis, maioritariamente presentes em óleos vegetais, como o óleo de girassol, milho, soja e amendoim ^[23]. De notar que estes óleos, extraídos de sementes contêm pouca ou nenhuma quantidade de carotenóides ^[24].

1.2.1. CAROTENÓIDES

Os carotenóides são hidrocarbonetos biossintetizados a partir de 8 unidades de isopreno (tetraterpenos) e como tal, possuem um esqueleto de 40 átomos de carbono ^[20, 25].

Estes compostos são os responsáveis pela intensa cor amarela, alaranjada ou vermelha de uma elevada quantidade de alimentos provenientes de plantas, cor essa que resulta da presença de um sistema de ligações duplas conjugadas na molécula ^[25]. Juntamente com os resíduos de clorofila (a e b), são os responsáveis pela cor amarela-esverdeada do azeite ^[6].

São compostos lipossolúveis e extremamente sensíveis à luz e ao oxigénio. Na ausência destes factores, os carotenóides são estáveis nos alimentos, mesmo a temperaturas elevadas. A sua degradação é acelerada pelos radicais livres que se formam durante a oxidação lipídica ^[4, 25].

Podem distinguir-se duas grandes famílias de carotenóides:

- **Carotenos**, formados por carbono e hidrogénio, são moléculas altamente apolares (ex. β -caroteno e licopeno);
- **Xantofilas**: carotenóides mais polares, que contêm na sua estrutura vários grupos oxigenados, como o grupo hidroxilo (ex. luteína, zeaxantina – presente no milho) e o grupo carbonilo (ex. violaxantina, neoxantina) ^[25].

No azeite estão presentes, essencialmente, a luteína, responsável pela pigmentação de certos vegetais, o β -caroteno, pró-vitamina A, importante na estimulação do sistema imunológico, a violaxantina e a neoxantina ^[6, 26].

1.2.2. FOSFOLÍPIDOS

O azeite virgem recém produzido pode conter pequenas quantidades destes compostos saponificáveis, sendo a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina os fosfolípidos mais conhecidos ^[6].

1.2.3. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos estão abundantemente presentes nas plantas. São considerados como uma das principais classes de metabolitos secundários das mesmas, que apresentam propriedades sensoriais (ex. cor e sabor) e nutricionais muito peculiares ^[25, 27].

Estes compostos estão presentes no azeite virgem e caracterizam-se, convencionalmente, como “polifenóis”. Trata-se de um termo convencional, uma vez que nem todos são polihidroxilados e são parte da fracção polar obtida do azeite por extracção com metanol-água ^[28]. O azeite refinado, assim como outros óleos vegetais são praticamente desprovidos deste tipo de antioxidantes, uma vez que, como são compostos polares, facilmente são eliminados durante a refinação ^[6].

As principais classes de compostos fenólicos presentes no azeite virgem são: álcoois fenólicos, ácidos fenólicos, flavonóides, lignanos e secoiridóides.

1.2.3.1. ÁLCOOIS FENÓLICOS

Os compostos 3,4-dihidroxifeniletanol (3,4-DHPEA ou hidroxitirosol, **HyTy**) e o *p*-hidroxifeniletanol (*p*-HPEA ou tirosol, **Ty**) são os álcoois fenólicos mais abundantes no azeite virgem [29, 30]. A sua concentração é geralmente baixa nos óleos frescos, mas aumenta durante o seu armazenamento [31]. Tal facto deve-se à hidrólise dos secoiridóides existentes no azeite virgem que contêm 3,4-DHPEA e *p*-HPEA na sua estrutura molecular.

Posteriormente foi identificado o acetato de 2-(3,4-dihidroxifenil)etilo (acetato de hidroxitirosol, **HyTyAc**) como componente da fracção fenólica do azeite [32]. (figura 1-4)

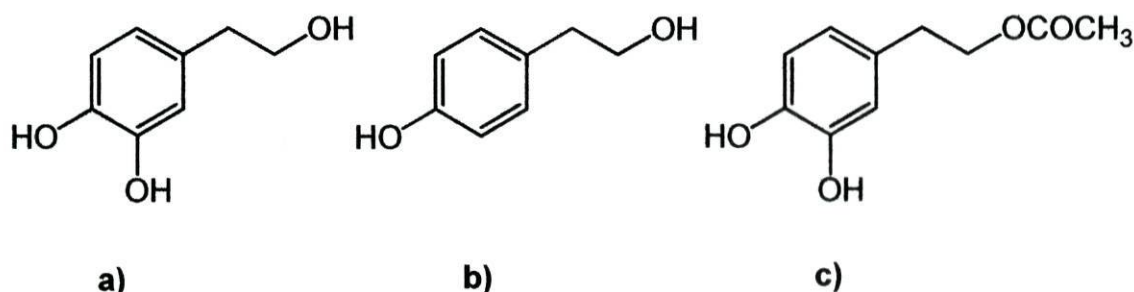


Figura 1-4: Estrutura química dos álcoois fenólicos e seus derivados presentes no azeite virgem. a) Hidroxitirosol; b) Tirosol; c) Acetato de hidroxitirosol [7].

1.2.3.2. ÁCIDOS FENÓLICOS

Os ácidos fenólicos possuem uma estrutura química básica de C₆-C₁ (ácidos benzóicos) e C₆-C₃ (ácidos cinâmicos) [29]. Estes compostos, como o ácido vanílico, siríngico (figura 1-5), *p*-cumárico e ácido cafeico (figura 1-6) foram o primeiro grupo de fenóis observados no azeite virgem [33, 34].

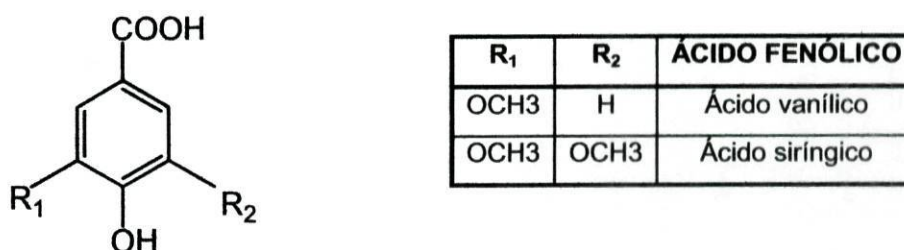


Figura 1-5: Estrutura química de ácidos benzóicos [7].

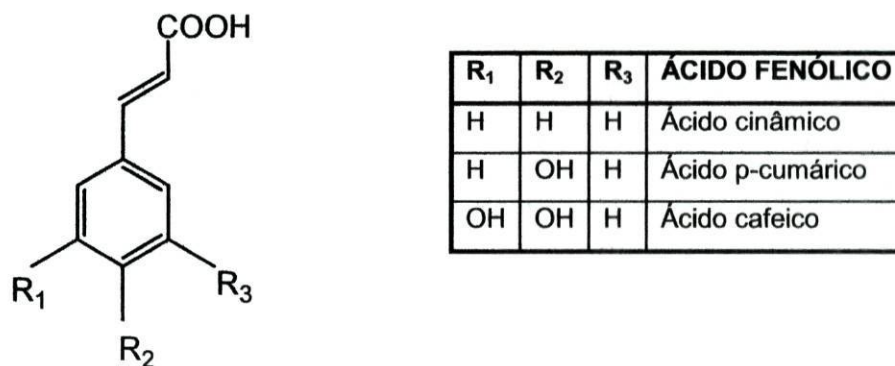


Figura 1-6: Estrutura química de ácidos cinâmicos [7].

1.2.3.3. FLAVONÓIDES

Os flavonóides são compostos com um esqueleto de 15 átomos de carbono. Todos eles possuem duas unidades distintas: um fragmento C₆-C₃ que contém o anel AC e o fragmento C₆ que contém o anel B (figura 1-7).

É um grupo de fenóis bastante diversificado em termos estruturais, subdividido em várias classes, tais como as catequinas, antocianinas, flavonóis e flavononas, entre outras, sendo que a actividade antioxidante de cada uma delas advém da presença das estruturas fenólicas na sua constituição.

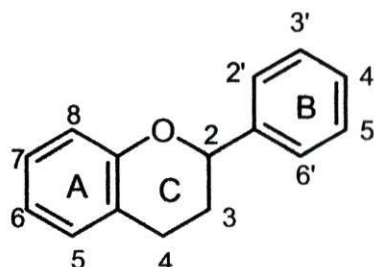


Figura 1-7: Estrutura química de um flavonóide [35].

A quantidade deste grupo fenólico tanto na azeitona como no azeite virgem é bastante baixa. No entanto, Rovelli *et al.* reportaram que no azeite virgem estão presentes, essencialmente, a luteolina e a apiginina (flavononas) [7, 36, 37].

1.2.3.4. LIGNANOS

Recentemente isolados e caracterizados, os lignanos encontrados mais frequentemente no azeite virgem são o pinoresinol (**Py**) e o (+)-1-acetopinoresinol (**PyAc**)

(figura 1-8) ^[7]. Este grupo de compostos fenólicos parece ser dos mais estáveis durante o armazenamento do óleo ^[31, 32].

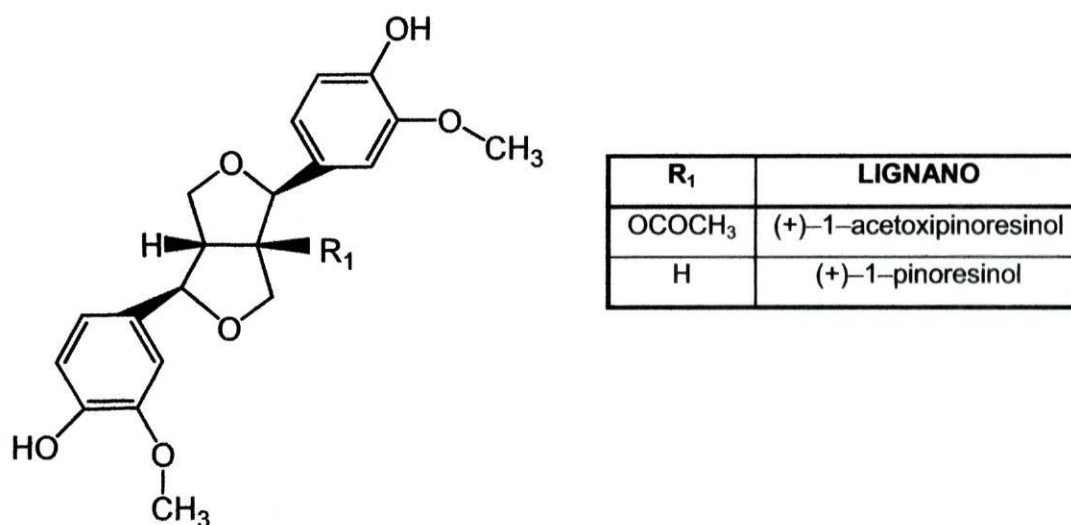


Figura 1-8: Estrutura química dos lignanos presentes no azeite virgem ^[7].

1.2.3.5. SECOIRIDÓIDES

Enquanto os ácidos fenólicos, álcoois fenólicos e os flavonóides estão presentes em muitos frutos e vegetais pertencentes a várias famílias botânicas, os secoiridóides encontram-se exclusivamente em plantas pertencentes à família *Oleaceae*, na qual se inclui a oliveira (*Olea europaea*) ^[38].

São os compostos fenólicos presentes em maior abundância no azeite virgem. Caracterizam-se pela presença do ácido elenólico ou derivados deste na sua estrutura molecular ^[29].

Os secoiridóides predominantes no azeite virgem são: a forma dialdeídica do ácido elenólico ligado 3,4-DHPEA (3,4-DHPEA-EDA), secoiridóide mais abundante no azeite virgem, um isómero da oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EA), a forma dialdeídica do ácido elenólico ligado ao *p*-HPEA (*p*-HPEA-EDA) e um isómero do ligstrósido aglicona (*p*-HPEA-EA) (figura 1-9) ^[31, 39]. Estes fenóis hidrofílicos podem ser originados durante o esmagamento das azeitonas, por hidrólise da oleuropeína (OI), desmetiloleuropeína e ligstrósido (figura 1-10) ^[7].

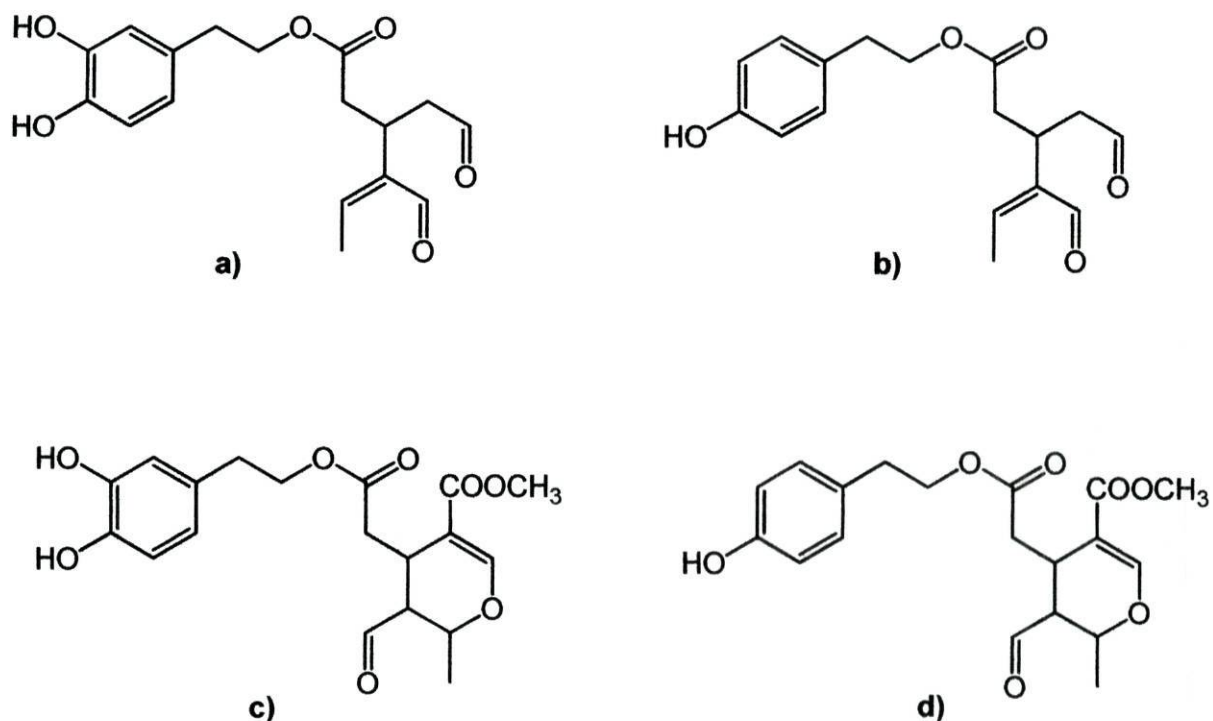


Figura 1-9: Estruturas químicas dos secoiridóides presentes no azeite virgem.

a) 3,4-DHPEA-EDA, b) *p*-HPEA-EDA, c) 3,4-DHPEA-EA, d) *p*-HPEA-EA.

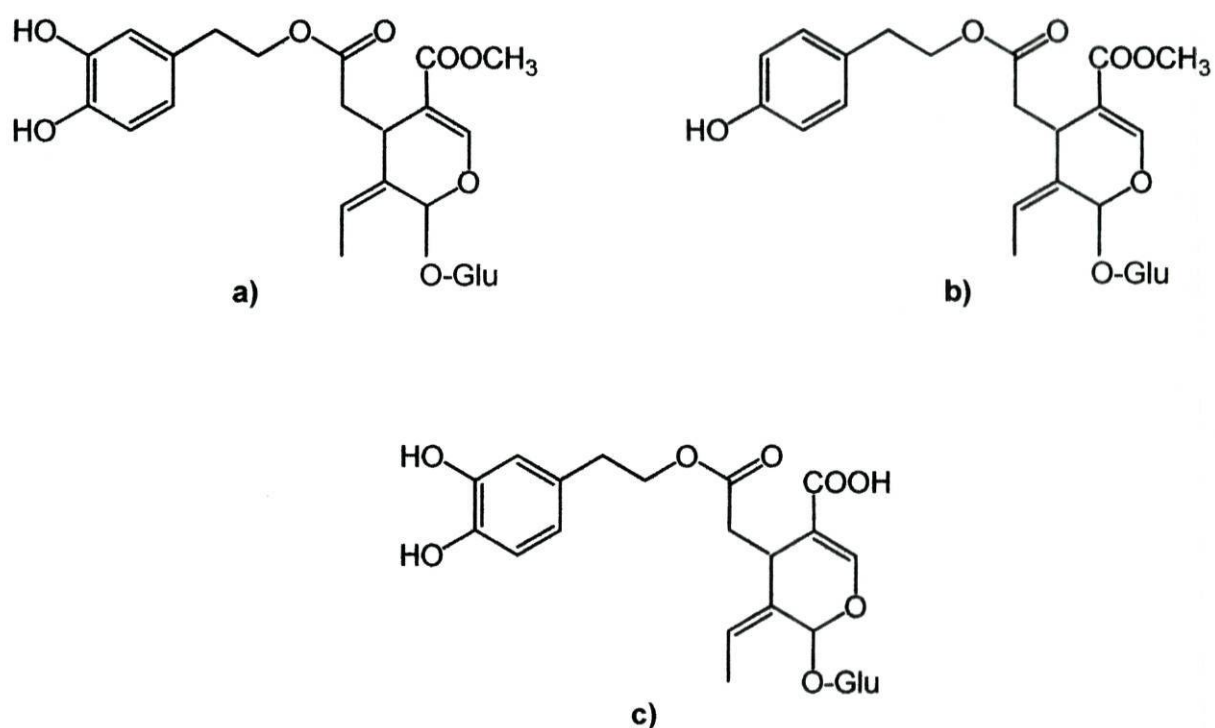


Figura 1-10: Estruturas químicas dos secoiridóides presentes na azeitona ^[7, 40].

a) Oleuropeína, b) ligstrósido, c) desmetiloleuropeína.

Enquanto a oleuropeína e a desmetiloleuropeína foram encontrados em todas as partes da azeitona como a casca, polpa e semente, o secoiridóide nüzhenide (figura 1-11), derivado do tirosol, caracterizado por Servilli *et al.*,^[41] foi exclusivamente encontrado na semente do fruto.

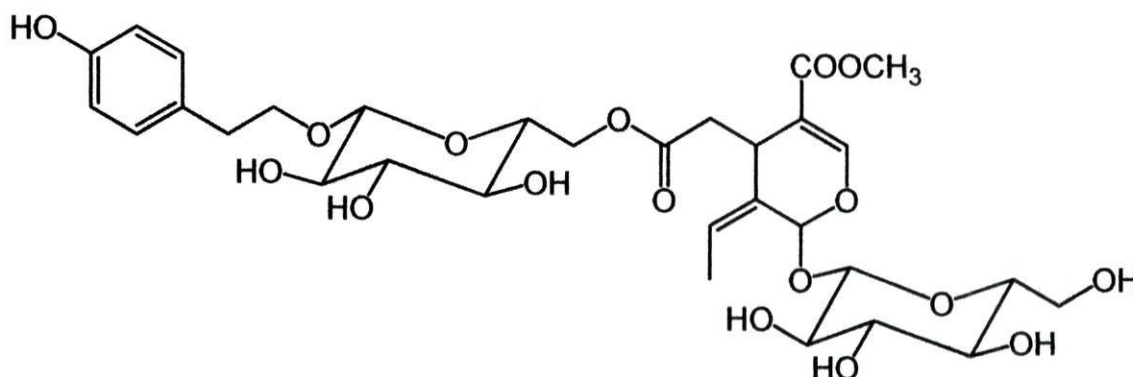


Figura 1-11: Estrutura química do nüzhenide^[7].

A oleuropeína e o ligstrósido (glicósidos) são os principais compostos presentes na azeitona, no entanto, são praticamente inexistentes no azeite devido à sua elevada solubilidade em água, sendo encontrados os seus derivados que igualmente contêm o grupo catecol do HyTy^[40]. Quimicamente, a oleuropeína é um éster do ácido elenólico com o HyTy; as correspondentes agliconas são originadas por hidrólise ácida, enquanto o HyTy se obtém por hidrólise alcalina. A estrutura do ligstrósido é similar à da oleuropeína, mas com Ty em detrimento do HyTy^[6, 42].

1.2.3.6. TOCOFERÓIS

Os tocoferóis (vitamina E) são antioxidantes monofenólicos naturais, presentes essencialmente nos óleos de sementes oleaginosas como o óleo de girassol, milho, soja e amendoim, mas também no azeite virgem (em menor quantidade). São compostos importantes, pois contribuem para a estabilidade dos mesmos, tornando-os menos susceptíveis à oxidação.

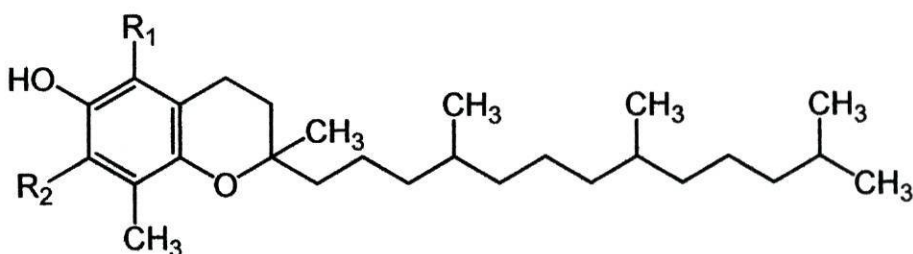
A quantidade de tocoferol presente nos óleos alimentares (tabela 1-4) é afectada pelo cultivo, processamento e armazenamento do óleo^[43]. O processo de refinação, em particular a desodorização, reduz o teor deste antioxidante nos óleos^[15, 44, 45].

Tabela 1-4: Quantidade (mg / 100g) de tocoferóis em óleos alimentares [6, 25].

Óleo	α -tocoferol	β -tocoferol	γ -tocoferol	δ -tocoferol
Girassol	56,4	2,45	0,4	0,09
Milho	27,2	0,2	56,6	2,4
Soja	17,9	2,8	60,4	37,1
Amendoim	14,1	0,4	13,1	0,92
Azeite	9,0*	0,2	0,5	0,04

(* representa 95% do total de tocoferóis)

Os tocoferóis diferem uns dos outros apenas no número e posição dos grupos metilo do anel aromático (figura 1-12). A sua actividade depende do meio, da temperatura e da presença de metais pesados (ex. ferro e cobre), uma vez que actuam como pró-oxidantes na presença destes.



R ₁	R ₂	ESTRUTURA
CH ₃	CH ₃	α -tocoferol
CH ₃	H	β -tocoferol
H	CH ₃	γ -tocoferol
H	H	δ -tocoferol

Figura 1-12: Estrutura química dos tocoferóis presentes nos óleos alimentares [46].

O α -tocoferol, completamente metilado, é o tocoferol mais abundante na natureza e com maior poder antioxidante a nível biológico. No entanto, a sua actividade nos óleos aumenta na seguinte ordem: α -tocoferol < β -tocoferol < γ -tocoferol < δ -tocoferol [37, 47, 48].

1.2.3.7. A IMPORTÂNCIA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

É difícil estabelecer uma função biológica a cada um dos compostos fenólicos presentes nos óleos alimentares. No entanto, pode dizer-se que todos eles possuem propriedades químicas e biológicas comuns, tais como: actividade antioxidante, de complexação e potencial para a autoxidação.

Os compostos fenólicos são importantes na fisiologia das plantas, contribuindo para a sua resistência face aos microorganismos e insectos e nas características organolépticas, como o odor e o sabor. Exibem relevantes propriedades antioxidantes, preservando a integridade da planta face ao stress ambiental, incluindo a radiação de UV e temperaturas elevadas ^[49].

1.2.3.7.1. *A importância dos compostos fenólicos na qualidade do azeite virgem:*

Ao contrário do que acontece noutros óleos vegetais, o azeite virgem contém uma elevada quantidade de microcomponentes, dos quais fazem parte os polifenóis (100-1000 mg / kg), que depende de vários factores como o clima e o grau de maturação da azeitona, assim como a produção do azeite e o seu armazenamento ^[49]. Os compostos fenólicos contribuem para as propriedades sensoriais da azeitona e do azeite virgem, como a cor e o sabor. A oleuropeína, por exemplo, é o principal composto responsável pelo sabor amargo do fruto.

1.2.3.7.2. *A importância dos compostos fenólicos na saúde humana:*

O interesse pela dieta mediterrânica tem vindo a aumentar, desde que estudos epidemiológicos mostraram que o consumo de legumes, frutas, vegetais, vinho em quantidade moderada e de azeite está associado a uma melhor qualidade de vida e à baixa incidência de doenças cardiovasculares e certos cancros ^[50, 51]. O valor nutricional do azeite advém da presença de uma elevada quantidade de ácido oléico e de compostos minoritários como os fitosteróis, carotenóides, tocoferóis e fenóis hidrofílicos ^[50, 52].

Os lípidos que circulam na corrente sanguínea (TAGs, fosfolípidos, colesterol livre e esterificado) estão estritamente relacionados com proteínas, formando lipoproteínas que actuam como principal veículo de transporte dos lípidos, desde as zonas de absorção ou degradação às de utilização ou eliminação. Estas classificam-se, normalmente, em função

da sua densidade, em 4 categorias: quilomicra, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL). As quilomicra são as lipoproteínas de maior tamanho e de menor densidade, enquanto que as HDL são as mais pequenas e as mais densas, diferindo entre si nas quantidades relativas de TAGs, fosfolípidos, ésteres de colesterol e proteínas. Assim, quanto mais densa for a lipoproteína, menor o seu conteúdo em TAGs e em colesterol. As LDL, são as principais transportadoras de colesterol no sangue desde o fígado até aos tecidos e os factores que influenciam os seus níveis no sangue tendem também a afectar a concentração total de colesterol. Ao contrário das LDL (vulgarmente denominadas o “mau” colesterol), as HDL (“bom” colesterol), têm um papel de transporte do colesterol desde as células dos tecidos ou órgãos periféricos, onde este se encontra em excesso, ao fígado, onde pode ser reutilizado ou excretado pela via biliar, quer na forma livre, quer na forma de ácidos biliares [9, 53].

Sendo o azeite rico em ácido oléico e linoleico, acredita-se então, que esta composição seja em parte, responsável pelo aumento da concentração das HDL, as quais representam um factor de protecção na prevenção de doenças coronárias. O ácido oléico, facilmente metabolizado, reduz também a agregação plaquetária, contribuindo para a estabilização da pressão arterial e glicemia; exerce ainda uma influência positiva no crescimento ósseo [54].

Estudos efectuados mostraram que os polifenóis do azeite virgem inibem a oxidação das LDL, factor determinante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como a aterosclerose [55-58]. Vários estudos foram realizados aos secoiridóides e derivados, como o HyTy, HyTy-EDA e HyTy-EA [50, 59].

- Petroni *et al.* [60] avaliaram a inibição da agregação das plaquetas sanguíneas pelo HyTy e o seu envolvimento na síntese de tromboxano nas células humanas. Posteriormente, testaram o efeito pela oleuropeína e flavonóides na agregação das plaquetas sanguíneas, concluindo que estes são muito menos activos do que o HyTy;

- Bisignano *et al.* [61] verificaram que o HyTy e a OI possuem uma actividade antibactericida contra os principais agentes causadores das infecções intestinais e do tracto respiratório nos seres humanos;

- O HyTy e o Ty são dos compostos fenólicos mais característicos do azeite virgem [62]. São absorvidos quando ingeridos e excretados pela urina como compostos livres e glucoronídeos conjugados [57].

- Baseados na pungência na garganta, provocada pela ingestão do azeite, Beauchamp *et al.* [63-64] analisaram o Ty-EDA, referido agora como “oleocantal” e verificaram que este possui efeitos semelhantes ao ibuprofen, um potente modulador da inflamação e analgésico. Estes autores mostraram que, tal como o ibuprofen, ambos os enantiómeros do Ty-EDA inibem a actividade, dependente da dose, de COX-1 e COX-2 (enzimas ciclo-oxigenase que catalisa os passos “chave” para a inflamação bioquímica derivado do ácido araquidónico). Assim, o consumo de oleocantal, a longo prazo, poderá contribuir para a protecção de determinadas doenças, em virtude da sua actividade inibidora da COX, à semelhança do ibuprofen. É digno de ser mencionado que a hidrólise ácida do oleocantal pode originar o ácido elenólico que é um composto dialdeídico ainda mais semelhante ao ibuprofen do que o próprio oleocantal;
- Owen *et al.* mostraram o carácter inibidor dos lignanos no crescimento de células cancerígenas da mama, pele, língua e do cólon [65];
- Estudos epidemiológicos mostraram que a vitamina E contida nos óleos vegetais, à semelhança dos polifenóis, também contribuem para um menor risco de doenças cardiovasculares ao reduzirem a peroxidação de PUFA's [66-68]. A vitamina E é absorvida no intestino, juntamente com os lípidos e transportada para o fígado pelas quilomicras [69].

❖ **Aterosclerose**

As doenças cardiovasculares são responsáveis por mais de metade da mortalidade nos países ocidentais, onde o consumo de gorduras de origem animal prevalece sobre o consumo de gorduras de origem vegetal.

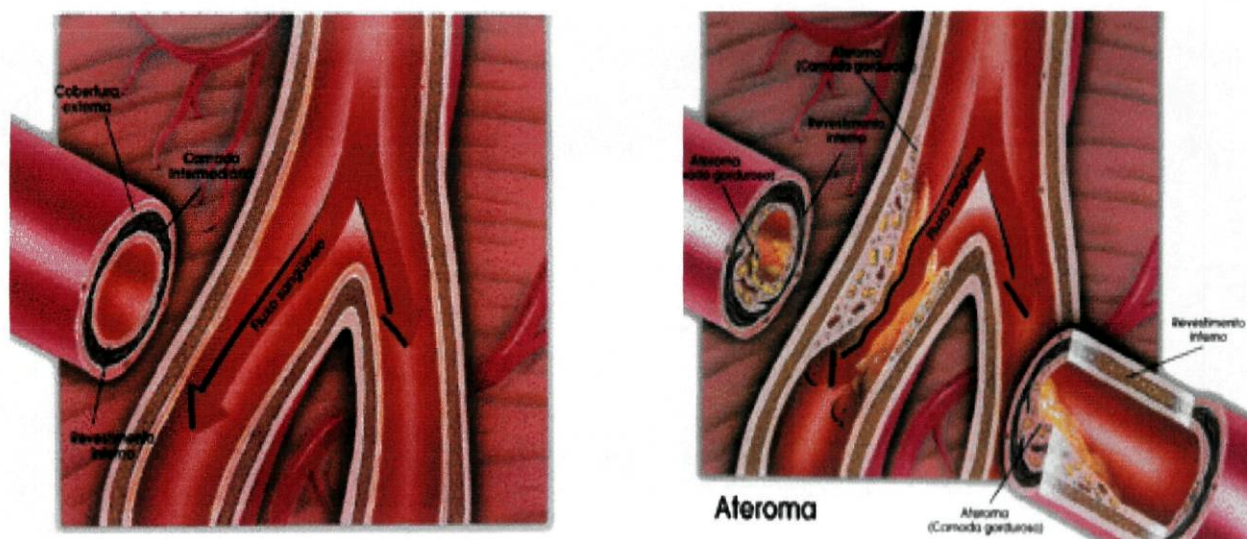
O colesterol, é um componente de todas as membranas plasmáticas eucarióticas, essencial para o crescimento e viabilidade dos organismos superiores. No entanto, um elevado nível de colesterol no sangue contribui para o desenvolvimento da aterosclerose [37].

A aterosclerose é uma doença que se caracteriza pelo endurecimento e espessamento das paredes das artérias de médio e grande calibre, devido à deposição na íntima de lípidos (em especial de colesterol), tecidos fibrosos e cálcio. Deste modo o seu calibre é reduzido, dificultando o fluxo de sangue circundante [37, 70, 71].

Esta patologia está relacionada com o aumento da concentração em LDL e diminuição da concentração em HDL no sangue como resultado de modificações estruturais e funcionais provocadas pela oxidação das LDL. A incorporação de lípidos já oxidados nas

LDL e / ou a oxidação de lípidos presentes nas LDL podem estar na origem da oxidação das referidas lipoproteínas. No entanto, a oxidação catalisada por metais é também uma hipótese válida para a iniciação da oxidação lipídica, tendo em conta que estes se encontram amplamente distribuídos no organismo e nos alimentos sob a forma de complexos proteicos ^[37].

O processo aterosclerótico inicia-se com a disfunção do endotélio vascular, que consiste num aumento da permeabilidade e migração de monócitos permitida pela citotoxicidade das formas oxidadas das LDL. As LDL oxidadas funcionam como factores quimioatractivos (quimiotaxia) face aos monócitos circulantes, promovendo a sua passagem pelas junções interendoteliais para a espaço subendotelial - íntima (diapedese). Aqui as LDL não oxidadas que penetraram também estão sujeitas à oxidação. Na íntima, os monócitos diferenciam-se em macrófagos, nos quais foram descobertos receptores "scavenger", específicas para a apo-B-100 oxidadas, que induzem a fagocitose das LDL oxidadas e que não são regulados pelos níveis intracelulares do colesterol, ocorrendo a deposição destas células contendo altos níveis de colesterol dentro da parede arterial. Estes macrófagos modificados denominam-se células esponjosas. A modificação oxidativa do epítipo proteico (apoproteína B-100) das LDL, que permite o seu reconhecimento por receptores membranares específicos e, conseqüentemente, a sua interiorização celular, provoca ainda uma inibição da mobilidade dos monócitos residentes, contribuindo para a sua adesão nas paredes vasculares ^[37]. Deste modo ocorre uma deposição de material, formando-se as placas ateroscleróticas (ateromas) nas paredes do sistema circulatório. Estas tendem a depositar-se nas zonas onde o fluxo de sangue é mais intenso e turbulento. Sobre as placas podem formar-se coágulos de sangue (trombos), que ao se desprenderem, originam embolias (oclusões) arteriais, podendo deste modo, obstruir total ou parcialmente uma artéria, impedindo ou reduzindo a passagem do sangue ^[70, 72]. De seguida, na figura 1-13, estão representadas duas artérias, uma saudável e outra já com ateromas.



ARTÉRIA NORMAL

ARTÉRIA COM ATEROMA

Figura 1-13: Artéria normal e outra com ateroma.

Existem numerosos **factores de risco** que contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose [9]. Estes podem ser **irreversíveis** (ex. idade, sexo e hereditariedade), **reversíveis** (ex. tabagismo, consumo excessivo de álcool, hipertensão, diabetes e dieta) e **protectores** (ex. exercício físico e estrogénio) [9].

O risco da aterosclerose aumenta com a idade, provavelmente devido ao tempo que as placas levam a formar-se [70]. Esta doença cardiovascular afecta mais o sexo masculino do que o feminino antes da menopausa, pois aparentemente, o estrogénio (uma hormona feminina) tem efeitos benéficos. Após este período, a diferença entre os sexos torna-se menos evidente, já que nesta altura, os níveis de estrogénio poderão estar abaixo do limiar requerido para exercerem os efeitos protectores [70].

Como qualquer outra doença, a aterosclerose resulta de uma interacção que engloba a tendência genética e o meio ambiente.

O tipo de gordura ingerida na dieta pode afectar directa ou indirectamente o desenvolvimento da aterosclerose. Assim, vários estudos realizados demonstraram que uma dieta rica em MUFAs, como o azeite, confere uma maior protecção das LDL face à oxidação relativamente a uma dieta rica em PUFA [73]. Os compostos minoritários do azeite, nomeadamente os polifenóis e tocoferóis, estão também envolvidos na protecção da oxidação das LDL, evitando, consequentemente, a progressão de doenças cardiovasculares [55].

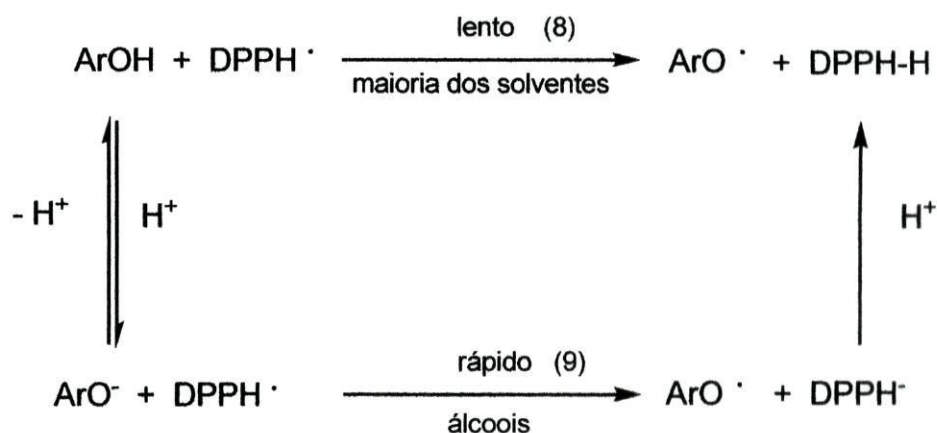
1.2.4. MÉTODOS PARA A AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Os métodos para a avaliação da capacidade antioxidante dos compostos nos processos de autoxidação de materiais orgânicos são extremamente importantes quer na Biologia como na Química [74]. Os antioxidantes podem desactivar os radicais por 2 mecanismos: por transferência do átomo de hidrogénio (TAH) e / ou por transferência electrónica (TE). O resultado final é o mesmo, mas a cinética e o potencial da reacção são diferentes. As reacções de TAH e TE podem ocorrer, muitas vezes, paralelamente mas o mecanismo dominante num dado sistema será determinado por vários factores como a estrutura do antioxidante e suas propriedades, a energia de dissociação da ligação (EDL) e o potencial de ionização (PI), a solubilidade, o coeficiente de partição e o solvente [75]. Nos métodos baseados na TAH (ex. *oxygen radical absorbance capacity* – ORAC), é medida a capacidade de um antioxidante para captar radicais livres através da doação de um átomo de hidrogénio. A reactividade antioxidante é baseada na competição cinética. Este tipo de reacção é independente do solvente e do pH e é normalmente rápida.

Os métodos baseados na TE [ex. teste de DPPH[•] (radical 2,2'-difeníl -1-picrilhidrazilo) [76] e ABTS^{•+} (radical catião obtido a partir do ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) [77] medem a capacidade de redução de um antioxidante, em que o oxidante é o indicador do ponto final da reacção [78]. Este tipo de reacções ocorrem, normalmente, a uma velocidade mais lenta, requerendo mais tempo para a sua finalização. Os cálculos da capacidade antioxidante são baseados na diminuição da percentagem do radical em solução.

1.2.4.1. TESTE DE DPPH[•]

Acreditou-se durante muito tempo que o teste de DPPH[•] era uma método baseado na TAH (8), mas investigações recentes mostraram outro ponto de vista. Tendo como base a análise cinética da reacção entre fenóis (ArOH) e o DPPH[•] [79], Foti e os seus colaboradores sugeriram que a reacção em causa se comporta como uma reacção de TE (9). Estes autores descobriram que o passo determinante da velocidade para esta reacção consiste num processo de TE rápido dos aniões fenóxido para o DPPH[•]. Assim, a remoção do átomo de hidrogénio do antioxidante pelo DPPH[•] é um processo reaccional menos importante em solventes como o metanol e o etanol (formam fortes pontes de hidrogénio), uma vez que ocorre a uma velocidade mais lenta. Assim, considera-se que, embora os métodos que utilizam o ABTS^{•+} e o DPPH[•] sejam classificadas como reacções de TE, estes radicais podem ser igualmente neutralizados por TAH [80].



O DPPH[·] (figura 1-14) é um dos poucos radicais de azoto estáveis, disponíveis comercialmente e que possui a vantagem de que não precisa de ser obtido antes da análise, ao contrário do que acontece com o ABTS^{·+} [81].

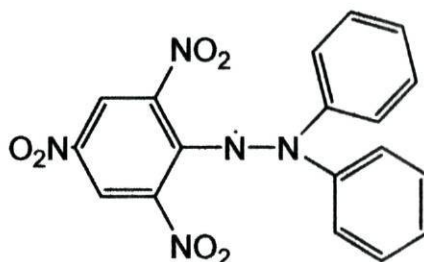


Figura 1-14: Estrutura química do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[·]).

Em ambos os casos os radicais são inicialmente corados, mas com o decorrer da reacção observa-se o desaparecimento dessa cor, paralelamente à diminuição da absorvância. Assim, quanto menor for a intensidade da cor, maior será a capacidade antioxidante do composto ou do extracto analisado.

No presente trabalho utilizou-se apenas o método do DPPH[·]. A análise da capacidade antioxidante é baseada na medição da perda da cor do radical a 515 nm após a reacção com os compostos e monitorizada por espectrofotometria UV – Vis [79]. A percentagem de DPPH[·] que ficou por reagir é calculada utilizando a seguinte expressão:

$$\% \text{ DPPH}^{\cdot}_{\text{por reagir}} = 100 [\text{DPPH}^{\cdot}]_{\text{por reagir}} / [\text{DPPH}^{\cdot}]_{\text{inicial}}$$

Embora estes testes não sejam, muitas vezes, representativos da actividade natural dos compostos em sistemas lipídicos, têm a vantagem de serem rápidos, utilizando apenas um espectrofotómetro UV – Vis e de poderem ser realizados à temperatura ambiente, diminuindo o risco da degradação dos compostos [82]. Contudo, a sua interpretação pode ser, por vezes, complicada quando os compostos analisados apresentam um espectro que sobrepõe o DPPH[·] a 515 nm (ex. carotenóides) [83].

1.2.4.2. TESTE DA ESTUFA DE SCHAAL (“*Schaal Oven Test*”)

A estabilidade oxidativa ou resistência à oxidação de óleos e gorduras pode ser monitorizada através de testes acelerados. Estes permitem acompanhar o processo de oxidação num determinado espaço de tempo [84]. O teste da estufa (“*Schaal Oven Test*”) é um dos métodos mais utilizados e que se baseia em reacções de TAH. Neste teste, 50 a 100 g de amostra de óleo são submetidas à temperatura de 60-65 °C e analisadas periodicamente (diária ou semanalmente), mediante a avaliação sensorial e da medida do índice de peróxidos (IP) [85, 86]. As alterações primárias são avaliadas, por exemplo, através da quantidade de hidroperóxidos (teste dos dienos conjugados) e as alterações secundárias pela formação de compostos carbonílicos, monaldeído e outros aldeídos, assim como de hidrocarbonetos, entre outros (teste da *p*-anisidina) [87] – ver subcapítulo 1.3.5. Deste modo, ficamos a conhecer o seu tempo de prateleira, visto que os resultados fornecidos por este teste apresentam uma boa correlação com a avaliação efectuada em condições normais de armazenamento [84, 88, 89].

1.3. OXIDAÇÃO LIPÍDICA

Os lípidos desempenham um importante papel no que respeita à qualidade de muitos produtos alimentares, particularmente em relação às propriedades organolépticas que os tornam desejáveis. Por outro lado, conferem um valor nutritivo aos alimentos, constituindo uma fonte de energia metabólica, de ácidos gordos essenciais e de vitaminas lipossolúveis [37, 82].

A oxidação lipídica é um fenómeno espontâneo, inevitável e uma das principais causas de deterioração dos alimentos, o que apresenta um grande interesse económico para a indústria alimentar [53, 89]. O ranço provoca alterações do sabor, textura, aroma e cor dos alimentos, ocasionando perda do valor nutricional e toxicidade, graças à formação de compostos secundários de oxidação, após o seu processamento e armazenamento [1, 90].

A degradação dos lípidos, frequentemente denominada por ranço, pode ser devida a:

- A) Reacções hidrolíticas (ranço hidrolítico ou lipólise);
- B) Reacções com o oxigénio atmosférico (autooxidação e fotooxidação);
- C) Oxidação pelas lipogenases.

A) Ranço hidrolítico ou lipólise:

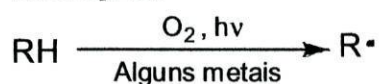
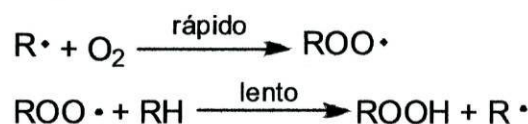
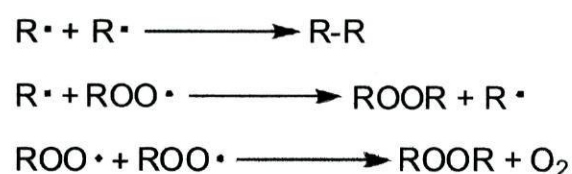
Resulta da hidrólise dos TAGs pela acção enzimática das hidrolases ou por aquecimento na presença da água, originando ácidos gordos livres. Estes são mais susceptíveis à oxidação do que os que se encontram esterificados e os de baixo peso molecular têm odores desagradáveis [53].

B) Reacções com o oxigénio atmosférico:

Estas reacções estão intimamente relacionadas com as insaturações presentes nos lípidos. Assim, os PUFAs são compostos instáveis, precisamente pela presença de numerosas ligações duplas, que os tornam mais vulneráveis ao fenómeno da autooxidação.

● **Autooxidação**

A autooxidação é um processo dinâmico que evolui ao longo do tempo. Trata-se de um fenómeno puramente químico e bastante complexo, em que o $^3\text{O}_2$ reage com os radicais lipídicos, desencadeando reacções radicalares, capazes de auto-propagação. No decurso desta sequência reaccional estão compreendidas 3 etapas: iniciação, propagação e terminação (figura 1-15) [84, 91-95].

INICIAÇÃO:**PROPAGAÇÃO:****TERMINAÇÃO:****Figura 1-15: Etapas da oxidação lipídica [96].**

Este fenómeno inicia-se com a perda de um hidrogénio α no ácido gordo insaturado (**RH**), dando lugar a um radical livre alquilo (**R \cdot**). Esta etapa pode ser catalisada pela luz, O_2 e pela presença de certos metais [97]. O radical lipídico livre formado anteriormente, combina-se com o oxigénio, originando radicais alquilperóxido (**ROO \cdot**) que pode oxidar outro RH para produzir hidroperóxidos (**ROOH**) e novos radicais livres de forma a propagar a reacção [96]. A formação de produtos não radicalares, como **ROOR**, podem ocorrer na 3ª etapa (terminação) do mecanismo pela interacção entre **R \cdot** e **ROO \cdot** [96-100].

- **Fotooxidação**

A fotooxidação lipídica ocorre na presença da luz, de foto-sensibilizadores e do oxigénio atmosférico, na qual é produzido oxigénio singleto ($^1\text{O}_2$) que, por sua vez, reage directamente com as ligações duplas dos ácidos gordos, originando os peróxidos e hidroperóxidos lipídicos [94]. Este tipo de oxidação não é inibido por antioxidantes primários. Pigmentos como a clorofila e rivoflavina contidos em alimentos servem de foto-sensibilizadores.

Existem 2 tipos de sensibilizadores a considerar na foto-oxidação: Tipo I e Tipo II.

- *Sensibilizadores do tipo I:* são aqueles que, quando activados pela luz ($^3\text{Sens}^*$) reagem directamente com o substrato lipídico (RH) através do átomo de hidrogénio, ou por

transferência electrónica formando radicais, os quais reagem com o oxigénio (figura 1-16) [25].

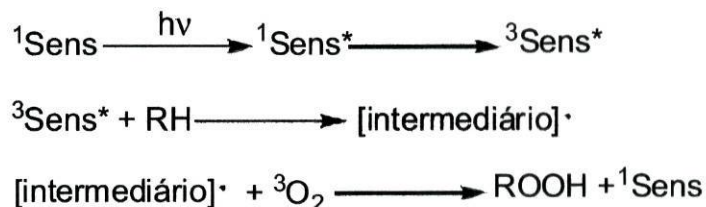


Figura 1-16: Mecanismo de fotoxidação dos sensibilizadores do tipo I.

- *Sensibilizadores do tipo II:* são aqueles que, estando no estado tripleto, reagem com o oxigénio por transferência electrónica, originando o oxigénio singleto, que por sua vez reage com os lípidos insaturados (figura 1-17).

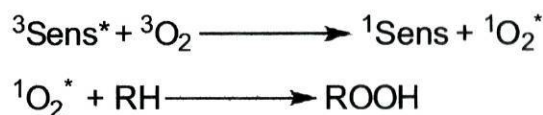


Figura 1-17: Mecanismo de fotoxidação dos sensibilizadores do tipo II.

Estes 2 tipos de sensibilizadores competem entre si. No entanto, factores como a estrutura do sensibilizador, a concentração e a estrutura do substrato disponível para a oxidação, são fundamentais [25].

Os hidroperóxidos formados na fotoxidação são decompostos pelos mesmos mecanismos daqueles formados na autoxidação. No entanto, a produção de hidroperóxidos não conjugados não é observada nesta última. Na tabela 1-5 pode observar-se a percentagem relativa dos isómeros dos hidroperóxidos formados a partir dos ácidos gordos insaturados por autoxidação (${}^3\text{O}_2$) e por fotoxidação (${}^1\text{O}_2$).

Tabela 1-5: Hidroperóxidos dos ácidos gordos insaturados formados por autoxidação e fotoxidação [25, 95].

Ácido Gordo	Hidroperóxidos			
	Posição de		Proporção (%)	
	Grupo HOO-	Ligação dupla	³ O ₂	¹ O ₂
Ácido oléico	8	9	27	-
	9	10	23	48
	10	8	23	52
	11	9	27	-
Ácido linoleico	8	9,12	1,5	-
	9	10,12	46,15	32
	10	8,12	0,5	17
	12	9,13	0,5	17
	13	9,11	49,5	34
	14	9,12	1,5	-
Ácido linolénico	9	10,12,15	31	23
	10	8,12,15	-	13
	12	9,13,15	11	12
	13	9,11,15	12	14
	15	9,12,16	-	13
	16	9,12,14	46	25

C) Mecanismo enzimático:

A lipogenase, enzima que está presente em várias plantas e ainda nos eritrócitos e nos leucócitos, catalisa a oxidação de alguns ácidos gordos insaturados aos correspondentes hidroperóxidos. Estes possuem a mesma estrutura dos compostos obtidos na autoxidação. No entanto, ao contrário do que acontece nesta última, as reacções catalisadas pela lipogenase são caracterizadas por todos os aspectos da catálise enzimática: especificidade

do substrato, selectividade de peroxidação, pH óptimo, susceptibilidade ao aquecimento e a uma velocidade de reacção elevada numa temperatura entre 0-20 °C.

A lipoxigenase oxida, especificamente, ácidos gordos com a estrutura 1-*cis*-4-*cis*-pentadieno. No entanto, prefere os ácidos linoleico e linolénico. O ácido oléico não é oxidado por esta enzima ^[25]. Os radicais livres intermediários produzidos durante a catálise desta enzima podem levar à cooxidação de compostos facilmente oxidáveis como os carotenóides e os polifenóis.

1.3.1. DECOMPOSIÇÃO DOS HIDROPERÓXIDOS

Os hidroperóxidos denominam-se produtos primários da oxidação. Estes compostos não têm repercussão directa no aroma dos alimentos, pois são inodoros e insípidos. No entanto, dado que são muito instáveis, facilmente se decompõem originando compostos voláteis (aldeídos, álcoois e cetonas) e não voláteis (compostos poliméricos) – **produtos secundários da oxidação** – principais responsáveis pelo odor a ranço ^[97]. Com a formação destes compostos, a qualidade dos alimentos decrescem consideravelmente ^[25]. A figura 1-18 é um esquema representativo da decomposição dos hidroperóxidos em compostos voláteis.

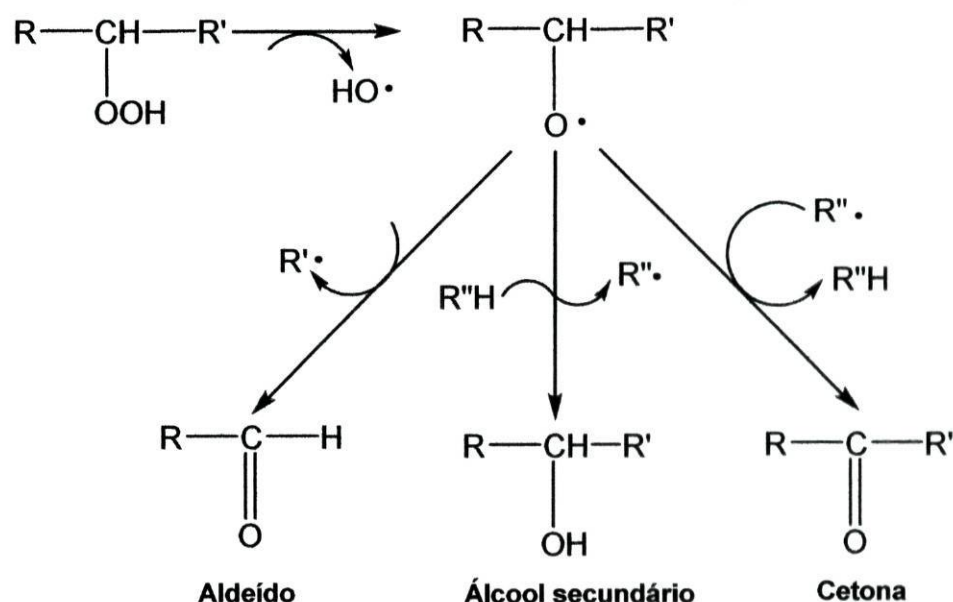


Figura 1-18: Decomposição dos hidroperóxidos em compostos secundários voláteis ^[46].

A formação dos **aldeídos** ocorre com a ruptura homolítica da ligação O-O do hidroperóxido, originando os radicais alcoxilo (RO^\bullet) e hidroxilo (HO^\bullet) muito reactivos. Consoante o local onde a ruptura na cadeia do radical ocorre, pode formar-se um aldeído volátil de cadeia curta, ou ficar unido à parte glicérica da molécula, originando neste caso, aldeídos glicéricos não voláteis e não aromáticos, mas importantes, uma vez que diminuem a estabilidade das gorduras frente à oxidação. Por outro lado, os aldeídos voláteis (ex. hexanal) são considerados produtos de oxidação secundários mais importantes, pois são compostos aos quais se associa o cheiro a ranço^[98].

Os álcoois secundários formam-se quando o radical alcoxilo ataca um átomo de hidrogénio de outro ácido gordo insaturado ($\text{R}''\text{H}$), libertando um novo radical (R''^\bullet).

Outra possibilidade é a reacção entre os radicais livres, terminando a reacção em cadeia e dando lugar ao aparecimento de **cetonas**. Ao contrário destas, os aldeídos podem oxidar-se facilmente, originando **ácidos carboxílicos**^[98].

Os metais de transição como o ferro e o cobre, presentes nos óleos e gorduras, também catalisam a decomposição dos hidroperóxidos. Esta decomposição origina novos radicais livres (figura 1-19)^[37].

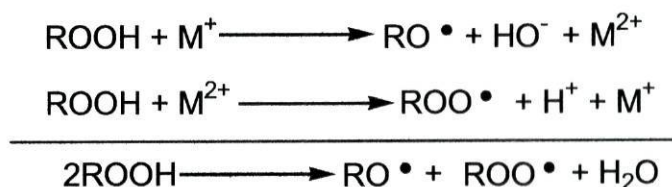


Figura 1-19: Formação de radicais lipídicos a partir de metais de transição^[46].

1.3.2. FACTORES QUE INFLUENCIAM A VELOCIDADE DE OXIDAÇÃO DOS LÍPIDOS NOS ALIMENTOS

A oxidação dos lípidos depende de mecanismos reaccionais diversos e extremamente complexos, os quais se relacionam como tipo de estrutura e o meio onde esta se encontra.

O número e a natureza das insaturações presentes, o tipo de interface entre os lípidos e o oxigénio atmosférico, a exposição à luz e ao calor, a presença de pró-oxidantes (ex. iões metálicos de transição) ou de antioxidantes, são factores determinantes para a estabilidade oxidativa dos lípidos^[91, 92].

Sendo a velocidade de autooxidação dependente do número de ligações duplas presentes no lípido, seria de esperar que os óleos vegetais, que possuem níveis mais elevados de ésteres de ácidos gordos insaturados, exibissem maior susceptibilidade à deterioração relativamente às gorduras de origem animal, que por sua vez, apresentam níveis de ésteres de ácidos gordos saturados mais elevados. Porém, tendem a oxidar mais lentamente, a partir da sua composição química, porque contêm quantidades significativas de tocoferóis, os quais actuam como antioxidantes naturais ^[93].

O mecanismo de oxidação varia com a temperatura. Assim, a temperaturas elevadas, as reacções de polimerização e ciclização são importantes, mas à temperatura ambiente são insignificantes. Do mesmo modo, o aumento da pressão de oxigénio só se torna importante a altas temperaturas porque a sua solubilidade diminui com a temperatura, tornando-se num factor limitante durante o progresso da oxidação ^[53]. O aumento da temperatura provoca também muitas vezes um aumento da contaminação por metais e destrói possíveis compostos antioxidantes existentes na gordura ^[37].

A luz é outro dos factores determinantes na estabilidade oxidativa dos lípidos. Sabe-se que compostos minoritários como a clorofila (sensibilizador) no azeite virgem, podem ser excitados electronicamente devido à absorção da luz. Consequentemente, a molécula excitada é capaz de transferir o seu excesso de energia a uma molécula de $^3\text{O}_2$ (oxigénio no seu estado fundamental), originando o oxigénio singleto ($^1\text{O}_2$) que reage as ligações olefínicas. A prevenção da fotooxidação durante o armazenamento dos alimentos é importante para assegurar a sua elevada estabilidade oxidativa ^[99].

1.3.3. OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM EMULSÕES

Uma emulsão é um sistema em que 2 líquidos, normalmente imiscíveis (ex. óleo e água), que se dispersam um no outro formando pequenas gotículas (figura 1-20). Se o sistema consiste em gotículas de água dispersas no óleo, trata-se de uma emulsão água em óleo (A/O), (ex. margarinas); se, pelo contrário, consiste em gotas de óleo disperso em água, então estamos perante uma emulsão óleo em água (O/A), (ex. *sopa*)

Óleo em água

Água em óleo

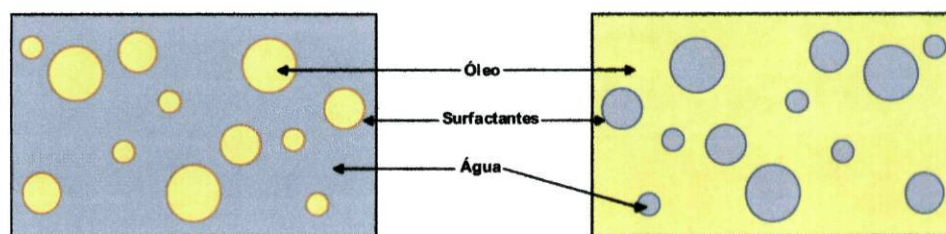


Figura 1-20: Emulsões O/A e A/O

As emulsões são termodinamicamente instáveis porque requerem energia para aumentar a área superficial entre as fases oleosa e aquosa.

A oxidação lipídica em emulsões é bastante complexa e afectada pelo fenómeno interfacial, assim como pelos constituintes antioxidantes e pró-oxidantes presentes tanto nas duas fases, como na sua interface.

Existem vários factores que afectam a velocidade de oxidação das emulsões como: a presença de metais e outras substâncias, o pH, a pressão de O₂, o tamanho das partículas e a concentração e a natureza dos emulsionantes^[90]. A composição da fase aquosa é outro factor importante na oxidação de emulsões. Assim, os “ingredientes” existentes nesta fase pode actuar como antioxidante como pró-oxidante, dependendo das suas propriedades químicas, das condições ambientais e das suas interacções com os componentes lipídicos.

Os antioxidantes que são eficazes nos óleos vegetais, são também, normalmente, eficazes nas emulsões. No entanto, estes podem exhibir afinidades complexas entre as interfaces ar-óleo e óleo-água, o que afecta significativamente a sua actividade antioxidante em diferentes sistemas lipídicos^[13]. Em emulsões O/A, os antioxidantes hidrofílicos são, geralmente, menos eficazes do que os antioxidantes lipofílicos, ao contrário do que acontece nas emulsões A/O ou em óleos, em que os antioxidantes hidrofílicos apresentam maior eficácia. O trolox (derivado do tocoferol hidrofílico) mostrou possuir uma maior actividade antioxidante face ao α -tocoferol, quando comparados os sistemas O/A e A/O^[100] – “Paradoxo polar”^[101].

O fenómeno da interface (paradoxo polar) é a chave para uma melhor compreensão da acção antioxidante em alimentos heterogéneos e sistemas biológicos. Assim, os antioxidantes lipofílicos como o α -tocoferol e o palmitato de ascorbilo, mostraram ser mais eficazes em emulsões O/A do que só em óleos, enquanto o oposto se verifica para os antioxidantes hidrofílicos, trolox e ácido ascórbico^[102]. Estas diferenças observadas na eficácia dos antioxidantes foram explicadas pelas suas afinidades à interface ar-óleo, ao óleo e à interface O/A nas emulsões (figura 1-21)^[102].

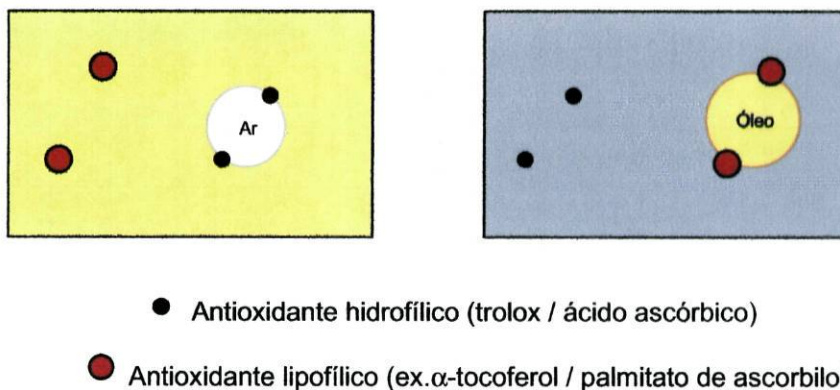


Figura 1-21: Fenómeno de interface para explicar a acção antioxidante em óleo e em emulsões O/A.

Em sistemas compostos simplesmente por óleo, os antioxidantes hidrofílicos, como os fenóis polares, estão orientados para a interface ar-óleo e mostraram possuir uma maior protecção face à oxidação, comparativamente aos lipofílicos, como os tocoferóis, que permanecem em solução no óleo. Em contraste, nas emulsões O/A, os antioxidantes lipofílicos estão orientados para a interface O/A para uma melhor protecção da oxidação. Os antioxidantes hidrofílicos são dissolvidos e diluídos na fase aquosa. De acordo com este mecanismo, a formação e decomposição dos hidroperóxidos em emulsões é dependente das concentrações dos antioxidantes, tanto na fase oleosa, aquosa como na interface ^[13].

1.3.4. OXIDAÇÃO LIPÍDICA NA CARNE

A grande variabilidade que se observa no comportamento dos alimentos face à oxidação lipídica, deve-se à influência de diversos factores relacionados com a sua composição e modos de processamento, entre outros ^[103].

Os fosfolípidos e os TAGs são lípidos presentes na carne. Os primeiros encontram-se em menor quantidade, mas são potencialmente mais sensíveis à oxidação devido ao elevado teor em PUFAs e à sua localização a nível celular (membranas celulares e sub-

celulares, portanto, com maior superfície de exposição). Os TAGs encontram-se isolados no interior dos adipócitos, com uma superfície de exposição relativamente mais pequena ^[104].

Espera-se, normalmente, que a carne fresca seja menos susceptível à oxidação do que a carne processada pelo calor, pois como já foi referido, o aquecimento é um factor importante que potencia a reacção oxidativa e produz a ruptura tecidual, favorecendo o contacto dos lípidos com os catalisadores desta reacção.

Os processos oxidativos são muito mais lentos na carne desidratada, relativamente à carne fresca, devido à menor quantidade de água presente na primeira. Estes fenómenos oxidativos variam consoante as operações a que a carne é submetida (trituração, refrigeração e congelações repetidas, elevadas temperaturas e armazenamento prolongado), bem como pela adição de certos ingredientes. Assim, a trituração da carne é um processo que favorece a sua oxidação, uma vez que os fosfolípidos e os TAGs ficam expostos ao oxigénio atmosférico ^[103].

A oxidação lipídica é a principal causa da deterioração da carne durante a cozedura. Ao contrário da carne crua, onde a oxidação ocorre ao longo de dias ou semanas, na carne cozinhada, estas reacções procedem-se rapidamente (após algumas horas), originando compostos aromáticos ^[104].

A susceptibilidade da carne cozinhada para a oxidação lipídica é influenciada pelas características dos vários tipos de carne, incluindo a quantidade de gordura saturada e a presença de antioxidantes. Pode ser controlada pela incorporação de antioxidantes durante o processamento do alimento e retirando o excesso de oxigénio das embalagens ^[104].

1.3.5. MÉTODOS PARA A AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA

A avaliação do estado de oxidação de óleos e gorduras, ou seja, a medida do ranço, é uma determinação essencial a nível industrial. Trata-se de um meio que permite controlar e garantir a qualidade das matérias-primas adquiridas e dos produtos comercializados.

Uma das dificuldades na avaliação do grau de oxidação reside na escolha do momento mais adequado para se realizar essa determinação. Esta não deve ser pontual, ou seja, restrita a um determinado momento, mas efectuada ao longo do tempo de forma a ser representativa da duração de vida do produto ^[37, 105].

Existem vários métodos para medir a extensão de oxidação de uma gordura / óleo através da determinação dos produtos primários da oxidação, os hidroperóxidos, ou da

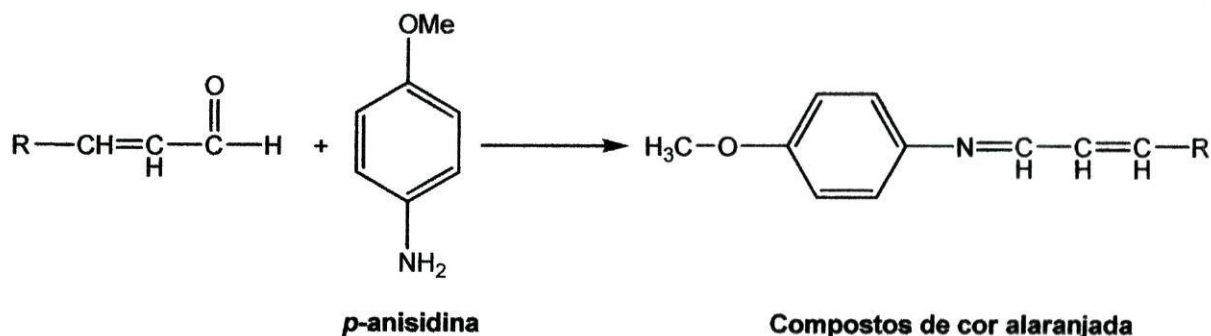
1.3.5.2. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS SECUNDÁRIOS DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA

Os hidroperóxidos são produtos instáveis, sobretudo a temperaturas elevadas ou na presença de metais de transição. No decurso da sua decomposição produzem-se compostos como aldeídos, cetonas, álcoois secundários, hidrocarbonetos e polímeros, os quais são genericamente designados por produtos secundários da oxidação.

O teste do ácido tiobarbitúrico (TBA), assim como a determinação do índice de *p*-anisidina (IA) são dois dos métodos utilizados na determinação destes produtos. No presente trabalho realizou-se apenas o segundo método.

1.3.5.2.1. Determinação do índice de *p*-anisidina

A *p*-anisidina reage por condensação com todos os compostos carbonílicos, mas preferencialmente com os dienais conjugados ou 2-alquenais, de acordo com a seguinte equação:



Os produtos da reacção podem ser determinados espectrofotometricamente a 350 nm.

Neste trabalho determinou-se o índice de peróxidos nos vários óleos alimentares, a variação da % DC entre o estado final e o inicial, assim como a variação do IA.

2. OBJETIVOS

O azeite e alguns óleos de sementes oleaginosas são importantes na preparação de uma vasta gama de alimentos. Duas das mais importantes técnicas de processamento utilizadas, tanto a nível doméstico, como industrial, são a preparação de carne e da batata na presença destas gorduras em forno, a 180-220 °C (“assados”) e a cozedura de vegetais, como a cenoura e a cebola na presença das mesmas a 100 °C (“sopas”).

Numa primeira fase deste estudo, pretendeu-se avaliar a extensão da degradação lipídica e do conteúdo fenólico do azeite extra-virgem (AEV) ao longo do tempo, antes e após o seu processamento a 180 °C e durante 60 minutos (“**assados**”), comparando o benefício da sua utilização relativamente ao azeite virgem (AV) e ao azeite comum (A), menos ricos em polifenóis, e aos óleos de girassol (OG), milho (OM), soja (OS) e amendoim (OA). Para o efeito, avaliou-se a extensão da degradação lipídica de todas as amostras, após o processamento, nos diferentes óleos alimentares. Avaliou-se, igualmente, o efeito do processamento e da presença de alimentos, na quantidade de polifenóis e de tocoferóis presentes nos óleos, e ainda o seu poder antioxidante.

A segunda parte deste trabalho teve, igualmente, como objectivo avaliar a extensão da degradação lipídica e do conteúdo fenólico das amostras de AEV e A, após o processamento, a 100 °C e durante 60 minutos, na presença de água e de alimentos, como a batata, a cenoura e a cebola (“**sopas**”). A adição dos azeites foi efectuada logo no início e a 15 minutos do fim do processamento, a fim de se avaliar qual a altura de adição mais vantajosa para a conservação das propriedades deste óleo alimentar, muito utilizado na cozinha portuguesa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

1ª PARTE

3.1. Avaliação da estabilidade de óleos alimentares após o processamento, a 180 °C, na presença de alimentos (“ASSADOS”)

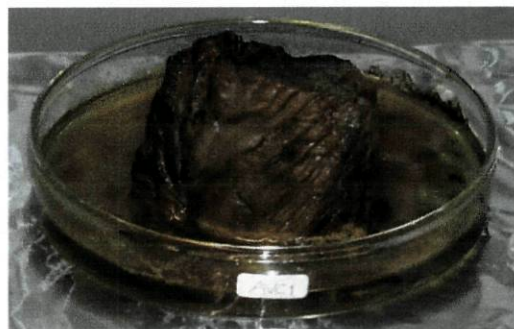
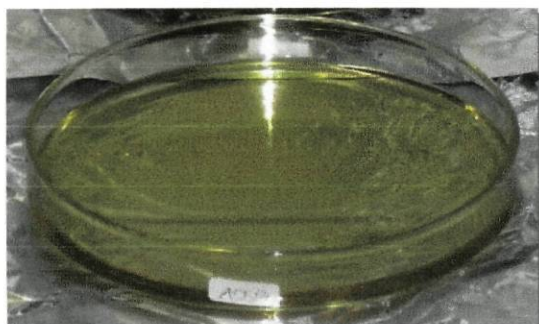


Tabela 3-1: Designação das amostras de azeite e de óleo processadas a 180 °C.

Azeite / Óleo	Processado	Com carne	Com batata
AEV	AEVP ₁ e AEVP ₂	AEVC ₁ e AEVC ₂	AEVB ₁ e AEVB ₂
AV	AVP ₁ e AVP ₂	AVC ₁ e AVC ₂	AVB ₁ e AVB ₂
A	AP ₁ e AP ₂	AC ₁ e AC ₂	AB ₁ e AB ₂
OG	OGP ₁ e OGP ₂	OGC ₁ e OGC ₂	OGB ₁ e OGB ₂
OM	OMP ₁ e OMP ₂	OMPC ₁ e OMC ₂	OMB ₁ e OMB ₂
OS	OSP ₁ e OSP ₂	OSC ₁ e OSC ₂	OSB ₁ e OSB ₂
OA	OAP ₁ e OAP ₂	OAC ₁ e OAC ₂	OAB ₁ e OAB ₂

3.1.5. EXTRACÇÃO DA GORDURA DAS AMOSTRAS DE CARNE

Após descongelamento, as amostras de carne (processadas e frescas) foram trituradas individualmente numa picadora até se obter uma pasta homogénea.

Pesaram-se cerca de 15 g de cada amostra e extraiu-se a gordura com éter de petróleo (40:60) pelo método de Soxhlet, durante cerca de 1 hora. Secou-se o extracto obtido com sulfato de sódio anidro e filtrou-se. Evaporou-se o solvente e pesou-se a gordura extraída de cada porção de carne.

3.1.6. AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA DOS DIFERENTES ÓLEOS ALIMENTARES E DA GORDURA DA CARNE

Efectuou-se a avaliação da extensão de oxidação lipídica através da determinação da percentagem de dienos conjugados (% DC) e do índice de *p*-anisidina (IA) das diferentes amostras de óleo alimentar, após o processamento, a 180 °C.

A referida avaliação foi ainda realizada à gordura das várias amostras de carne (processadas e frescas).

3.1.6.1. Determinação do índice de peróxidos - A.O.C.S Official Method Cd 8-53 (AOCS, 1989)

Para um matrás de 100 mL, pesaram-se 0,5 g de óleo alimentar e adicionou-se cerca de 10 mL de solução ácido acético / clorofórmio (3:2). Após a agitação desta mistura, adicionou-se 0,5 mL de uma solução aquosa saturada de iodeto de potássio (KI) preparada previamente (excesso de KI dissolvido em água destilada). Agitou-se e guardou-se a solução ao abrigo da luz durante 1 minuto. Após este repouso, adicionou-se 10 mL de água destilada e titulou-se com uma solução padrão de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), 0,01 N.

O índice de peróxidos (IP), em meq peróxido / kg óleo foi determinado utilizando a seguinte equação:

$$\text{IP}_{(\text{meq peróxido/kg óleo})} = (\text{V}-\text{V}_0) \text{ N } 1000 / \text{m}_{\text{óleo}}$$

Sendo: V – volume (mL) gasto na titulação da amostra;

V_0 – volume (mL) gasto na titulação do branco;

N – normalidade da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;

m – massa (g) da amostra de óleo alimentar.

3.1.6.2. Determinação do conteúdo em dienos conjugados - A.O.C.S Official Method Ti 1a - 64 (AOCS, 1989)

Pesaram-se 200 mg de cada amostra de óleo alimentar para um balão volumétrico de 10 mL e fez-se o volume com isoctano (solução A). Agitou-se no vórtex e retirou-se 1 mL desta solução para outro balão volumétrico de 10 mL, perfazendo novamente o volume com isoctano (solução B).

Mediu-se, espectrofotometricamente, a absorvância da solução B a 233 nm, usando isoctano como branco.

A percentagem de dienos conjugados foi calculada segundo a equação:

$$\% \text{ DC} = 1,0769 \text{ Abs}_{233\text{nm}} / \text{Conc.}(\text{g} / \text{L})$$

% DC por 100 g de amostra, usando a massa molecular relativa e a absorvidade molar do hidroperóxido do ácido linoleico (280 g mol^{-1} , $\epsilon = 26000$).

3.1.6.3. Determinação do índice de *p*-anisidina - A.O.C.S Official Method Cd 18-90 (AOCS, 1989)

Da solução A, acima citada, retiraram-se 5 mL para um frasco de ensaio. A este foi adicionado 1 mL de solução de *p*-anisidina (0,125 g de *p*-anisidina em 50 mL de ácido acético glacial). Após 10 minutos, mediu-se, espectrofotometricamente, a absorvância da solução a 350 nm, usando isooctano + *p*-anisidina como branco. O índice de *p*-anisidina (IA) pode ser calculado a partir da equação:

$$IA = 10 (1,2 \text{ Abs}_{350\text{nm}}) / m$$

onde m é a massa, em gramas, de gordura pesada.

3.1.7. EXTRACÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS POLIFENÓIS POR HPLC ^[41 adaptado]

3.1.7.1. Extracção dos polifenóis das amostras de azeite:

Estudos efectuados anteriormente revelaram que a quantidade de polifenóis presente nos óleos de oleaginosas não é significativa. Portanto, neste trabalho, apenas foram extraídos e quantificados os polifenóis das 3 qualidades de azeite.

Procedeu-se à activação de uma coluna de SPE (*Solid Phase Extraction*) da Supelco, discovery[®] DSC-Diol 60 mL, com 60 mL de metanol, seguido de 60 mL de hexano. Dissolveram-se 25 g de cada amostra de azeite em 30 mL de hexano e transferiu-se, quantitativamente essa solução para a coluna. Seguidamente, esta foi lavada com 80 mL de hexano. Extraíram-se os compostos fenólicos retidos na coluna com quatro porções de 60 mL de metanol, recolhendo-se o extracto para um balão de fundo redondo de 500 mL. Evaporou-se o solvente a uma temperatura inferior a 40 °C, até à secura, obtendo-se um óleo. Ao extracto fenólico adicionou-se 1 mL da solução metanol:água (1:1 v/v) e 2 mL de hexano, procedendo-se à sua mistura utilizando o vórtex. Centrifugou-se a mistura durante 10 minutos e separou-se a fase aquosa. Procedeu-se à filtração, utilizando um filtro Whatman de 0,2 µm PVDF e analisou-se amostra por HPLC.

3.1.7.2. *Extracção dos polifenóis das fases aquosas das amostras de carne:*

A maior parte dos polifenóis presentes no azeite possuem um carácter hidrofílico. Como tal, a extracção e quantificação destes compostos nas fases aquosas libertos pela carne é bastante relevante.

Extraíram-se 15 mL da fase aquosa das amostras de carne, com 2 porções de 10 mL de diclorometano. Secou-se o resíduo com sulfato de sódio anidro e filtrou-se.

Evaporou-se o solvente até à secura num balão de pêra e diluiu-se o resíduo obtido em 600 µL de metanol.

Analisou-se a amostra preparada por HPLC.

3.1.7.3. *Determinação dos polifenóis por HPLC:*

O sistema de HPLC era constituído por um cromatógrafo Merck-Hitachi, com uma coluna C18 Waters Sphersisorb ODS2 5-µm (Supelco Inc.), de dimensões 250 mm x 4,6 mm, acoplada a um detector UV-Vis Merck- Hitachi L-4200 e com uma bomba Merck-Hitachi L-6200 Intelligent Pump. A eluição dos compostos efectuou-se à temperatura ambiente com um fluxo de 1 mL/min e com detecção ao comprimento de onda de 280 nm [41]. Utilizou-se como fase móvel uma mistura de metanol / acetonitrilo (1:1) – **eluente A** e uma mistura de água / ácido acético (97:3) (pH ~ 3,1) – **eluente B**, com o seguinte gradiente:

Tabela 3-2: Gradiente utilizado na determinação de polifenóis nas amostras por HPLC.

<i>Tempo / min.</i>	<i>A / %</i>	<i>B / %</i>
0	5	95
25	30	70
35	35	65
40	40	60
50	70	30
55	100	0
60	100	0

Para determinar as quantidades dos polifenóis em mg kg^{-1} azeite a partir das respectivas áreas dos picos cromatográficos, utilizou-se uma recta padrão da oleuropeína ($y = 1072,6 x$) e os seguintes factores de correcção^[107] para os outros polifenóis:

Polifenóis	Factores de correcção
HyTy	1,26
Ty	1,26
HyTyAc	0,95
HyTy-EDA	1,16
OI	1,00
HyTy-EA	1,16

No caso do Py, PyAc, Ty-EDA, Ty-EA e de compostos não identificados, os factores de correcção são desconhecidos e como tal assumiu-se que fossem iguais ao factor de correcção da OI.

3.1.7.4. Identificação dos compostos desconhecidos por LC-DAD-MS:

Numa tentativa de identificar dois compostos detectados nos cromatogramas de várias amostras, recorreu-se à análise por LC-DAD-MS (*Liquid Chromatography – Diode Array Detector – Mass Spectrometry*).

Utilizou-se um sistema cromatógrafo Finnigan LCQ DECA XP MAX, equipado com uma fonte API e usando uma “probe” de ionização electrospray (ESI).

A temperatura de capilaridade e a voltagem usadas foram de 180 °C e 3V, respectivamente. A eluição dos compostos efectuou-se a um fluxo de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ e ao comprimento de onda de 280 nm. A fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol / acetonitrilo (1:1) – **eluyente A** e uma mistura de água / ácido fórmico (99:1) – **eluyente B**, cujo gradiente utilizado foi o seguinte:

Tabela 3-3: Gradiente utilizado na tentativa de identificação de dois compostos fenólicos desconhecidos nas amostras por LC-DAD-MS.

Tempo / min.	A / %	B / %
0	5	95
50	30	70
70	35	65
80	40	60
100	70	30
110	100	0
120	100	0

O espectro foi obtido no modo de íão negativo e após a detecção do íão molecular, o seu MS^2 foi obtido usando uma energia de colisão relativa de 27.

3.1.8. EXTRACÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS TOCOFERÓIS DOS DIFERENTES ÓLEOS ALIMENTARES POR HPLC ^[108 adaptado]

Num funil de separação de 100 mL, extraíram-se 15 g de óleo alimentar de cada amostra com duas porções de 35 mL de metanol. O resíduo foi extraído novamente sob as mesmas condições, com duas porções da mistura metanol / isopropanol (80:20, v/v), sendo recolhido para um balão de fundo redondo.

Evaporou-se o solvente a 40 °C até se obter um resíduo oleoso. O resíduo foi dissolvido em 5 mL de uma mistura de metanol / isopropanol / hexano (1:3:1, v/v). Analisou-se a solução por HPLC, utilizando o mesmo sistema descrito em 3.1.7.3. Na determinação do tocoferol, para além dos eluentes A e B, usados anteriormente, foi também utilizado o isopropanol – eluente C. O gradiente utilizado nesta determinação está descrito na tabela 3-4.

Tabela 3-4: Gradiente utilizado na determinação dos tocoferóis nas amostras por HPLC.

<i>Tempo / min.</i>	<i>A / %</i>	<i>B / %</i>	<i>C / %</i>
2	5	95	0
10	40	60	0
32	100	0	0
42	100	0	0
52	40	0	60
67	40	0	60
69	100	0	0
72	5	95	0

Para a determinação das quantidades dos tocoferóis, em mg kg⁻¹ óleo alimentar, a partir das áreas dos picos cromatográficos, utilizaram-se as seguintes rectas padrão:

$$\alpha\text{-tocoferol: } y = 2,6647x + 5,9572 \text{ (}\mu\text{g/mL)} \quad R^2 = 0,9908$$

$$\gamma\text{-tocoferol: } y = 2,2379x + 0,1282 \text{ (}\mu\text{g/mL)} \quad R^2 = 0,9824$$

$$\delta\text{-tocoferol: } y = 3,4797x + 0,0632 \text{ (}\mu\text{g/mL)} \quad R^2 = 0,9920$$

3.1.9. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRACTOS FENÓLICOS DAS AMOSTRAS APÓS O PROCESSAMENTO, A 180 °C

3.1.9.1. Teste da Estufa de Schaal ("Schaal Oven Test")^[86 adaptado]

Após o processamento, recolheram-se cerca de 3 g de cada amostra para frascos de ensaio, previamente lavados com HCl e rotulados. O mesmo procedimento foi executado para as amostras não processadas, que nos serviram de controlo. Todas as amostras em estudo foram colocadas na estufa, a 60 °C, durante 15 dias. A monitorização das mesmas foi efectuada através dos testes dos dienos conjugados e do índice de *p*-anisidina (3.1.6.2 e 3.1.6.3), realizados ao fim de 1 semana e de 15 dias de armazenamento na estufa a 60 °C.

3.1.9.2. Teste de DPPH' [72 adaptado]

Pesaram-se 0,0175 g de DPPH' para um balão volumétrico de 50 mL e fez-se o volume com metanol (solução A). Da solução anterior retiraram-se 10 mL que foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL e diluídos com metanol (solução B).

A partir da solução A prepararam-se 6 padrões com concentrações entre 0,008 e 0,08 mM.

Numa placa BD Falcon de 96 poços (8 x 12) de poliestireno, colocaram-se, em triplicado, 280 µL da solução B de DPPH' e adicionaram-se, 20 µL de extracto fenólico ou de solução padrão. Foi efectuado, igualmente, um branco ao qual se adicionaram 20 µL de metanol. O mesmo foi feito para as fases aquosas das diferentes amostras que continham carne.

Determinou-se a absorvância da solução a 515 nm, ao longo de uma hora, com intervalos de 5 minutos, num espectrofotómetro (contador de placas) Bio-Teck Power Wave XS.

3.1.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados deste trabalho foram analisados estatisticamente por ANOVA (*Analysis of Variance*) com um nível de significância $p \leq 0,05$, usando o teste de Duncan. O software utilizado foi o SPSS 16,0.

2ª PARTE

3.2. Avaliação da estabilidade de azeites após o processamento, a 100 °C, na presença de água e de alimentos (“SOPAS”)



3.2.1. REAGENTES

Todos os solventes utilizados na 2ª parte deste trabalho foram de natureza p.a, da Merck, Sigma Aldrich ou da Fluka.

A *p*-anisidina (99%), o α -tocoferol (97%) e o DPPH[•] (95%) utilizados foram obtidos da Sigma Aldrich.

3.2.2. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS DOS AEV e A

Nesta 2ª parte do trabalho foram utilizadas apenas 2 qualidades diferentes de azeite: Azeite extra-virgem (AEV) e Azeite (A).

A transesterificação dos ácidos gordos e a determinação da sua composição nas 2 amostras de azeite foram realizadas segundo o protocolo descrito em 3.1.2.

3.2.3. PROCESSAMENTO DA BATATA, CENOURA E DA CEBOLA EM AEV E A

150 g de batata (B), de cenoura (CEN) e de cebola (CEB), partidos aos cubos (+/- 2 cm), foram colocados em gobelés contendo 60 g de azeite e 400 mL de água desionizada. O processamento dos alimentos decorreu durante 60 minutos, a partir do momento em que a água contida nas diferentes amostras entrou em ebulição (100 °C). Outro grupo de amostras foi processado nas mesmas condições, à excepção do azeite que foi adicionado a 15 minutos do fim do processamento. Amostras sem alimentos, ou seja, apenas com água e azeite foram de igual modo processadas, atendendo às condições supra referidas. Todas as amostras foram processadas em duplicado para uma posterior análise estatística.

Após o arrefecimento dos gobelés, decantou-se a mistura água / azeite, de modo a separá-la dos alimentos, que foram embalados, rotulados e guardados a -20 °C. Os alimentos que ficaram retidos na fase oleosa foram separados desta por filtração e a fase aquosa foi isolada da oleosa por centrifugação.

As várias amostras de azeite, assim como as respectivas fases aquosas foram transferidas para frascos devidamente rotulados e guardados a -20 °C.

Na tabela 3-5 apresentam-se as designações atribuídas às várias amostras de azeite processadas a 100 °C.

Tabela 3-5: Designação das amostras de azeite não processadas e processadas a 100°C.

Azeite	Processado	Com batata	Com cenoura	Com cebola
	60 minutos			
AEV ₁ AEV ₂ A ₁ A ₂	AEVP60 ₁ , AEVP60 ₂	AEVB60 ₁ ,AEVB60 ₂	AEVCEN60 ₁ ,AEVCEN60 ₂	AEVCEB60 ₁ ,AEVCEB60 ₂
	AP60 ₁ , AP60 ₂	AB60 ₁ , AB60 ₂	ACEN60 ₁ , ACEN60 ₂	ACEB60 ₁ , ACEB60 ₂
	15 minutos			
	AEVP15 ₁ , AEVP15 ₂	AEVB15 ₁ ,AEVB15 ₂	AEVCEN15 ₁ ,AEVCEN15 ₂	AEVCEB15 ₁ ,AEVCEB15 ₂
	AP15 ₁ , AP15 ₂	AB15 ₁ , AB15 ₂	ACEN15 ₁ , ACEN15 ₂	ACEB15 ₁ , ACEB15 ₂

3.2.4. AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA DAS AMOSTRAS DE AZEITE

A avaliação da extensão de oxidação lipídica foi efectuada através da determinação da percentagem de dienos conjugados (% DC) e do índice de *p*-anisidina (IA) das diferentes amostras de azeite, após o processamento, a 100 °C.

3.2.4.1. Determinação do conteúdo em dienos conjugados

A quantificação dos compostos primários de oxidação foi efectuada do mesmo modo que o descrito em 3.1.6.2.

3.2.4.2. Determinação do índice de *p*-anisidina

A quantificação dos compostos secundários da oxidação foi efectuada do mesmo modo que o descrito em 3.1.6.3.

3.2.5. DETERMINAÇÃO DO pH DAS FASES AQUOSAS DAS AMOSTRAS

A determinação do pH das fases aquosas das amostras foi efectuada utilizando um pH-metro da Multical[®].

3.2.6. EXTRACÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS POLIFENÓIS POR HPLC ^[41 adaptado]

3.2.6.1. *Extracção dos polifenóis das amostras de azeite:*

A extracção dos polifenóis das amostras de azeite estudadas foi realizada de acordo com o procedimento descrito em 3.1.7.1.

3.2.6.2. *Extracção dos polifenóis das fases aquosas:*

Para a determinação da quantidade de polifenóis nas fases aquosas das amostras extraíram-se 30 mL das mesmas, com 3 porções de 20 mL de diclorometano. O resíduo foi seco com sulfato de sódio anidro e filtrado.

Evaporou-se o solvente, até à secura, num balão de pêra, seguido de uma diluição com 600 µL de metanol.

Analisou-se a amostra preparada por HPLC.

3.2.6.3. *Determinação dos polifenóis por HPLC:*

A análise das amostras por HPLC foi realizada nas condições referidas em 3.1.7.3.

3.2.7. EXTRACÇÃO E DETERMINAÇÃO DO α -TOCOFEROL NAS AMOSTRAS DE AZEITE POR HPLC [108 adaptado]

A extracção e a determinação do α -tocoferol presente nas amostras de azeite estudadas foram realizadas de acordo com o procedimento citado em 3.1.8. Neste caso, utilizou-se apenas o padrão do α -tocoferol.

3.2.8. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRACTOS FENÓLICOS DAS AMOSTRAS APÓS O PROCESSAMENTO, A 100 °C

3.2.8.1. Teste da Estufa de Schaal ("Schaal Oven Test") [86 adaptado]

O teste da estufa de Schaal foi efectuado de acordo com o procedimento descrito em 3.1.9.1. Neste caso, a monitorização das amostras foi realizada ao fim de 1 semana (7 dias), 15 dias, 1 mês (30 dias), 1 mês + 15 dias (45 dias) e 2 meses + 10 dias (70 dias) de armazenamento na estufa a 60 °C.

3.2.8.2. Teste de DPPH^{*} [72 adaptado]

A avaliação da actividade antioxidante, através do teste de DPPH^{*}, dos extractos fenólicos das fases oleosa e aquosa das amostras foi efectuada de acordo com o procedimento descrito em 3.1.9.2.

3.2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados deste trabalho foram analisados estatisticamente por ANOVA (*Analysis of Variance*) com um nível de significância $p \leq 0,05$, usando o teste de Duncan. O software utilizado foi o SPSS 16,0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1ª PARTE

4.1. Avaliação da estabilidade de óleos alimentares após o processamento, a 180 °C, na presença de alimentos (“ASSADOS”)

4.1.1. DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DOS ÓLEOS ALIMENTARES ESTUDADOS

Os óleos alimentares estudados nesta primeira parte do trabalho, nomeadamente o azeite extra-virgem (AEV), azeite (A), óleo de girassol (OG), óleo de milho (OM), óleo de soja (OS) e de amendoim (OA) mostraram possuir as seguintes características (tabela 4-1):

Tabela 4-1: Características dos seguintes óleos alimentares: AEV, AV, A, OG, OM, OS e OA.

	AEV	AV	A	OG	OM	OS	OA
Acidez (meq peróxido / kg)	0,3	0,7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Índice de peróxidos (mg/kg)	2,1	3,6	3,4	3,8	3,2	2,9	3,1
C16:0	11,2	11,9	12,8	7,4	14,1	12,7	13,0
C16:1	0,5	0,8	0,8	0,0	0,1	0,0	0,0
C18:0	3,8	3,6	3,6	3,4	2,3	3,7	3,1
C18:1 (9)	77,4	76,1	75,5	35,0	33,5	24,8	50,4
C18:2 (9,12)	6,8	7,1	6,7	54,0	49,4	54,0	33,4
C18:3 (9,12,15)	0,4	0,6	0,6	0,0	0,6	4,8	0,1

Observando a tabela 4-1, podemos confirmar o que já foi descrito na introdução deste trabalho. De facto, o azeite, independentemente da sua qualidade, é constituído maioritariamente por ácido oléico (C18:1), ao contrário dos óleos de oleaginosas que apresentam um teor mais elevado de ácido linoléico (C18:2), que como já foi referido é bastante susceptível à oxidação. No óleo de amendoim, prevalece o C18:1 (cerca de 50%), no entanto, uma quantidade, ainda significativa, de C18:2 (cerca de 33%) também está presente.

4.1.2. AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA DEGRADAÇÃO DOS POLIFENÓIS

4.1.2.1. Determinação dos polifenóis nas amostras de azeite

Para identificar os polifenóis presentes nas amostras de azeite, fez-se uma análise por HPLC de uma solução metanólica dos padrões de hidroxitirosol (HyTy), tirosol (Ty), acetato de hidroxitirosol (HyTyAc), 3,4-DHPEA-EDA (HyTy-EDA), oleuropeína (OI) e 3,4-DHPEA-EA (HyTy-EA), obtendo-se o seguinte cromatograma (figura 4-1):

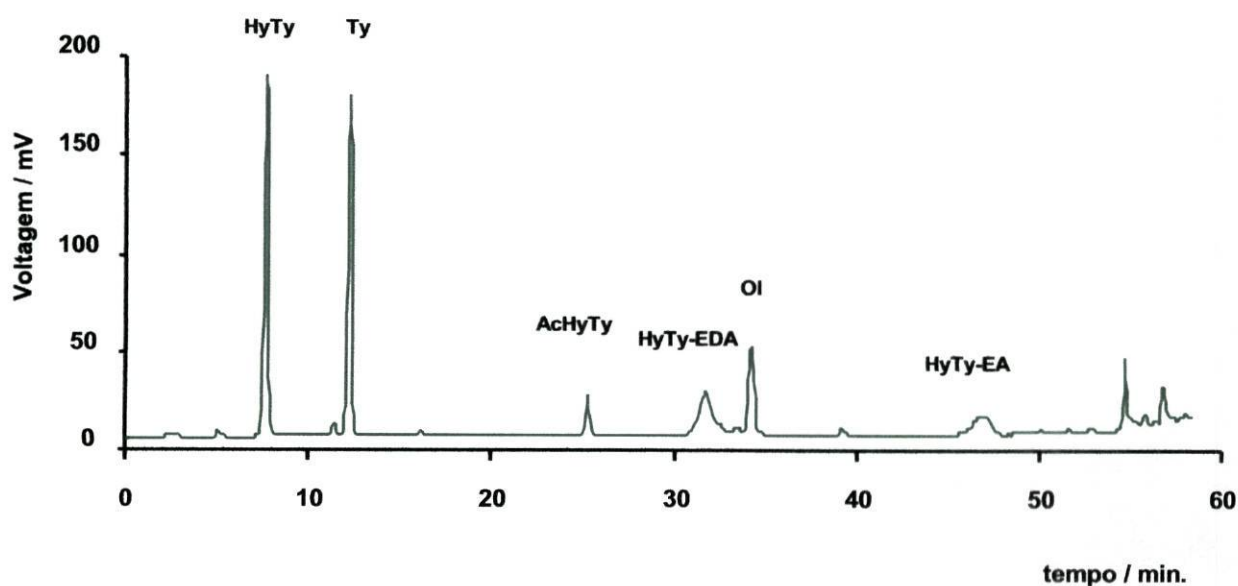


Figura 4-1 : Cromatograma de uma solução metanólica de padrões fenólicos.

Como foi referido na introdução deste trabalho, a azeite possui uma pequena fracção de compostos insaponificáveis, que incluem os polifenóis. Deste modo, torna-se fundamental avaliar não só a quantidade total de fenóis presente nas várias amostras de azeite, como também a quantidade das principais classes de fenóis existentes, nomeadamente, dos álcoois fenólicos, lignanos e secoiridóides (figuras 4-2 a 4-6), que contribuem para essa quantidade total.

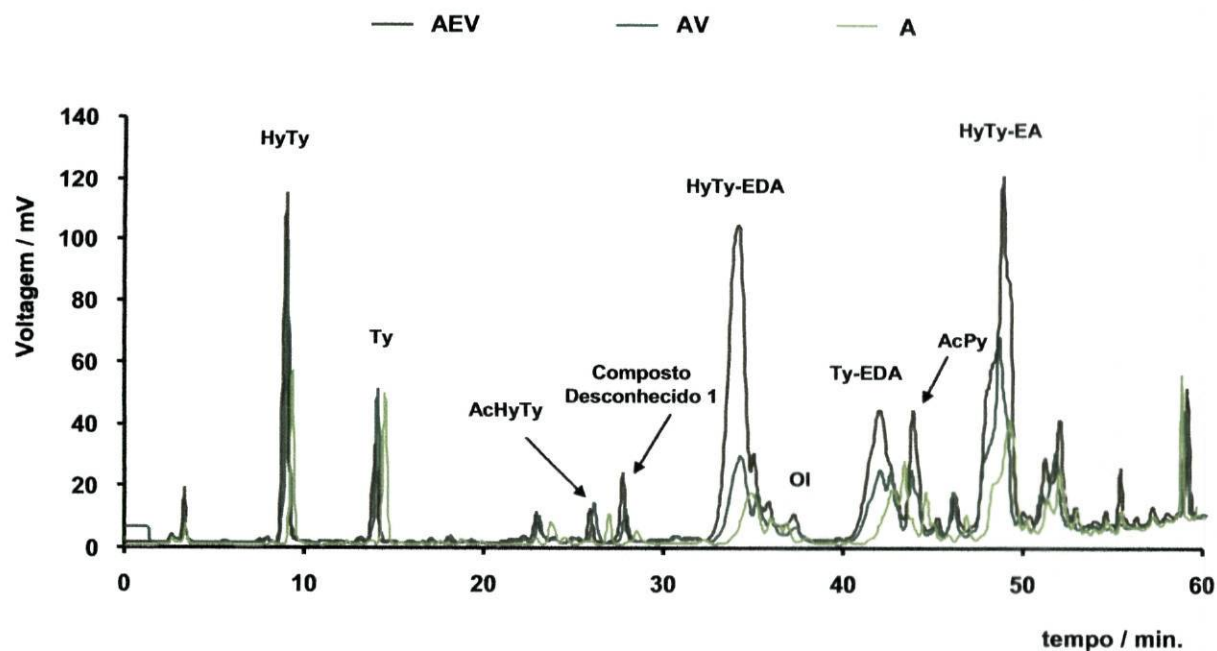


Figura 4-2 : Cromatograma dos extractos fenólicos dos azeites extra-virgem (AEV), virgem (AV) e azeite (A).

Na figura 4-2 podemos confirmar que, antes do processamento, o azeite extra-virgem (AEV) é aquele que possui uma maior quantidade de polifenóis, seguido do azeite virgem (AV) e do azeite (A).

Após o processamento verifica-se que a quantidade total destes fenóis é bastante afectada, sendo este facto mais visível nas amostras que continham alimentos (figura 4-3). No entanto, as amostras contendo AEV continuam a apresentar uma maior quantidade destes antioxidantes face aos restantes azeites.

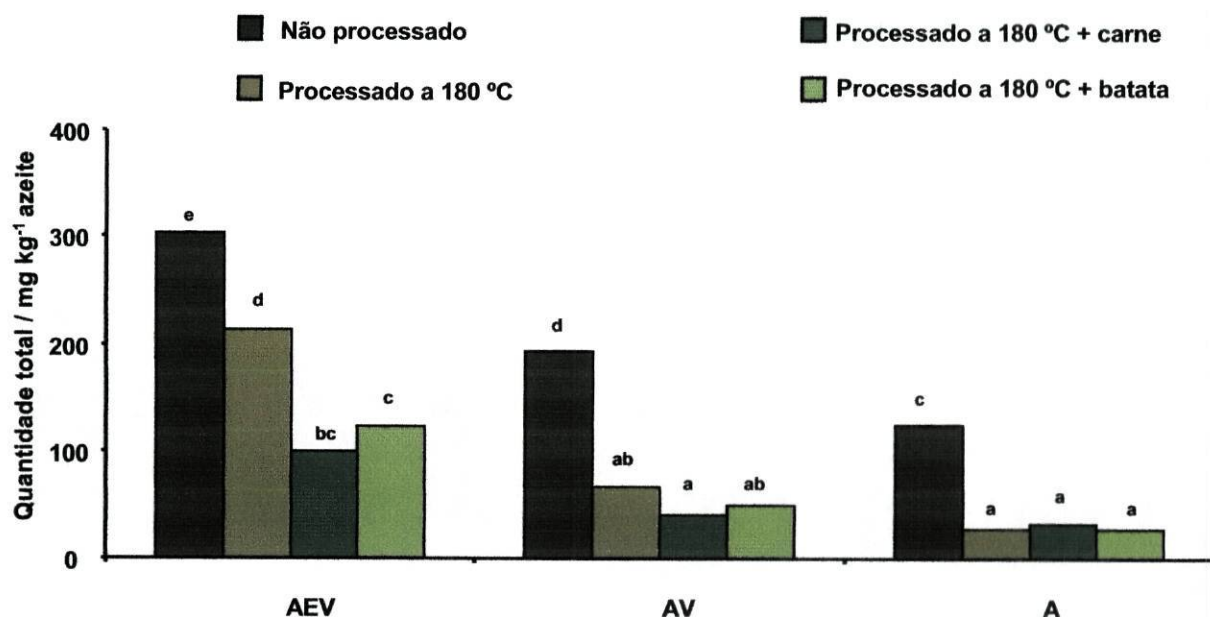


Figura 4-3 : Quantidade de polifenóis totais nas amostras de AEV, AV e A, em mg kg^{-1} azeite. Para o seu cálculo, utilizou-se uma massa molar média de 320 g mol^{-1} . Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A quantidade de álcoois fenólicos nas amostras pode ser observada na figura 4-4.

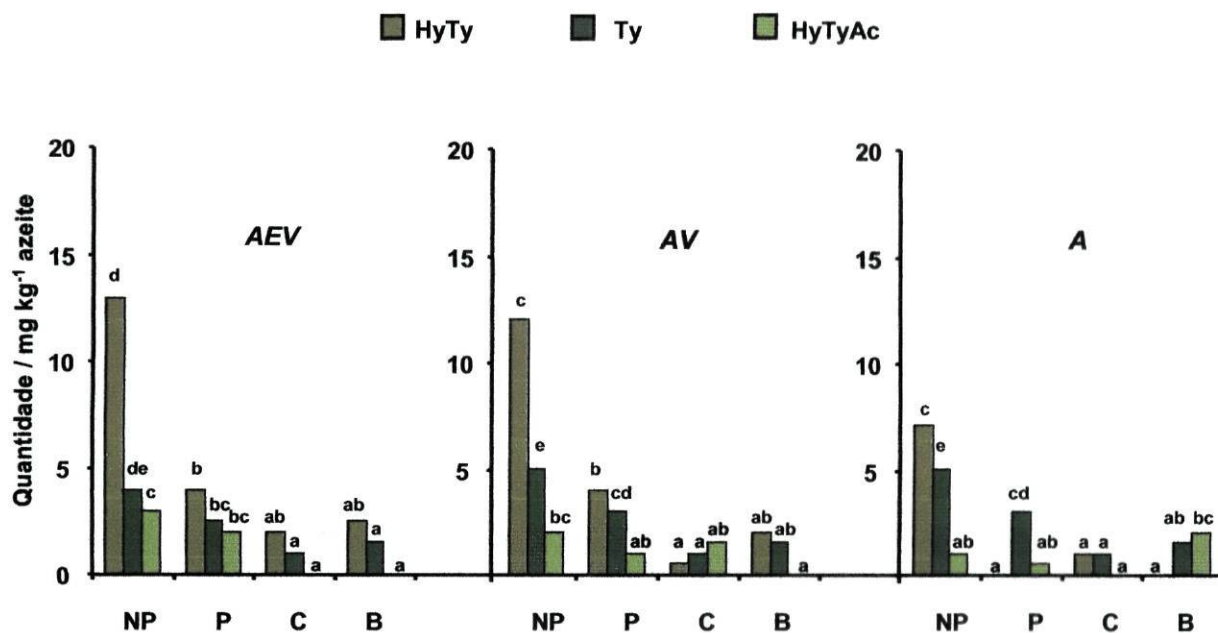


Figura 4-4 : Quantidade de álcoois fenólicos nas amostras, em mg kg^{-1} azeite. As letras NP, P, C e B correspondem, respectivamente, às amostras de azeite não processado, processado a $180 \text{ }^\circ\text{C}$, processado a $180 \text{ }^\circ\text{C}$ com carne e com batata. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Assim, verifica-se que o HyTy é o álcool fenólico que existe em maior quantidade em todas as amostras antes do processamento. Após o processamento, como já era esperado, observou-se um decréscimo considerável na concentração destes compostos em todas as amostras, sobretudo os *o*-fenóis como o HyTy e o HyTyAc. Resultados semelhantes foram obtidos por Brenes e colaboradores [109] e por Allouche e colaboradores [110]. No entanto, estes autores observaram, inicialmente, um aumento da concentração de HyTy nas primeiras horas de processamento, devido à hidrólise dos secoiridóides. Tal facto não foi verificado no presente trabalho. Observou-se que a presença de alimentos de alimentos contribuiu para uma maior destruição destes compostos.

Os lignanos são outro grupo de polifenóis presente nos vários tipos de azeite. À semelhança do que acontece com os álcoois fenólicos, os lignanos também são fortemente afectados com o processamento (figura 4-5).

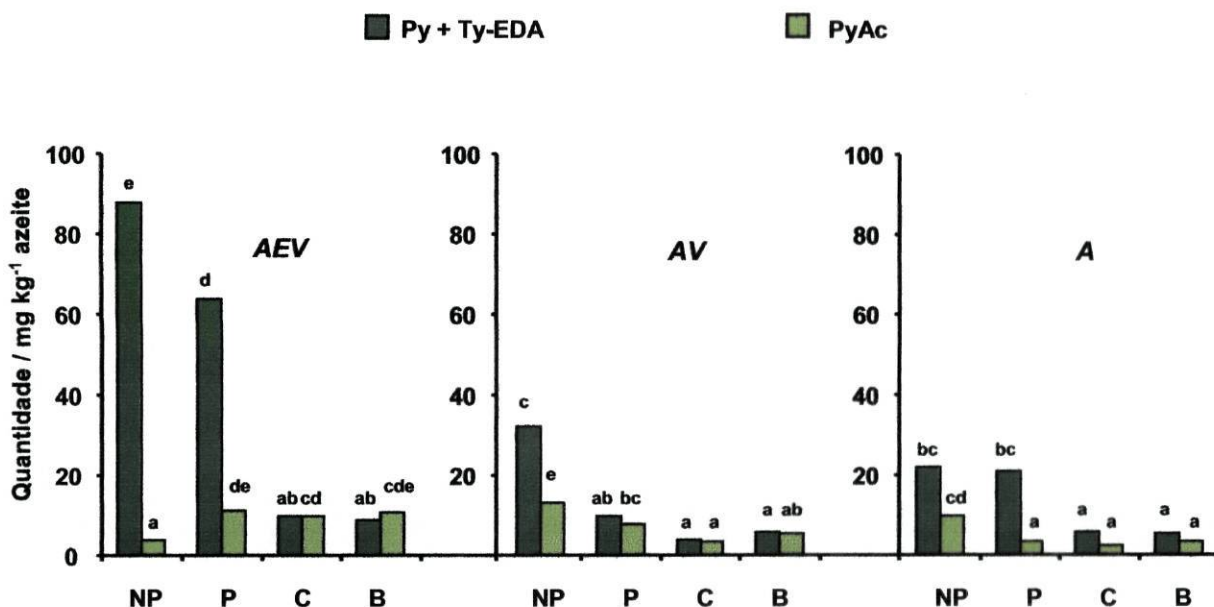


Figura 4-5 : Quantidade de *lignanos** nas amostras, em mg kg⁻¹ azeite. As letras NP, P, C e B correspondem, respectivamente, às amostras de azeite não processado, processado a 180 °C, processado a 180 °C com carne e com batata. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes (p < 0,05).

* O Ty-EDA não é um lignano. No entanto, devido à dificuldade de separação deste composto do Py, por HPLC, determinou-se a quantidade dos dois compostos em conjunto.

Este facto observa-se essencialmente para os compostos Py + Ty-EDA, ao contrário da quantidade de PyAc que, aparentemente, aumentou relativamente à amostra inicial (não processada). Tal comportamento pode dever-se a compostos originados pela degradação dos polifenóis com tempo de retenção semelhante. Mais uma vez se verifica que os alimentos afectam a estabilidade destes compostos.

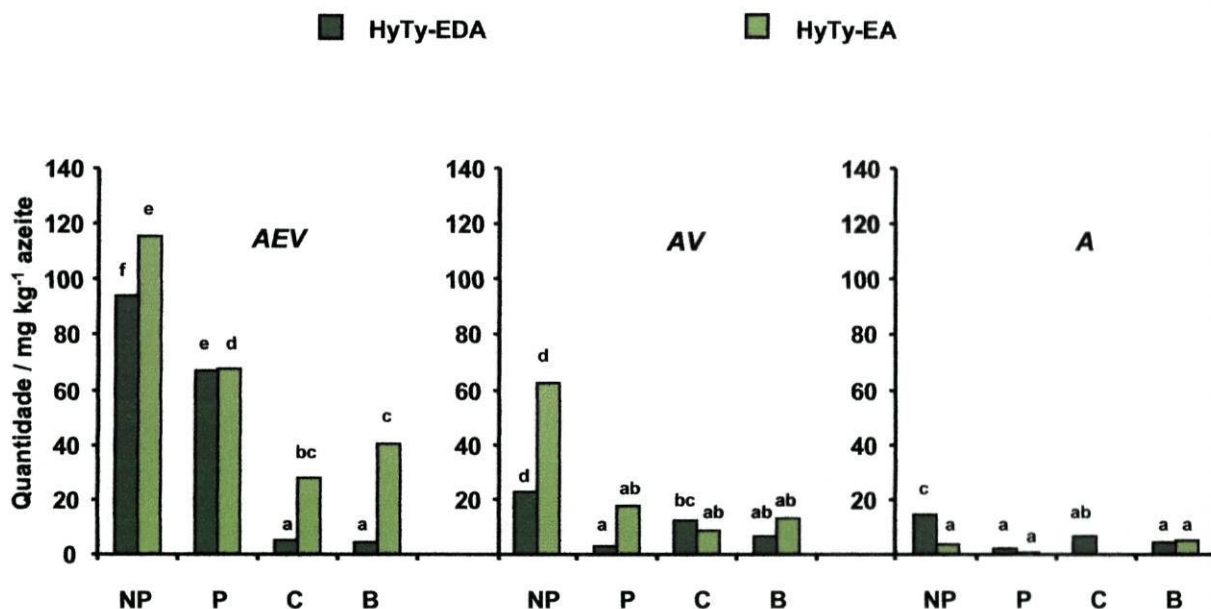


Figura 4-6 : Quantidade de secoiridóides nas amostras, em mg kg⁻¹ azeite. As letras NP, P, C e B correspondem às amostras de azeite não processado, processado a 180 °C, processado a 180 °C com carne e com batata. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Comparando as figuras 4-4 a 4-6, os secoiridóides (figura 4-6) são, sem dúvida, os polifenóis mais abundantes no azeite. Pode observar-se novamente que as amostras de AEV possuem uma quantidade destes fenóis superior à dos restantes azeites estudados, sobretudo em relação ao A, que apesar de ser provido deste tipo de antioxidantes, essa quantidade era bastante baixa. Após o processamento sem alimentos, verificou-se que o HyTy-EDA foi menos afectado do que o HyTy-EA, facto que está de acordo com a literatura [110]. No entanto, na presença dos alimentos, constatou-se precisamente o contrário: o HyTy-EDA pareceu exercer uma maior protecção das amostras de azeite, visto que foi "utilizado" numa maior extensão. Mais uma vez, a presença de alimentos levou a uma maior destruição dos secoiridóides presentes nas amostras.

4.1.2.2. Determinação dos polifenóis nas fases aquosas das amostras de carne

Nas fases aquosas das 3 amostras de carne, foram detectadas, por HPLC, picos com os seguintes tempos de retenção:

Amostra	Tempo de retenção /min.				
AEVC	6,07	21,20	26,67	40,48	48,92
AVC	5,89	24,33	29,31	48,09	49,94
AC	5,32	25,61	32,22	47,67	52,00

Nenhum destes compostos possui tempos de retenção (TR) semelhantes aos padrões utilizados, pelo que não foram identificados. No entanto, pensa-se que poderão ser compostos cedidos pela própria carne.

4.1.2.3. Identificação dos compostos desconhecidos por LC-DAD-MS:

Durante a análise dos cromatogramas das várias amostras de azeite, foram detectados 2 compostos desconhecidos, que foram igualmente quantificados (figuras 4-7 e 4-9):

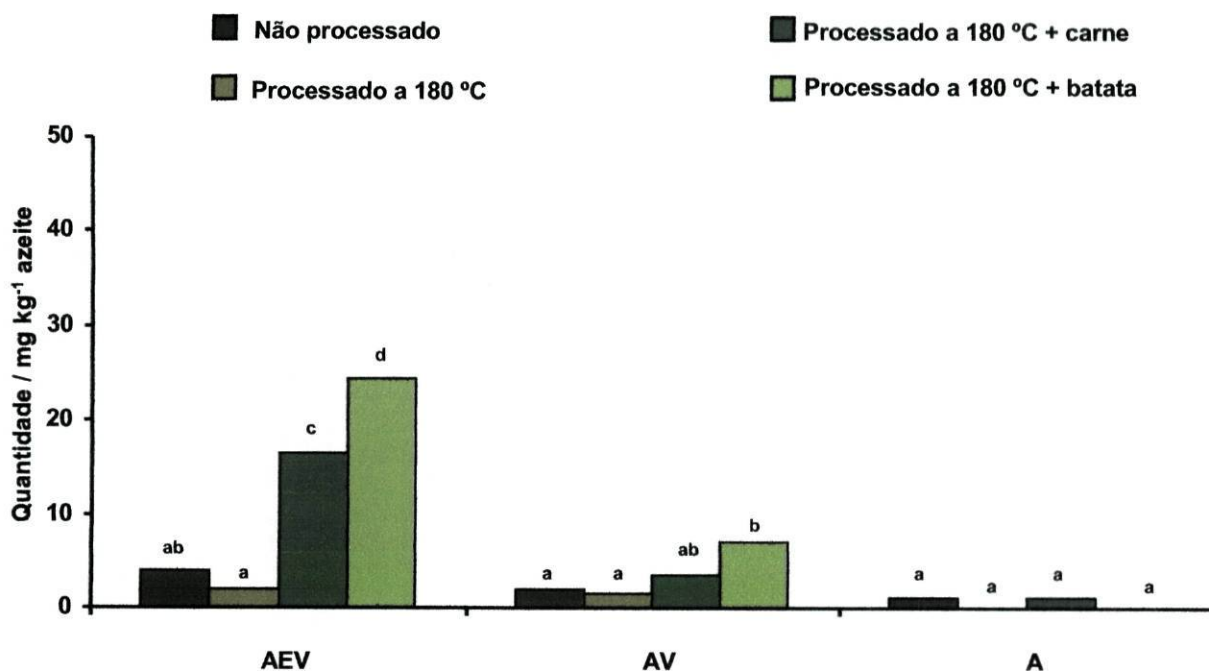


Figura 4-7 : Quantidade de composto desconhecido 1 nas amostras de AEV, AV e A, em mg kg^{-1} azeite. Para o seu cálculo, utilizou-se uma massa molar de 242 g mol^{-1} . Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

De acordo com a figura 4-7, podemos observar antes do processamento, a $180 \text{ }^\circ\text{C}$, todas as amostras de azeite já possuíam uma pequena quantidade do composto 1. No entanto, é nas amostras processadas com alimentos, sobretudo com batata que essa quantidade aumenta consideravelmente.

Na tentativa de se identificar este composto, recorreu-se à espectrometria LC-DAD-MS, cujos resultados foram os seguintes:

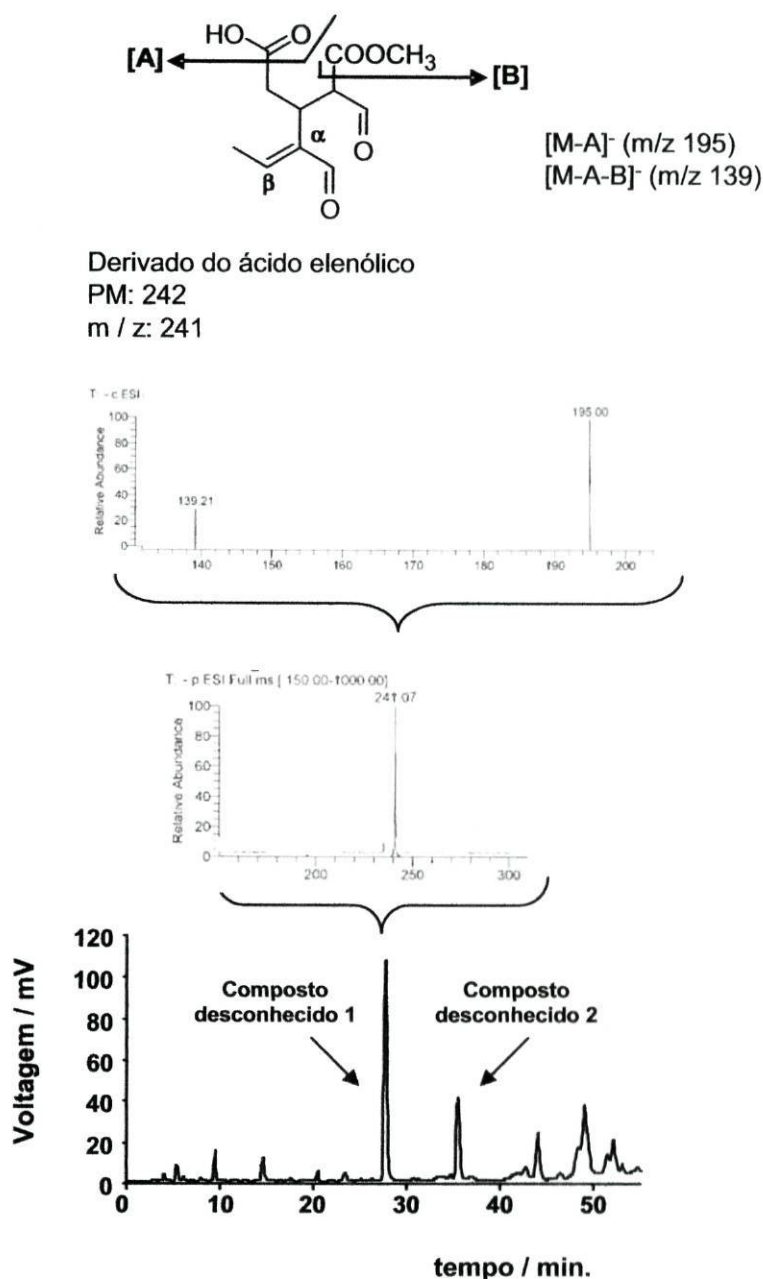


Figura 4-8 : Cromatograma referente ao extracto fenólico da amostra AEVB com o espectro de massa do pico correspondente ao composto desconhecido 1 (tr ~ 28 min.) e o esquema de fragmentação proposto.

Através da análise realizada por espectrometria de massa verificou-se a existência de um pico molecular $m/z = 241$, compatível com a massa do ácido elenólico ($M_r = 242$). Após a realização do MS^2 do ião molecular $m/z = 241$, 2 picos foram detectados com $m/z = 139$ e 195 , compatíveis com a saída dos grupos $-COOH$ e $-COOCH_3$. O espectro de UV do composto 1 revelou um pico a 232 nm, correspondente às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo aldeído α, β -insaturado e outro pico a 280 nm correspondente às transições $n \rightarrow \pi^*$ dos

grupos carbonilo. Dado que não foi observado nenhum pico a 240-245 nm, característico do grupo éster α , β -insaturado substituído na posição β com um grupo O-alkilo [111], o composto 1 não poderá ser o ácido elenólico, mas um dos seus isómeros. Pode concluir-se ainda que grande parte dos secoiridóides sofreu hidrólise, em especial na presença da batata, provavelmente provocada pela presença de pequenas quantidades de água liberta pelos alimentos.

O composto 2, presente nas amostras, foi igualmente quantificado:

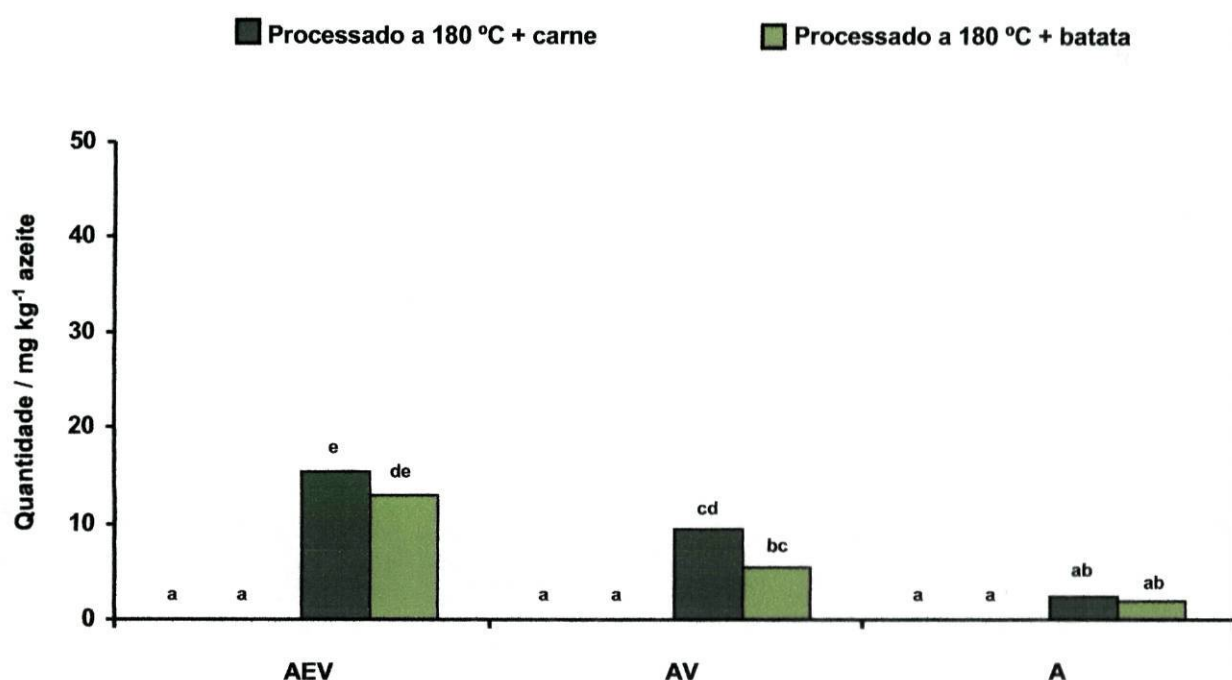


Figura 4-9 : Quantidade de composto desconhecido 2 nas amostras de AEV, AV e A, em mg kg⁻¹ azeite. Para o seu cálculo, utilizou-se uma massa molar média de 320 g mol⁻¹. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Atendendo à figura supra representada, podemos observar que este composto está presente apenas nas amostras de azeite providas de alimentos, sobretudo naquelas em que a quantidade de polifenóis é maior (AEV). À semelhança do composto 1, recorreu-se à espectrometria de massa na tentativa de descobrir a sua identidade. No entanto, não nos foi possível a sua identificação, uma vez que compostos como o derivado metanólico de 3,4-DHPEA-EDA ($m/z = 335$; outros fragmentos: $m/z = 199, 155, 111$) foram co-eluídos.

Contudo, o espectro de massa do referido composto, realizado em modo negativo, apresentou um pico base de $m/z = 221$, valor este que até ao momento nos é totalmente desconhecido.

Dado que, após o processamento, a concentração de ambos os compostos aumentou relativamente à quantidade inicial de polifenóis presentes no azeite, supôs-se que estes compostos deveriam resultar da degradação destes compostos fenólicos

4.1.3. DETERMINAÇÃO DOS TOCOFERÓIS NOS DIFERENTES ÓLEOS ALIMENTARES

Os tocoferóis são antioxidantes naturais presentes nos óleos vegetais. De acordo com a bibliografia citada, espera-se que os óleos de oleaginosas apresentem uma maior quantidade destes fenóis, relativamente aos azeites. Quantificou-se a totalidade de tocoferóis existentes nas várias amostras de óleo alimentar (figura 4-10), assim como a quantidade de α , γ e δ -tocoferol (figura 4-11).

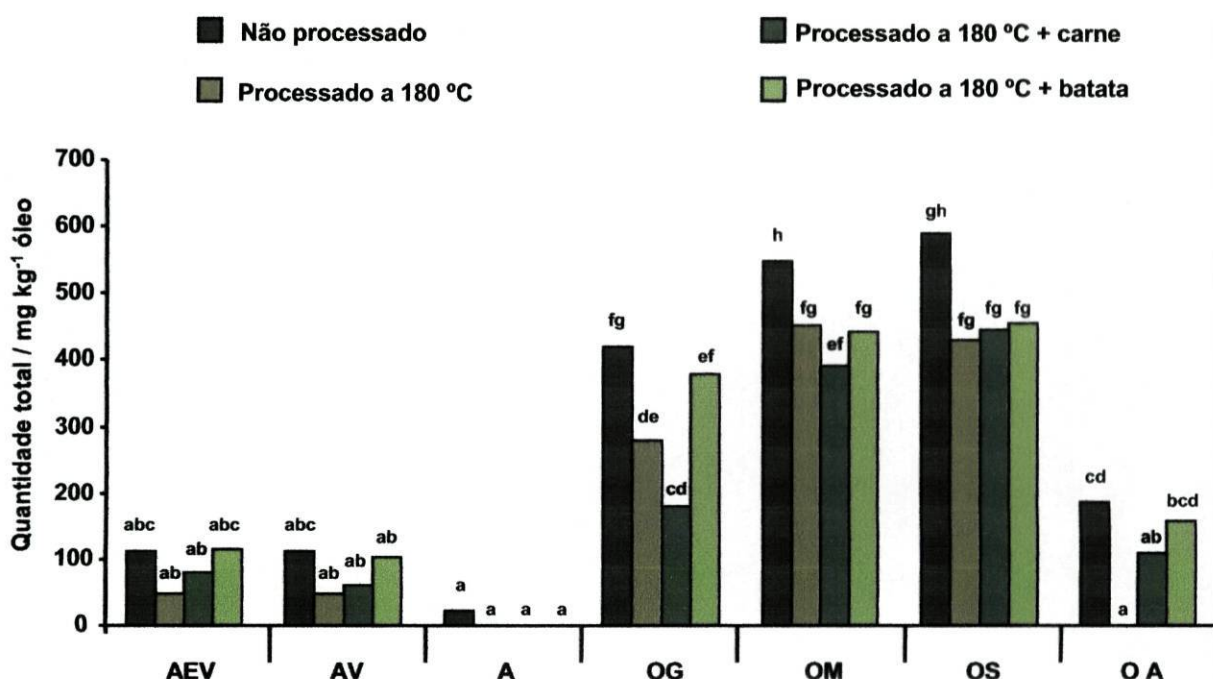


Figura 4-10 : Quantidade de tocoferóis totais nas amostras, em mg kg^{-1} óleo. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A figura 4-10 revela-nos o que já era esperado. Os óleos de oleaginosas possuem, inicialmente, uma maior quantidade de tocoferóis, relativamente aos azeites.

O óleo de amendoim (OA) é o que apresenta menor quantidade deste antioxidante.

Mais uma vez, verifica-se que o processamento resulta numa redução dos compostos fenólicos. No entanto, ao contrário do que se verificou com os polifenóis, as amostras mais afectadas foram aquelas desprovidas de alimentos e que a carne, mas sobretudo batata, parecem proteger parte da quantidade de tocoferóis. No caso do azeite (A), este possuía, inicialmente, uma concentração cerca de 20 mg / kg azeite de tocoferol, quantidade esta que se degradou por completo após o seu processamento.

A quantidade, em mg / kg de óleo, de α , γ e δ -tocoferol presente nos óleos alimentares estudados neste trabalho foi igualmente determinada (figura 4-11), uma vez que a actividade dos vários tocoferóis em óleo é diferente. De acordo com as referências citadas [112, 113], o α -tocoferol é o que apresenta uma actividade antioxidante mais elevada em sistemas biológicos, mas poderá ser a mais fraca em óleos, dependendo da sua concentração. Estes autores observaram que a 100 ppm, o α -tocoferol exerce uma melhor actividade antioxidante no OM quando comparado com o γ -tocoferol. Contudo, a concentrações superiores a 250 ppm, o α -tocoferol começa a mostrar efeitos pró-oxidantes, sendo o γ -tocoferol o mais activo a concentrações até 1000 ppm. O δ -tocoferol, apesar de ser o menos activo a baixas concentrações (100 – 1000 ppm), relativamente aos restantes tocoferóis, não apresenta efeitos pró-oxidantes no OM até 5000 ppm [112, 113]. Atendendo aos resultados obtidos por estes autores, podemos tentar justificar o facto do OG ter sido o pior dos óleos alimentares estudados. No que respeita a este óleo (figura 4-10 ou 4-11), a protecção que se deveria ter observado pela elevada quantidade de α -tocoferol não se verificou, provavelmente porque a concentração existente neste óleo era mais susceptível ao efeito pró-oxidante. Deste modo, a elevada quantidade de α -tocoferol não foi eficaz na protecção do óleo face à oxidação. O azeite (figura 4-10), independentemente da sua qualidade, para além de conter polifenóis, possui também α -tocoferol. No entanto, em concentrações inferiores a 250 ppm, indicando-nos o seu poder antioxidante exercido na protecção do óleo.

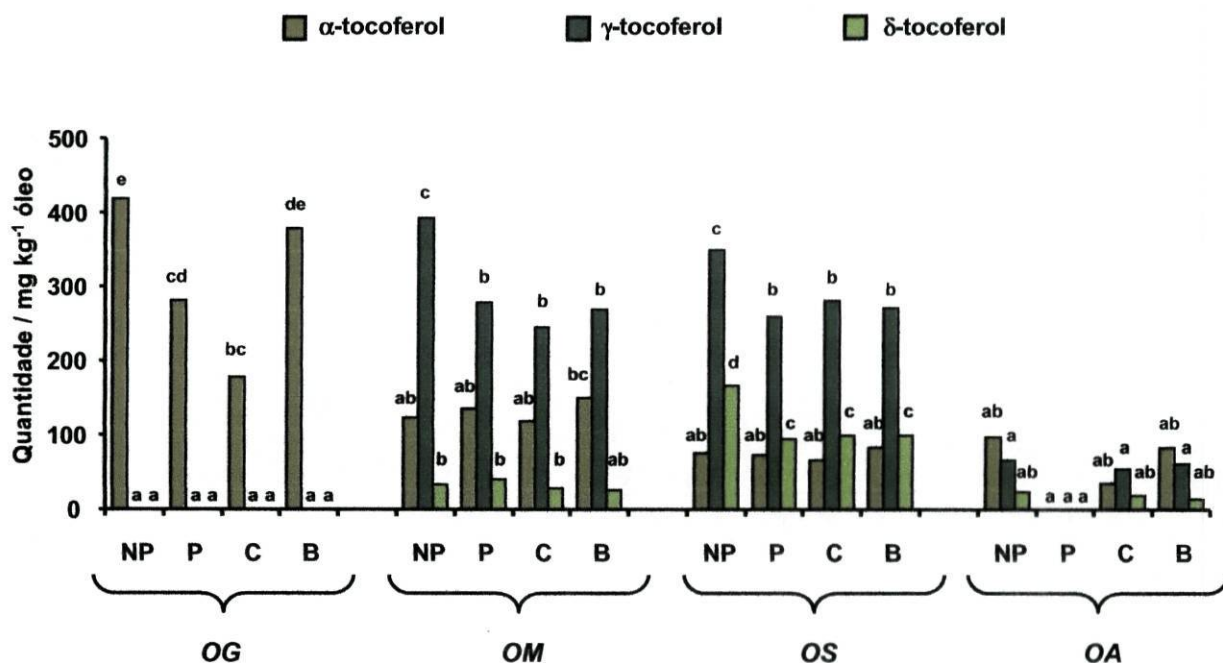


Figura 4-11 : Quantidade de α, γ e δ-tocopherol nas amostras, em mg kg⁻¹ óleo. As letras NP, P, C e B correspondem às amostras de óleo não processado, processado a 180 °C, processado a 180 °C com carne e com batata. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Normalmente, a elevada quantidade de tocoferol está associada ao elevado conteúdo em PUFA's ^[114] e de facto, o OS com uma elevada quantidade destes ácidos gordos, possui também um elevado conteúdo em tocoferóis, especialmente em γ-tocopherol. Observando a figura 4-11, a tendência deste tocoferol para decrescer nas amostras de OM e OS, foi mais rápida do que o α-tocopherol. Na presença de γ-tocopherol, pode observar-se um efeito protector sobre o α-tocopherol.

4.1.4. AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA DOS DIFERENTES ÓLEOS ALIMENTARES APÓS O PROCESSAMENTO, A 180 °C

4.1.4.1. Determinação do conteúdo em dienos conjugados

O teste dos dienos conjugados realizado às várias amostras permite-nos a quantificação de compostos primários de oxidação nas mesmas. Na figura 4-12 encontram-se os resultados obtidos para as amostras, logo após o seu processamento a 180 °C.

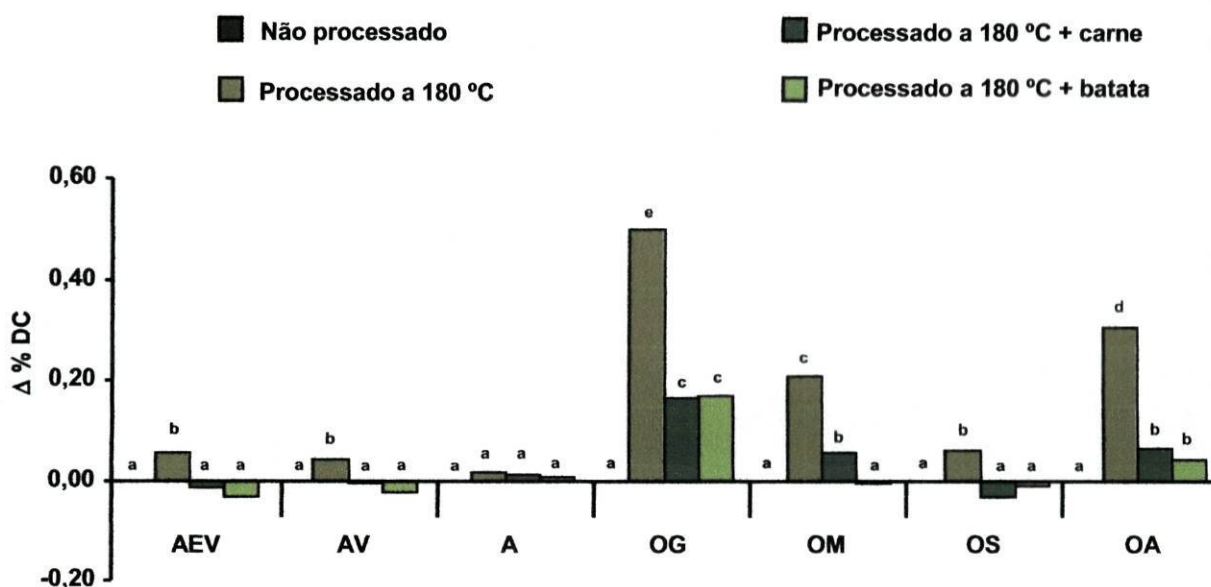


Figura 4-12 : Variação da percentagem de dienos conjugados ($\Delta\%DC$) das amostras logo após o processamento a 180 °C. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Observando os resultados representados na figura 4-12, pode verificar-se que todas as amostras de azeite se encontravam quimicamente estáveis logo após o seu processamento, ao contrário do que acontece, em geral, nos óleos de oleaginosas. O óleo de girassol (OG) mostrou ser o pior, uma vez que, logo após o seu processamento, todas as amostras já se encontravam oxidadas e quimicamente impróprias para consumo. Este óleo contém uma elevada quantidade em PUFA's e para além disso, contém apenas α -tocoferol em concentrações propícias à pró-oxidação [112, 113]. Segue-se o óleo de amendoim (OA), que mesmo sendo dos óleos que possui mais ácido oléico, não apresentou grande resistência à oxidação. O facto de a quantidade de tocoferóis presentes nestas amostras ser

bastante baixo, poderá explicar este resultado. O óleo de soja (OS), apesar de ser constituído maioritariamente por PUFAs mostrou ser bastante estável, provavelmente devido ao seu conteúdo elevado de γ -tocoferol, tocoferol com maior actividade antioxidante atendendo à concentração existente neste óleo. De um modo geral, independentemente das amostras estarem ou não oxidadas, verificou-se que a presença dos alimentos (carne e batata) contribuiu para uma maior estabilidade oxidativa dos óleos alimentares, uma vez que, comparando os resultados destas amostras com os obtidos para os óleos processados sem alimentos, observa-se que os primeiros são significativamente mais baixos. No entanto, a batata parece proteger melhor os óleos alimentares da oxidação, relativamente à carne. Uma possível justificação será a presença de ferro nesta última, que pode contribuir para um desenrolar mais rápido da degradação lipídica.

4.1.4.2. Determinação do índice de *p*-anisidina

Como já foi referido, os aldeídos resultantes da oxidação secundária dos lípidos reagem com a *p*-anisidina, originando uma solução colorida. Deste modo é possível relacionar a absorvância das soluções medida espectrofotometricamente a 350 nm com o índice de *p*-anisidina. Assim, quanto mais oxidada se encontrar a amostra, maior será a sua absorvância, à qual corresponde uma maior índice de *p*-anisidina.

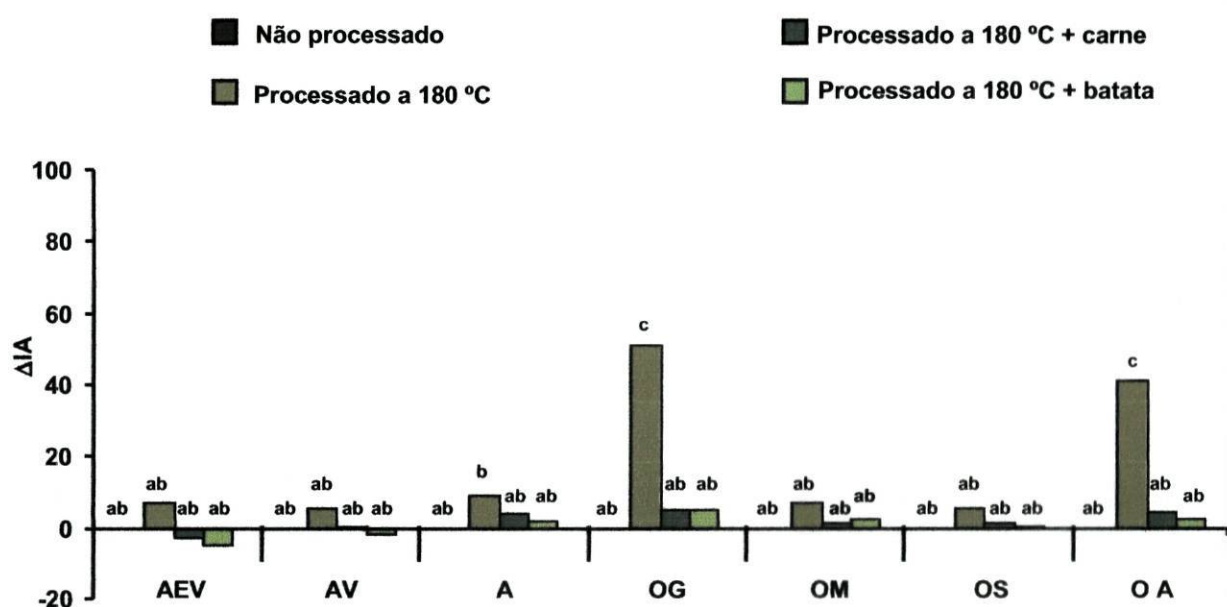


Figura 4-13 : Variação do índice de *p*-anisidina (IA) das amostras logo após o processamento a 180 °C. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A figura 4-13 mostra-nos que, logo após o processamento, o índice de *p*-anisidina é superior nos óleos de oleaginosas, processados sem alimentos, o que confirma os resultados obtidos anteriormente (dienos conjugados). A amostra de óleo de milho processada sem alimentos (OMP), apesar de já possuir um valor elevado de $\Delta\%DC$, apresenta ainda um valor baixo de ΔIA . Deste modo, esta amostra já se encontrava numa fase avançada da oxidação, apesar de ainda não apresentar um odor a ranço.

4.1.5. AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA DAS AMOSTRAS DE CARNE PROCESSADAS NOS DIFERENTES ÓLEOS ALIMENTARES

Após a extracção da gordura das amostras de carne pelo método de Soxhlet, procedeu-se à avaliação do seu estado oxidativo pelo teste dos dienos conjugados. Os resultados obtidos encontram-se na figura 4-14.

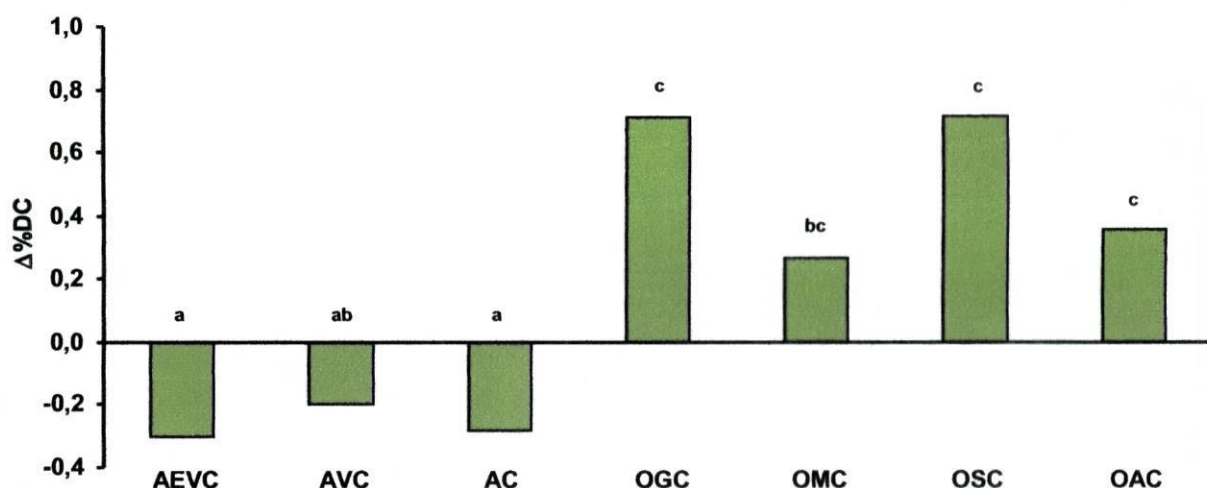


Figura 4-14 : Percentagem de dienos conjugados das amostras de carne (C) processadas nos diferentes óleos alimentares, relativamente à percentagem de dienos conjugados das amostras de carne fresca. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Atendendo aos resultados, pode dizer-se todos os tipos de azeite parecem proteger os lípidos da carne processada, mesmo após o seu armazenamento, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 30 dias, uma vez que a quantidade de hidroperóxidos nestas amostras, relativamente às da

carne fresca (controlo), são inexistentes. Tal facto não acontece nas amostras de carne processadas nos restantes óleos alimentares. Assim, a estabilidade lipídica da carne parece ser fortemente afectada pela percentagem de PUFA, maioritariamente presentes nas amostras de OG (54%) e OS (54%). O resultado obtido para a carne processada deste último óleo (OSC) é um pouco estranho, uma vez que logo após o seu processamento foi o que mostrou ser o melhor dos óleos de oleaginosas. O próprio processo de extracção pode ter acelerado a degradação oxidativa desta amostra mais sensível à temperatura, devido ao seu elevado conteúdo em ácido linolénico (C18:3). Outro método de extracção deveria, provavelmente, ter sido utilizado.

4.1.6. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRACTOS FENÓLICOS DAS AMOSTRAS APÓS O PROCESSAMENTO, A 180 °C

Com o intuito de se avaliar a capacidade antioxidante total ainda existente nos extractos dos óleos alimentares após o processamento, a 180 °C, recorreu-se ao teste da estufa de Schaal. De modo a avaliar a contribuição de cada um dos extractos obtidos a partir das amostras (extracto hidrofílico contendo polifenóis e extracto lipofílico contendo tocoferóis) efectuou-se o teste de DPPH[•] a ambos.

4.1.6.1. Teste da Estufa de Schaal (“Schaal Oven Test”)

No teste da estufa de Schaal, as amostras processadas, a 180 °C, foram monitorizadas através da determinação da percentagem de dienos conjugados e do índice de *p*-anisidina. Os resultados obtidos, ao fim de 15 dias de armazenamento na estufa, a 60 °C, encontram-se nas figuras 4-15 e 4-16.

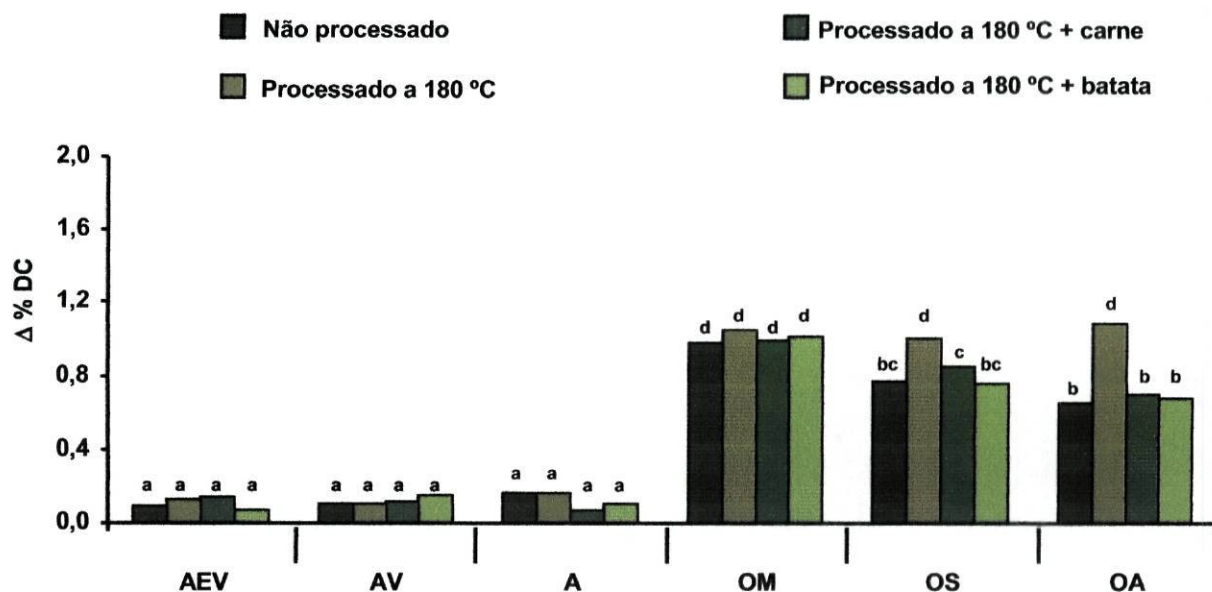


Figura 4-15 : Variação da percentagem de dienos conjugados das amostras ao fim de 15 dias na estufa a 60 °C. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

As amostras de azeite e dos outros óleos que não oxidaram logo após o processamento a 180 °C, mantiveram-se estáveis durante 3 meses e 1 semana, respectivamente, a 4 °C (valores não referidos devido a não existirem alterações significativas). A autoxidação das amostras começa a tornar-se visível após o armazenamento das mesmas ao fim de 15 dias na estufa a 60 °C. Ao fim deste tempo, todas as amostras dos OM, OS e OA apresentaram possuir uma elevada quantidade de hidroperóxidos, indicadores do início da degradação das mesmas. O facto de que os alimentos parecem proteger os óleos alimentares da degradação oxidativa confirma-se. Pensou-se, inicialmente, que poderia haver uma cedência de compostos com poder antioxidante da batata para o óleo. Deste modo, e dado que o ácido clorogénico (ácido 3-O-cafeoilquinico) representa cerca de 90% do total dos compostos fenólicos presentes na batata [115, 116], efectuou-se um padrão deste composto, a fim de se verificar a sua contribuição na estabilidade das amostras. No entanto, nenhum pico cromatográfico correspondente a este composto foi detectado. Presume-se que o ácido clorogénico presente na batata tenha sido consumido para a protecção dos óleos, uma vez que é um composto com uma elevada capacidade antioxidante.

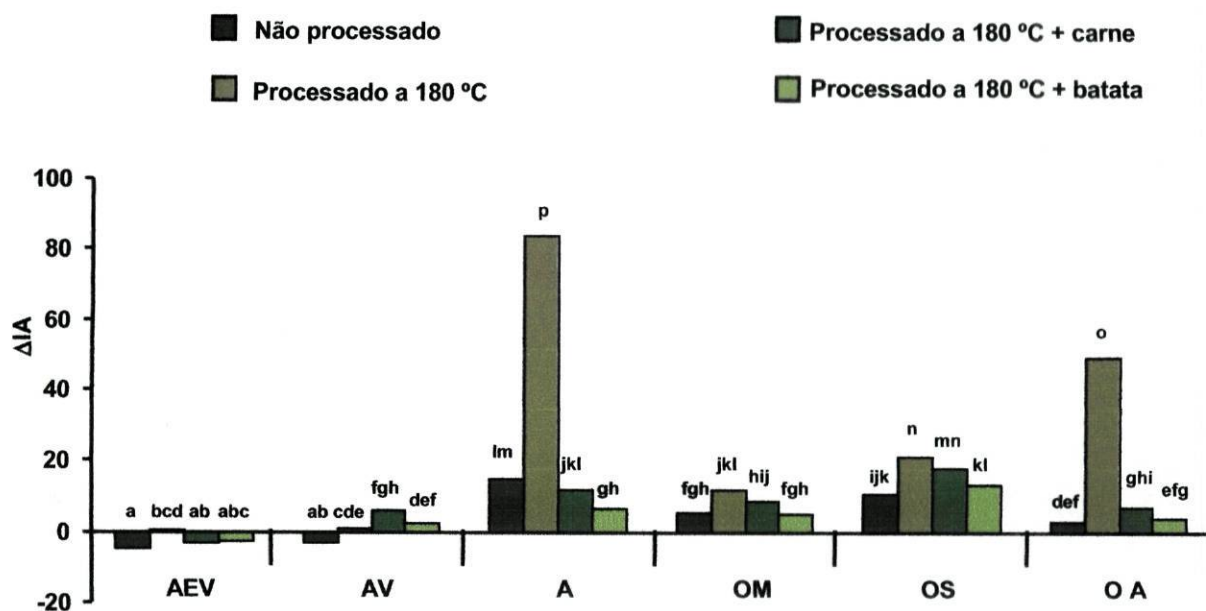


Figura 4-16 : Variação do índice de *p*-anisidina (IA) das amostras ao fim de 15 dias na estufa a 60 °C. * Os valores dos AEV, AV e A correspondem à Δ IA das amostras ao fim de 25 dias a 60°C, uma vez que ao fim de 15 dias, não se notaram diferenças significativas. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Ao fim de 25 dias na estufa a 60 °C, a amostra de azeite processada sem alimentos (AP) apresenta um índice muito elevado de *p*-anisidina, o que significa uma elevada quantidade de produtos secundários de oxidação nesta amostra. O AEV é, sem dúvida, o óleo alimentar quimicamente mais estável. As amostras contendo OM mostraram possuir uma quantidade de compostos secundários de oxidação inferior às amostras de OS, facto que pode ser justificado pela presença de mais ácido linoléico (C18:2) neste último. Quanto às amostras que continham alimentos, mais uma vez se pode observar que a sua velocidade de degradação é mais lenta, comparativamente às amostras processadas na ausência destes, para todos os tipos de óleos alimentares estudados. Estes factos estão de acordo com os resultados obtidos no teste dos dienos conjugados.

Através destes resultados, podemos ficar com uma ideia da capacidade antioxidante das amostras após o seu processamento. Assim, as amostras que se mantiveram estáveis por mais tempo, possuirão um maior poder anti-radicalar, face àquelas que se degradaram mais facilmente.

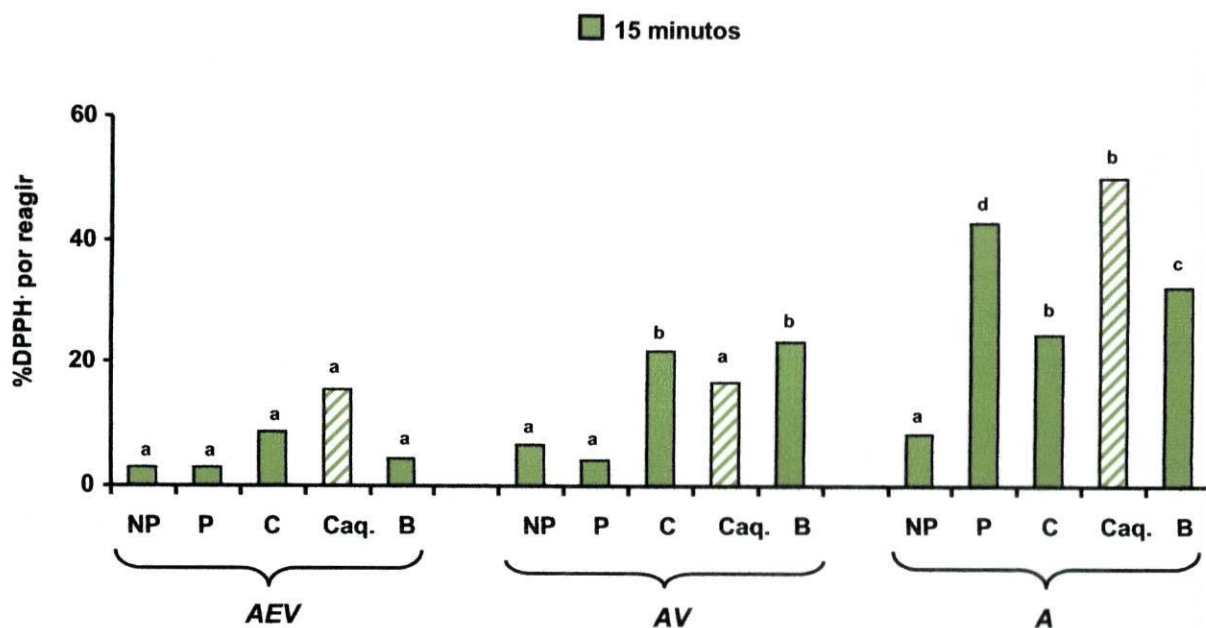
4.1.6.2. Teste de DPPH[•]

Figura 4-17 : Percentagem de DPPH por reagir nos extractos fenólicos das amostras de azeite ao fim de 15 minutos de reacção. As letras NP, P, C, Caq. e B correspondem, respectivamente, às amostras de azeite não processado, processado a 180 °C, processado a 180 °C com carne, fase aquosa da carne processada e processada a 180 °C com batata. Os valores representados são médias de triplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A figura 4-17 mostra-nos as alterações da actividade antioxidante dos extractos fenólicos do azeite, analisados pelo teste de DPPH[•] ao fim de 15 minutos de reacção. Através dos resultados obtidos podemos verificar que, ao fim do mesmo tempo de reacção, as amostras que contêm AEV possuem um maior poder antioxidante, visto que são aquelas que reagem mais rapidamente com o radical sintético. Verifica-se ainda que o AEV processado sem alimentos apresenta um bom poder antioxidante, talvez pelo facto de possuir uma quantidade considerável de polifenóis, como se pode observar na figura 4-3.

No que respeita às fases aquosas cedidas pela carne, repara-se que estas possuem um certo poder anti-radicalar, não só devido a compostos cedidos pelo próprio alimento, como também pelo próprio azeite. Na determinação dos polifenóis nas fases aquosas da carne foram detectados picos aos quais não foi possível a sua identificação, mas, perante estes resultados, supõe-se que sejam compostos com poder anti-radicalar. Ao fim de 15 minutos da reacção, na fase aquosa do AEV, ficou apenas por reagir cerca de 15,65%, enquanto que na fase aquosa do A, ficou por reagir cerca de 50,13% do radical, o que

revela o fraco poder antioxidante deste tipo de azeite, resultados que estão de acordo com toda a análise realizada anteriormente.

Com o intuito de se ficar com uma ideia da capacidade anti-radicalar dos tocoferóis existentes nos óleos de oleaginosas, utilizou-se o mesmo teste para avaliar os extractos contendo estes compostos. Os resultados obtidos estão representados na figura 4-18.

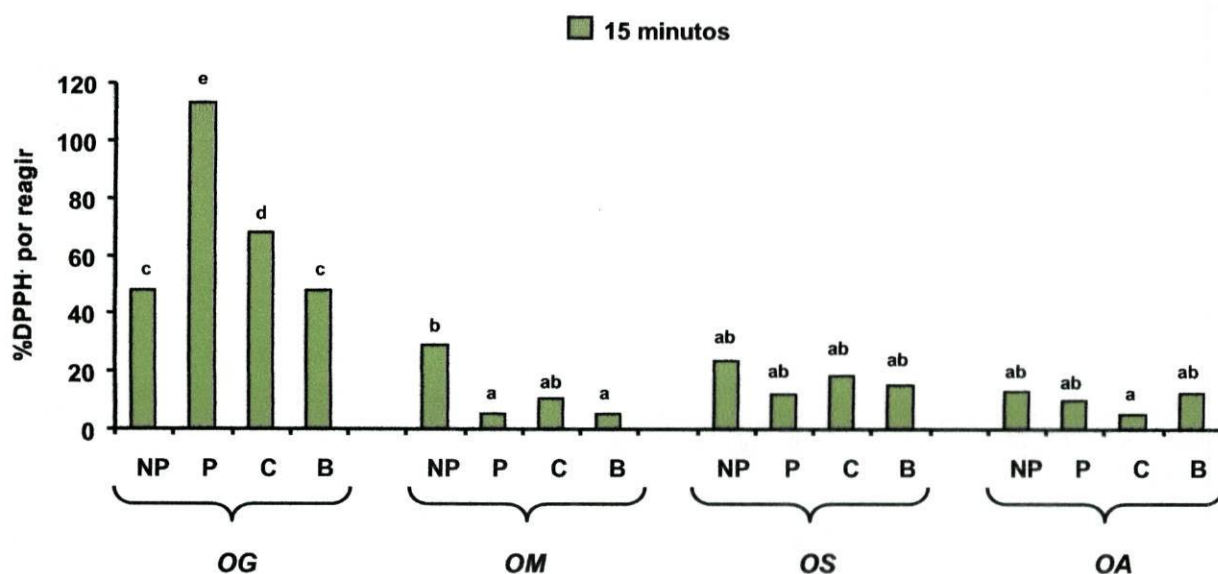


Figura 4-18 : Percentagem de DPPH por reagir nos extractos de tocoferol dos óleos de oleaginosas ao fim de 15 minutos de reacção. As letras NP, P, C e B correspondem, respectivamente, às amostras de azeite não processado, processado a 180 °C, processado a 180 °C com carne e com batata. Os valores representados são médias de triplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A figura supra representada diz respeito à quantidade, em percentagem, de DPPH que ficou por reagir nos extractos de tocoferol dos óleos de girassol (OG), milho (OM), soja (OS) e de amendoim (OA) ao fim de 15 minutos de reacção.

Relativamente à capacidade anti-radicalar dos extractos obtidos dos óleos antes do processamento, a 180 °C, verifica-se que esta capacidade é superior para as amostras contendo maior quantidade de tocoferóis totais. No entanto, nos extractos provenientes das amostras processadas, contrariamente ao esperado, verificou-se que algumas possuíam um poder anti-radicalar ainda maior do que inicialmente. Estes resultados poderão ter duas explicações possíveis: ou se formam compostos de degradação com maior poder anti-radicalar, durante o processamento, ou ocorrem reacções paralelas com produção de compostos corados que absorvem ao comprimento de onda utilizado (515 nm). Esta última hipótese é corroborada pelos resultados obtidos dos extractos de tocoferol dos azeites. A

título de exemplo, apresentam-se os resultados das amostras provenientes do AEV (figura 4-19).

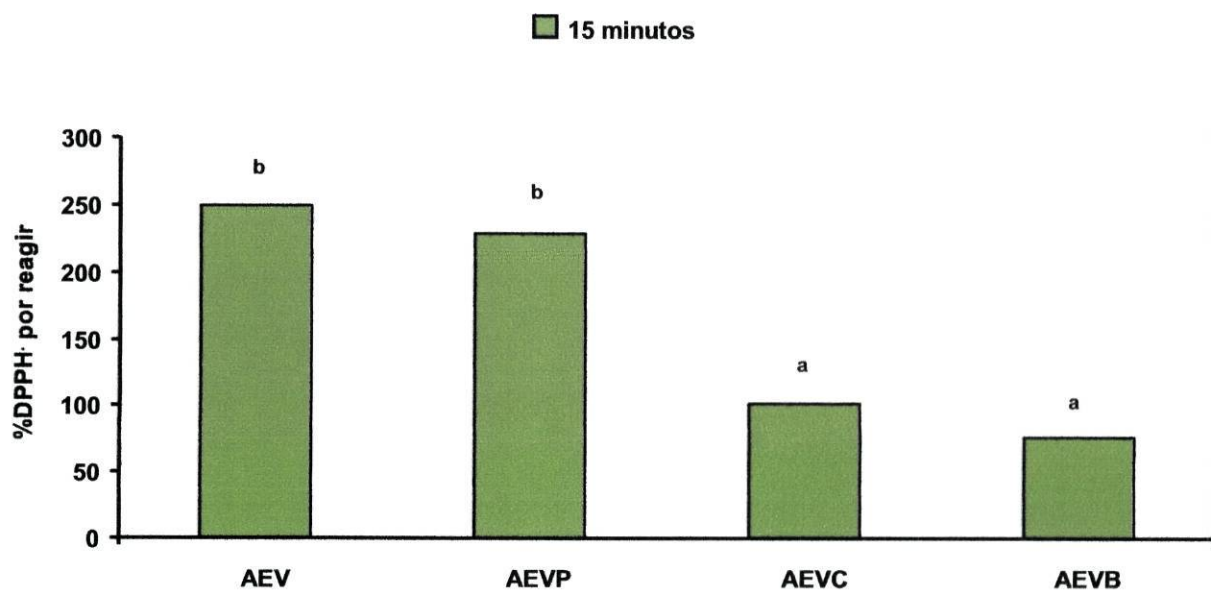


Figura 4-19 : Percentagem de DPPH· por reagir nos extractos de tocoferol do azeite extra-virgem (AEV) ao fim de 15 minutos de reacção. As letras P, C e B correspondem, respectivamente, às amostras de azeite processado a 180 °C, processado a 180 °C com carne e com batata. Os valores representados são médias de triplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Atendendo à figura 4-19, a percentagem de DPPH· que ficou por reagir, por exemplo, na amostra de AEV foi de 250%, o que significa que ficou por reagir uma quantidade de radical superior à que foi utilizada para a realização deste teste. Seria de se esperar precisamente o contrário, dado que para além do tocoferol, o azeite possui também polifenóis, o que contribui para uma diminuição e não um aumento da quantidade de DPPH· que ficou por reagir no extracto.

Com o intuito de se perceber qual ou quais o (s) composto (s) que poderiam contribuir para o aumento da % DPPH· que ficou por reagir, efectuou-se o teste deste radical com os padrões de α , β , γ e δ -tocoferol e ainda com o padrão do β -caroteno. No entanto, todos estes compostos apresentaram uma diminuição da intensidade da cor durante a reacção com a solução de DPPH· (Tabela 4-2), mas outros compostos não identificados, como as clorofilas, o esqualeno e outros carotenos poderão interferir na reacção.

Tabela 4-2: – Efeito anti-radicalar do DPPH' com os padrões de tocoferol e com o padrão do β -caroteno após vários tempos de reacção (15, 60 e 250 minutos).

Composto	t = 15 minutos ^{b)}		t = 60 minutos ^{b)}		t = 250 minutos ^{b)}	
	EC ₅₀ ^{a)}	No. de radicais reduzidos	EC ₅₀ ^{a)}	No. de radicais reduzidos	EC ₅₀ ^{a)}	No. de radicais reduzidos
α -tocoferol	0,25 ^a (\pm 0,01)	2,0	0,25 ^a (\pm 0,01)	2,0	0,24 ^a (\pm 0,01)	2,1
δ -tocoferol	0,31 ^b (\pm 0,01)	1,6	0,30 ^b (\pm 0,01)	1,6	0,30 ^b (\pm 0,01)	1,6
γ -tocoferol	0,42 ^c (\pm 0,01)	1,2	0,41 ^c (\pm 0,01)	1,2	0,40 ^c (\pm 0,01)	1,2
β -caroteno	0,36 ^c (\pm 0,04)	1,4	0,30 ^b (\pm 0,04)	1,6	-	-

Letras diferentes mostram amostras significativamente diferentes ($p < 0,05$)

^{a)} EC₅₀ expresso como mol de antioxidante / mol de radical DPPH.

^{b)} Média (\pm desvio padrão) de quatro determinações.

Os factos anteriormente verificados levam-nos a concluir que este método, usado na avaliação da capacidade antioxidante dos extractos de tocoferol do azeite não é o mais adequado, uma vez que a probabilidade de se formarem compostos que absorvem ao mesmo comprimento de onda que o radical, poderá conduzir a falsos resultados. O método da estufa de Schaal teria sido o mais indicado para avaliar a contribuição do poder antioxidante dos dois tipos de extracto obtidos, mas devido à sua reduzida quantidade, não foi possível a utilização deste método.

2ª PARTE

4.2. Avaliação da estabilidade de azeites após o processamento, a 100 °C, na presença de água e de alimentos (“SOPAS”)

4.2.1. DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DOS AZEITES ESTUDADOS

Os azeites extra-virgem (AEV) e azeite (A) estudados na segunda parte deste trabalho mostraram possuir as seguintes características (tabela 4-3):

Tabela 4-3: Características dos AEV e A. * Estes valores foram retirados dos rótulos das respectivas garrafas de azeite.

	AEV	A
Acidez* (%)	0,3	≤ 1
Índice de peróxidos * (meq peróxido / kg)	≤ 20	≤ 15
C16:0	16,2	13,0
C16:1	0,9	0,8
C18:0	3,3	3,8
C18:1	69,1	73,0
C18:2 (9,12)	8,8	7,0
C18:3 (9,12,15)	0,6	0,6

4.2.2. AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA DEGRADAÇÃO DOS POLIFENÓIS

A identificação dos polifenóis presentes nas amostras de azeite foi baseada na análise cromatográfica da solução de padrões fenólicos realizada na 1ª parte deste trabalho (figura 4-1).

Tal como na 1ª parte deste trabalho, determinou-se a quantidade total de polifenóis nas amostras de azeite extra-virgem (AEV) e de azeite (A), assim como as quantidades de ácidos fenólicos, lignanos e secoiridóides presentes nas fases oleosa e aquosa das mesmas (figuras 4-20 a 4-31).

Antes de se proceder a uma análise mais minuciosa dos compostos fenólicos dos azeites em estudo nesta parte do trabalho, podemos observar na figura 4-20 a composição fenólica de ambos os azeites antes do processamento.



Figura 4-20 : Cromatograma dos extractos fenólicos dos azeites extra-virgem (AEV) e azeite (A).

De acordo com o cromatograma apresentado, podemos observar que o AEV possui uma quantidade de polifenóis superior à do A.

Após o processamento a 100 °C verifica-se a perda de uma pequena quantidade destes antioxidantes nas amostras de azeite processadas sem alimentos. Contudo, nas amostras em que estes estavam presentes, essa perda foi muito maior (figura 4-21):

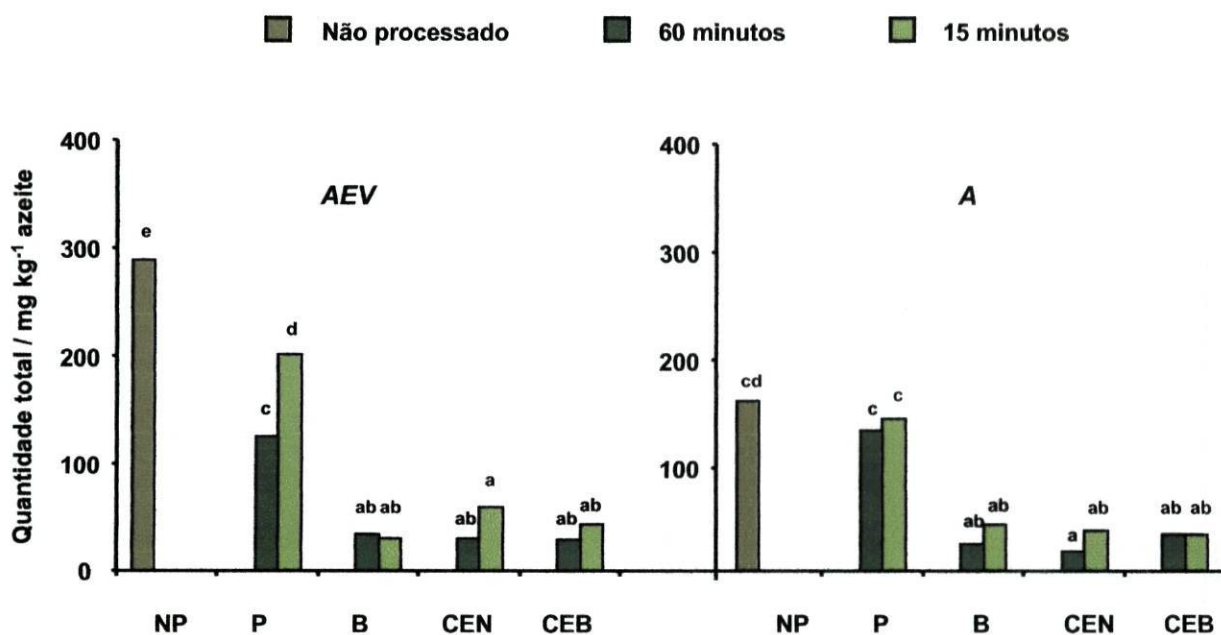


Figura 4-21 : Quantidade de polifenóis totais nas amostras, em mg kg^{-1} azeite. Para o seu cálculo, utilizou-se uma massa molar média de 320 g mol^{-1} . As letras NP, P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite não processado, processado a 100°C , processado a 100°C com batata, com cenoura e com cebola. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

É ainda possível observar que as amostras às quais o azeite foi adicionado apenas a 15 minutos do fim não sofreram tantas alterações, comparativamente às amostras em que o azeite foi adicionado no início do processamento. No entanto, essas diferenças não foram, na maior parte dos casos, significativas.

O aumento da degradação dos compostos fenólicos poderá ter sido causado pelo aumento do pH das amostras (figura 4-22). Estudos efectuados já demonstraram que a estabilidade dos polifenóis diminui com o aumento do pH ^[117].

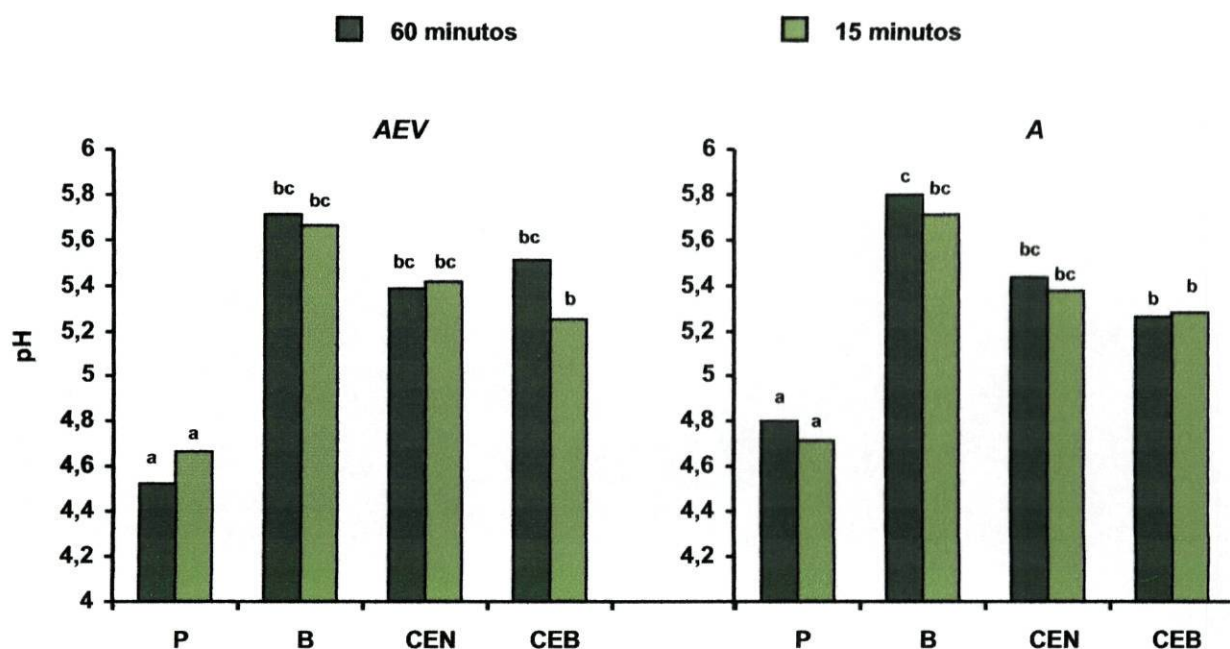


Figura 4-22 : pH das fases aquosas das amostras de AEV e A. As letras P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite não processado, processado a 100 °C, processado a 100 °C com batata, com cenoura e com cebola. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Dado que existem polifenóis com um certo carácter lipofílico, houve necessidade de se discriminar a quantidade total destes compostos existentes nas fases oleosa (figura 4-23) e aquosa (figura 4-24) das amostras, observando deste modo o comportamento destes antioxidantes no sistema estudado (O/A).

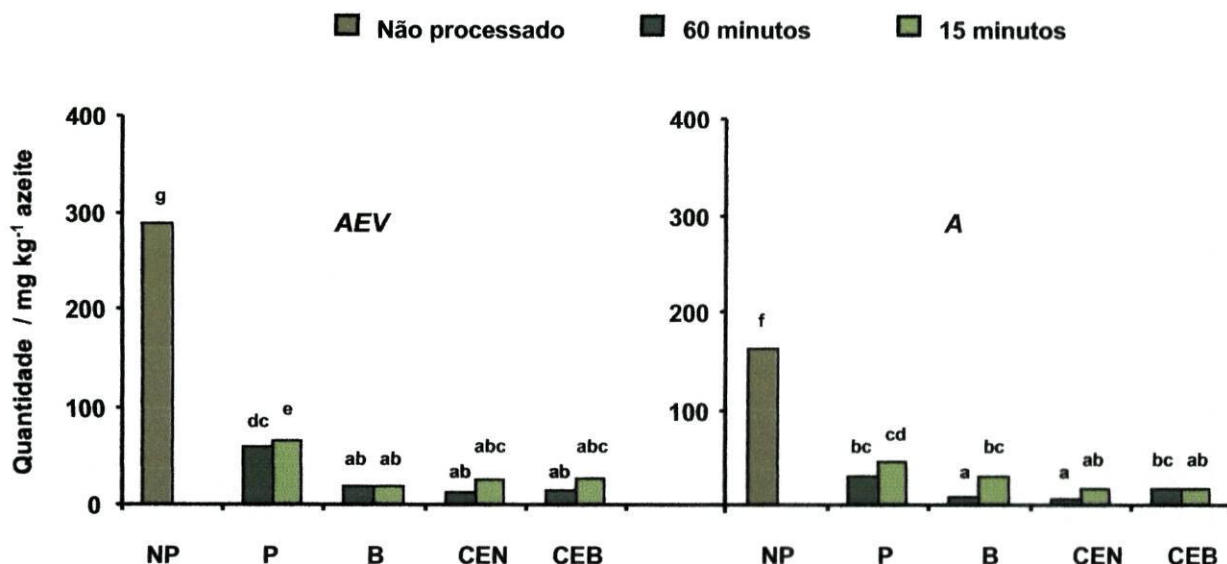


Figura 4-23 : Quantidade de polifenóis na fase oleosa das amostras, em mg kg^{-1} azeite. Para o seu cálculo, utilizou-se uma massa molar média de 320 g mol^{-1} . As letras NP, P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite não processado, processado a $100 \text{ }^\circ\text{C}$, processado a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ com batata, com cenoura e com cebola. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

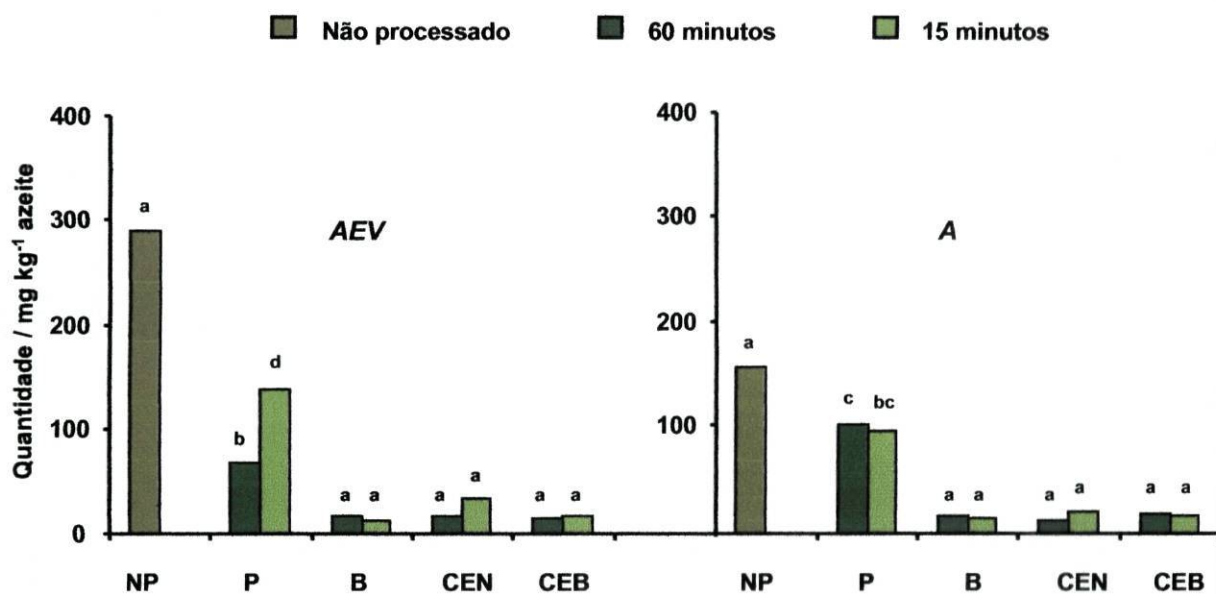


Figura 4-24 : Quantidade de polifenóis na fase aquosa das amostras, em mg kg^{-1} azeite. Para o seu cálculo, utilizou-se uma massa molar média de 320 g mol^{-1} . As letras NP, P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite não processado, processado a $100 \text{ }^\circ\text{C}$, processado a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ com batata, com cenoura e com cebola. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Comparando as figuras 4-23 e 4-24 pode verificar-se que uma quantidade considerável de polifenóis, sobretudo nas amostras processadas sem alimentos, migrou da fase oleosa para a fase aquosa, o que prova que a maioria destes compostos possuem um carácter hidrofílico. A quantidade de polifenóis dos azeites não processados representados na figura 4-24 (fase aquosa) está presente apenas para uma melhor comparação entre a quantidade existente inicialmente na fase oleosa e a que passou para a fase aquosa.

ÁLCOOIS FENÓLICOS:

HyTy

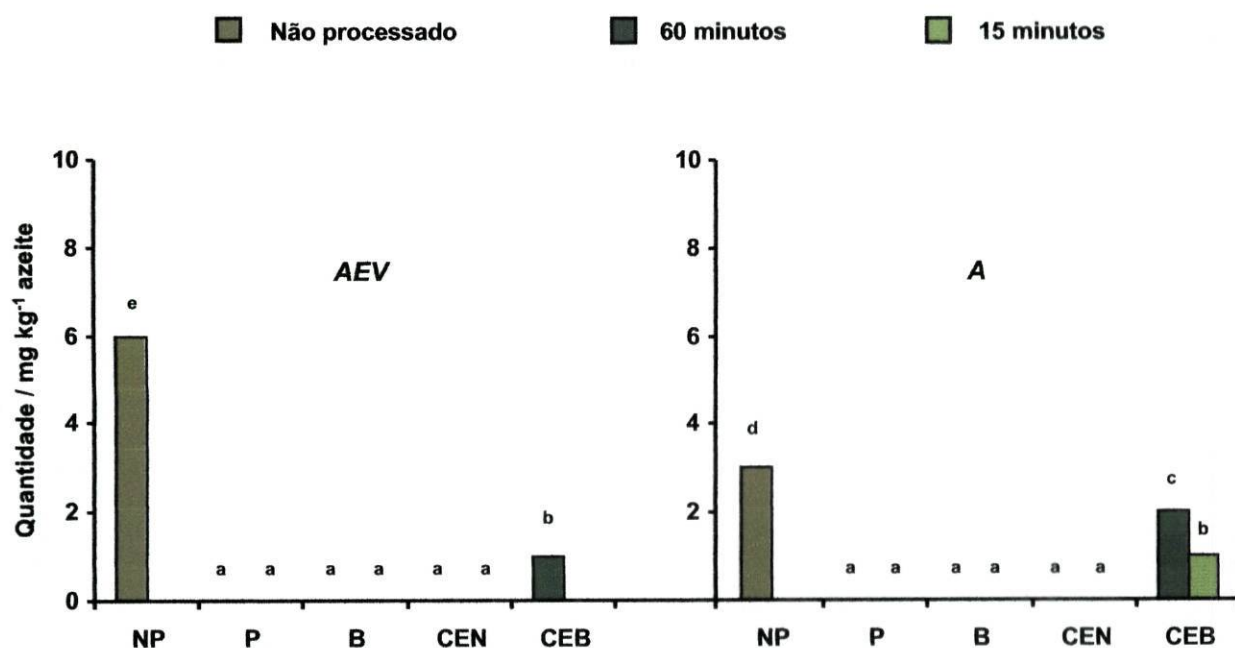


Figura 4-25 : Quantidade de *HyTy*, em mg kg⁻¹ azeite. As letras P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite processado a 100 °C, processado a 100 °C com batata, com cenoura e com cebola. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Na figura 4-25 pode observar-se que a quantidade de hidroxitirosol (*HyTy*) é fortemente afectada pelo processamento, independentemente do tempo a que o azeite foi submetido. À excepção das amostras que continham cebola, todas as outras ficaram completamente desprovidas deste composto fenólico.

Ty

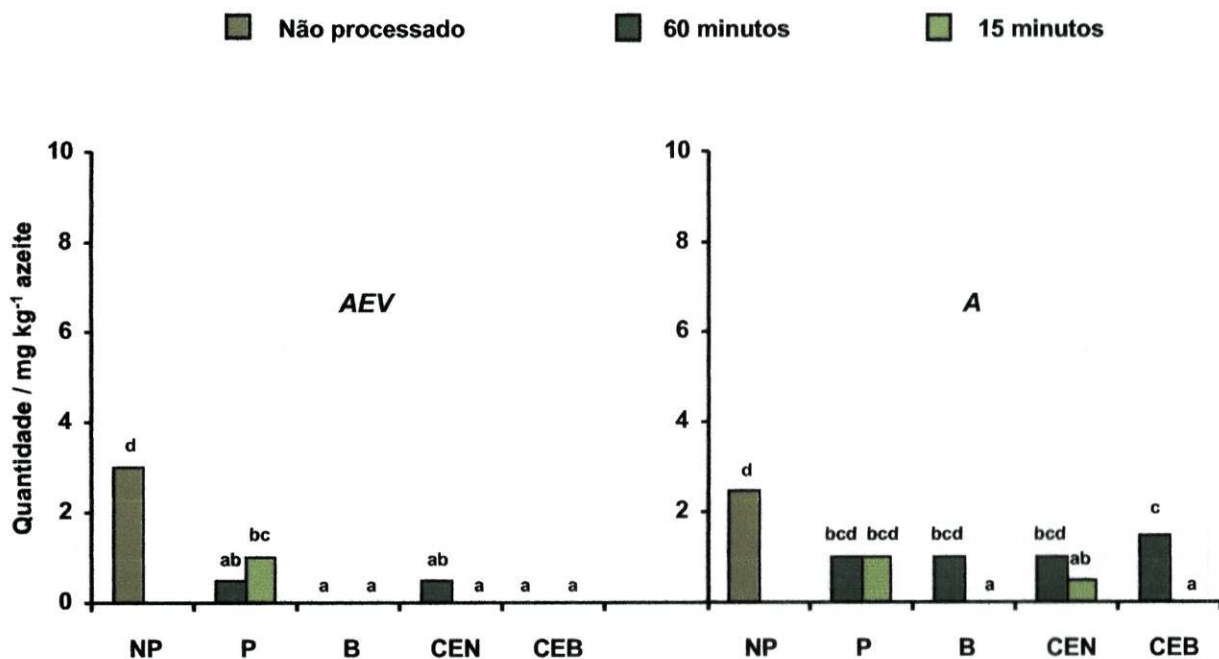


Figura 4-26 : Quantidade de Ty , em $mg\ kg^{-1}$ azeite. As letras P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite processado a $100\ ^\circ C$, processado a $100\ ^\circ C$ com batata, com cenoura e com cebola. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A figura 4-26 permite-nos avaliar de que forma é que o processamento afectou o teor em tirosol (Ty) nas amostras. Assim, pode dizer-se que essa concentração era praticamente igual em ambos os azeites não processados e que após o processamento as amostras do AEV foram mais afectadas relativamente às de A.

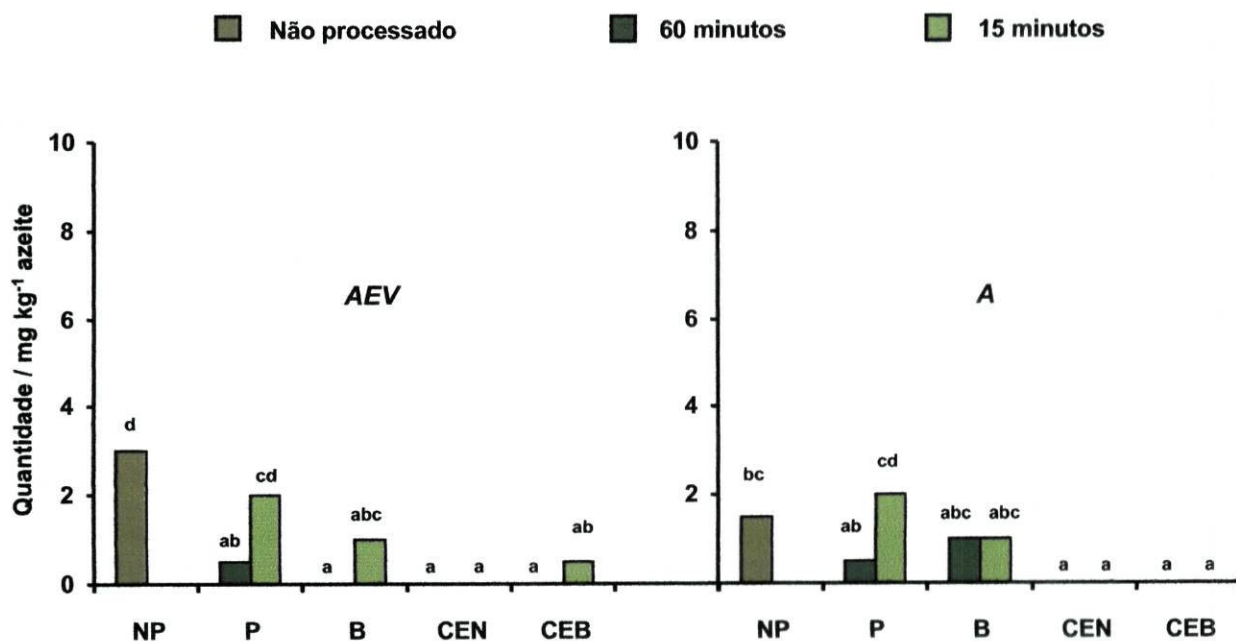
HyTyAc

Figura 4-27 : Quantidade de *HyTyAc*, em mg kg⁻¹ azeite. As letras P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite processado a 100 °C, processado a 100 °C com batata, com cenoura e com cebola. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A quantidade de acetato de hidroxitirosol (*HyTyAc*) encontra-se representada na figura 4-27. Tal como o *HyTy* e o *Ty*, o *HyTyAc* também é afectado com o processamento, sobretudo as amostras que continham cenoura e cebola.

Após a observação das 3 figuras referentes às quantidades de álcoois fenólicos, podemos concluir que o *HyTy* é o álcool presente em maior abundância em ambos os azeites antes do processamento. No entanto, e apesar deste processo conduzir a uma redução destes compostos fenólicos, este foi o que sofreu alterações mais significativas. O *Ty* mostrou ser o álcool fenólico menos afectado. Nos 3 casos, a presença de alimentos parece contribuir para uma maior destruição destes polifenóis.

LIGNANOS:

Py

Ao contrário dos azeites estudados na 1ª parte deste trabalho, estes possuem apenas o pinoresinol (*Py*) como lignano na sua composição, antes e após o processamento (figura 4-28).

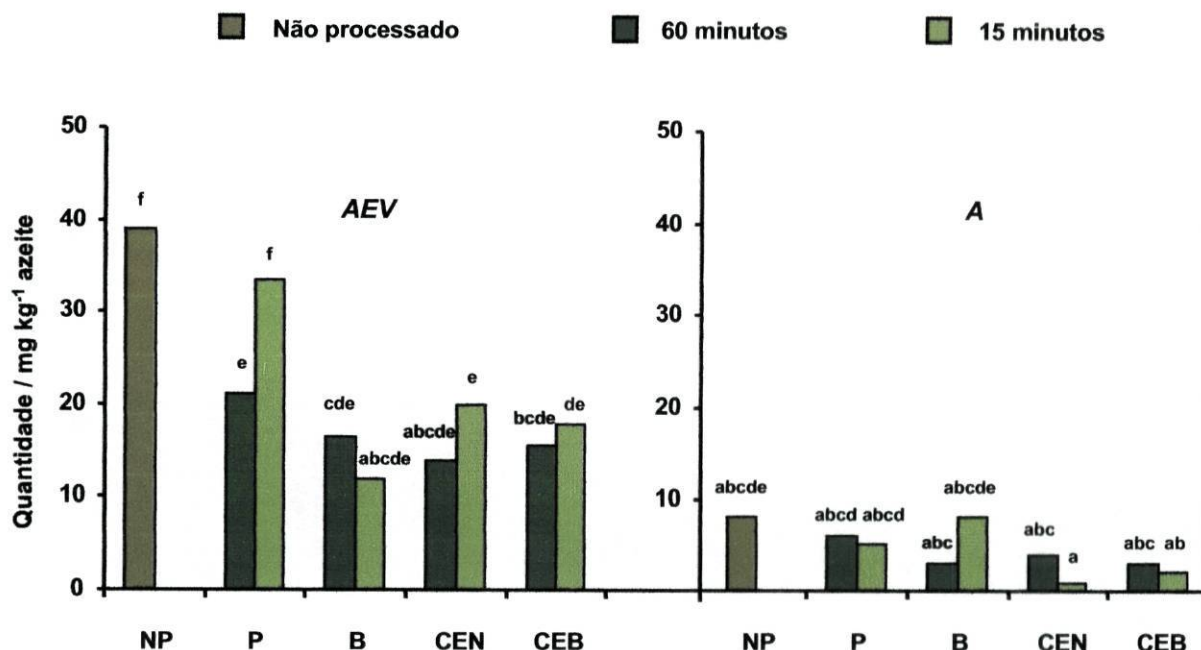


Figura 4-28 : Quantidade de *Py*, em mg kg⁻¹ azeite. As letras P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite processado a 100 °C, processado a 100 °C com batata, com cenoura e com cebola. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Analisando a figura 4-28, podemos verificar novamente, que a quantidade de *Py* tanto no AEV como no A diminui após o processamento, alteração essa mais visível nas amostras que continham alimentos. No entanto, a amostra processada sem alimentos do AEV sofreu uma redução significativa na concentração deste lignano, aquando a adição do azeite logo no início do processamento. Apesar da sua quantidade ter sido afectada pelo processamento, este composto mostrou, de um modo geral, uma maior estabilidade relativamente aos álcoois fenólicos.

SECOIRIDÓIDES:

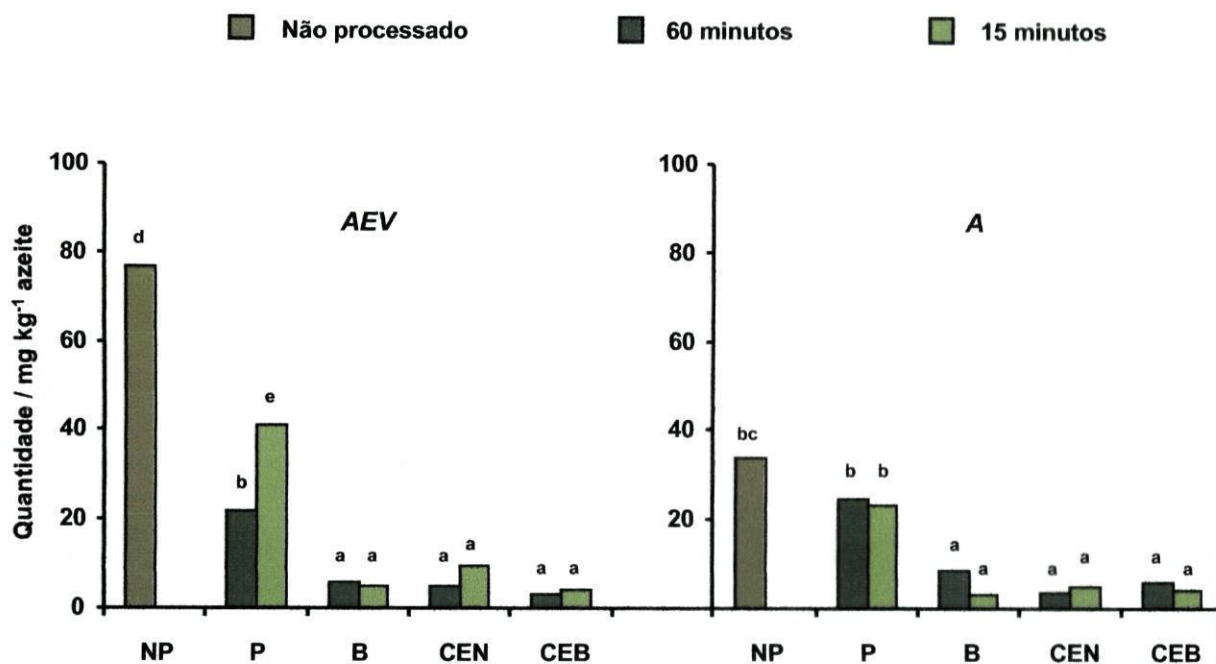
HyTy-EDA

Figura 4-29 : Quantidade de *HyTy-EDA*, em mg kg⁻¹ azeite. As letras P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite processado a 100 °C, processado a 100 °C com batata, com cenoura e com cebola. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

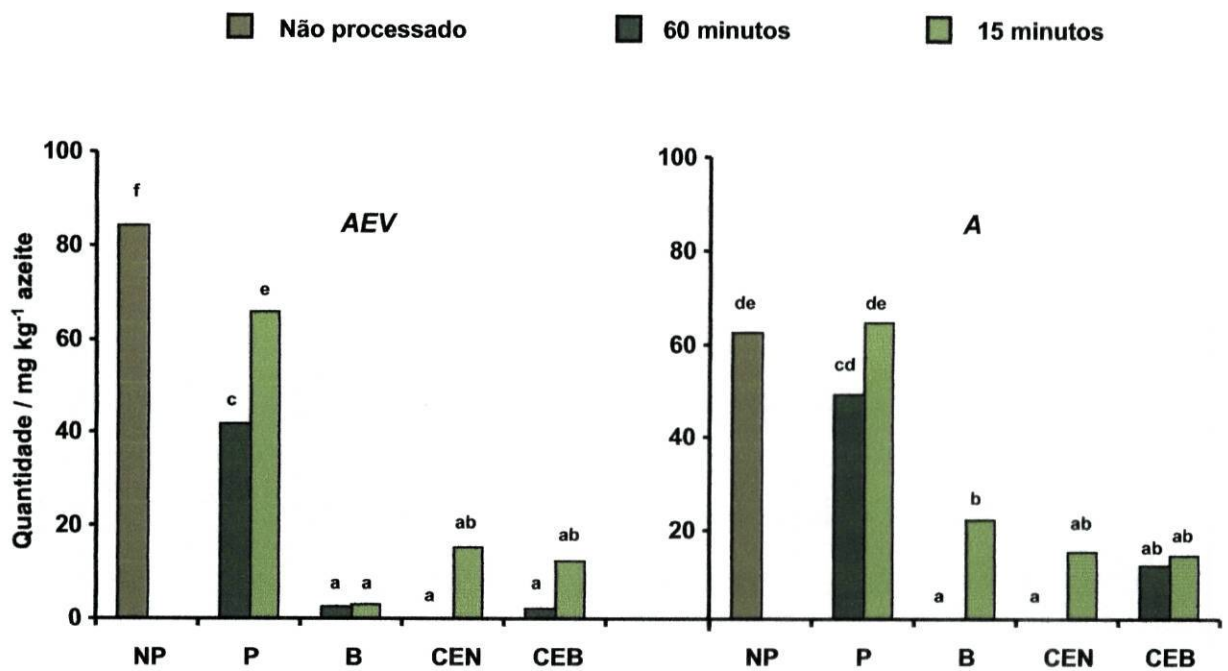
HyTy-EA

Figura 4-30 : Quantidade de *HyTy-EA*, em mg kg⁻¹ azeite. As letras P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite processado a 100 °C, processado a 100 °C com batata, com cenoura e com cebola. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

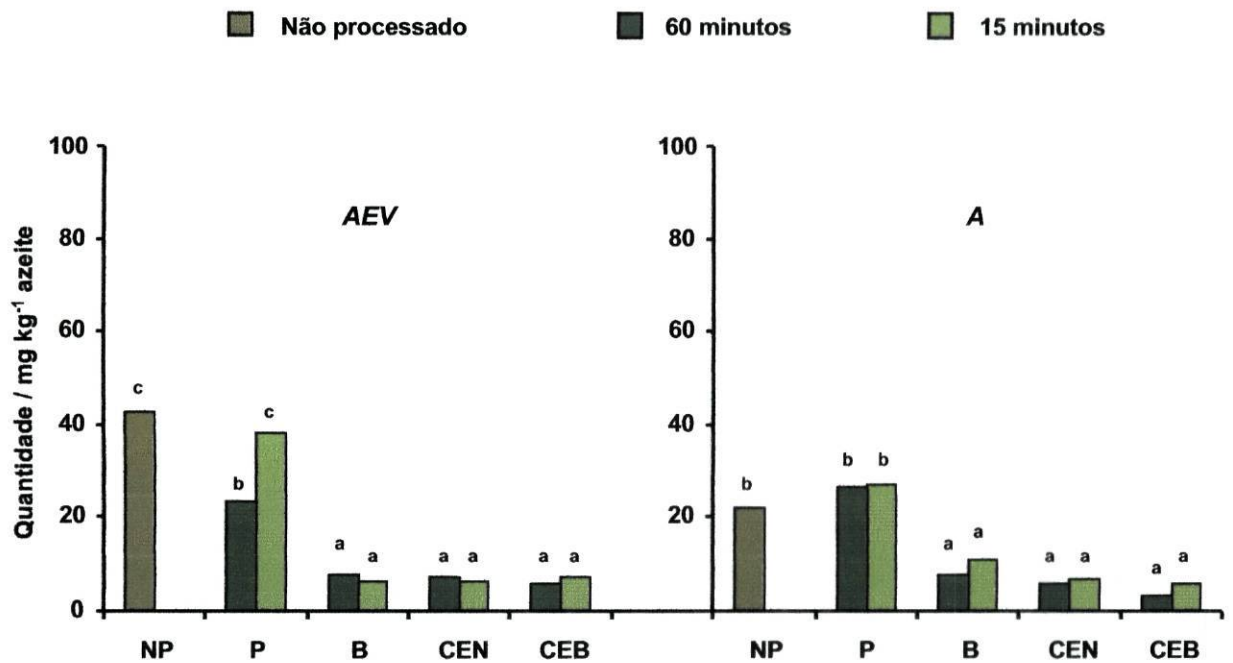
Ty-EDA

Figura 4-31 : Quantidade de Ty-EDA, em mg kg⁻¹ azeite. As letras P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite processado a 100 °C, processado a 100 °C com batata, com cenoura e com cebola. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

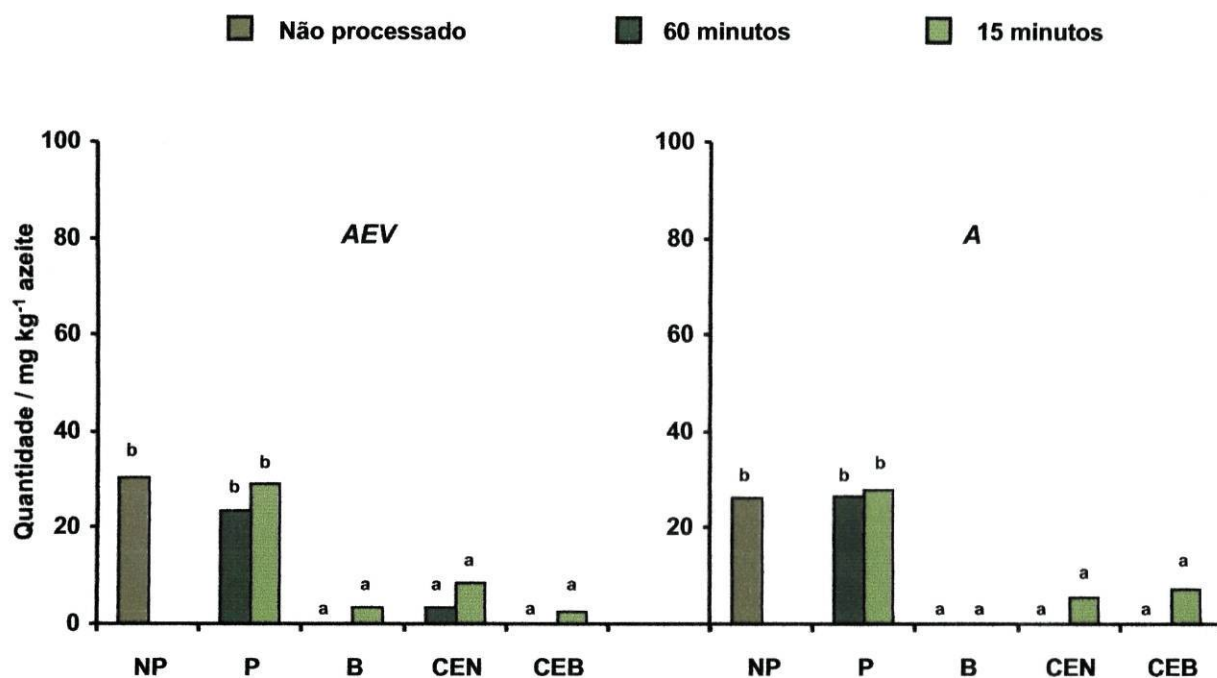
Ty-EA

Figura 4-32 : Quantidade de Ty-EA, em mg kg⁻¹ azeite. As letras P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite processado a 100 °C, processado a 100 °C com batata, com cenoura e com cebola. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes para a mesma cor ($p < 0,05$).

Analisando os gráficos relativos aos secoiridóides (figuras 4-28 a 4-32) presentes nas amostras de AEV e de A, verificou-se que os derivados do HyTy (HyTy-EDA e HyTy-EA) existem em maior quantidade relativamente ao secoiridóides derivados de Ty (Ty-EDA e Ty-EA). Observando ainda estas figuras, podemos, mais uma vez, verificar que o processamento afectou bastante estes compostos fenólicos, sobretudo os derivados do HyTy nas amostras providas de alimentos. As amostras de AEV e A processadas na ausência destes não foram tão afectadas. Apesar das diferenças não serem significativas, as amostras em que o azeite foi adicionado a 15 minutos do fim do processamento revelaram ser um pouco melhores do que aquelas em que o óleo foi adicionado logo no início do processamento.

À semelhança do que aconteceu na 1ª parte deste trabalho, durante a análise dos cromatogramas das várias amostras de AEV e de A, foram igualmente detectados os 2 compostos desconhecidos. No entanto, desta vez, em quantidade superior. A sua quantificação encontra-se nas figuras seguintes (figuras 4-32 a 4-37).

Composto 1:

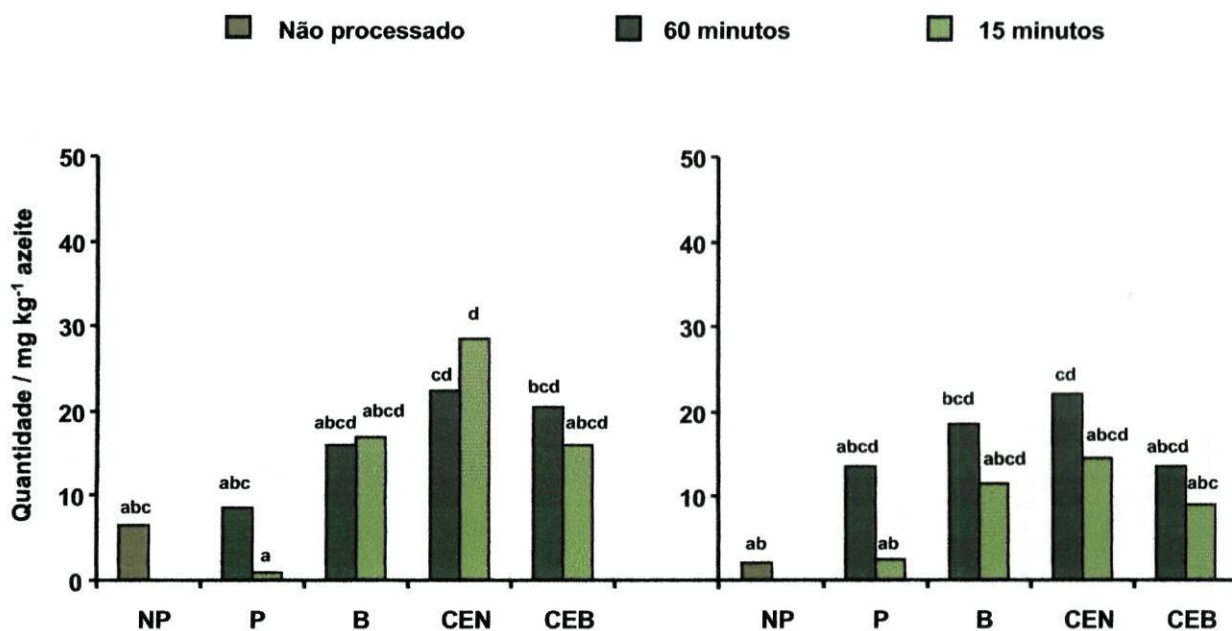


Figura 4-33 : Quantidade de composto desconhecido 1, em mg kg^{-1} azeite. As letras P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite processado a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, processado a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ com batata, com cenoura e com cebola. Para o seu cálculo, utilizou-se uma massa molar de 242 g mol^{-1} . Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Atendendo à figura 4-33, podemos verificar que antes do processamento, as amostras de AEV e A possuem uma pequena quantidade do composto 1, identificado anteriormente (4.1.2.3) como sendo um derivado do ácido elenólico. À semelhança do sucedido na primeira parte deste trabalho, após o processamento das amostras a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, essa quantidade aumenta consideravelmente, sobretudo nas amostras que continham alimentos. Analisou-se ainda a quantidade deste composto existente em cada uma das fases. Os resultados estão representados nas figuras 4-34 e 4-35.

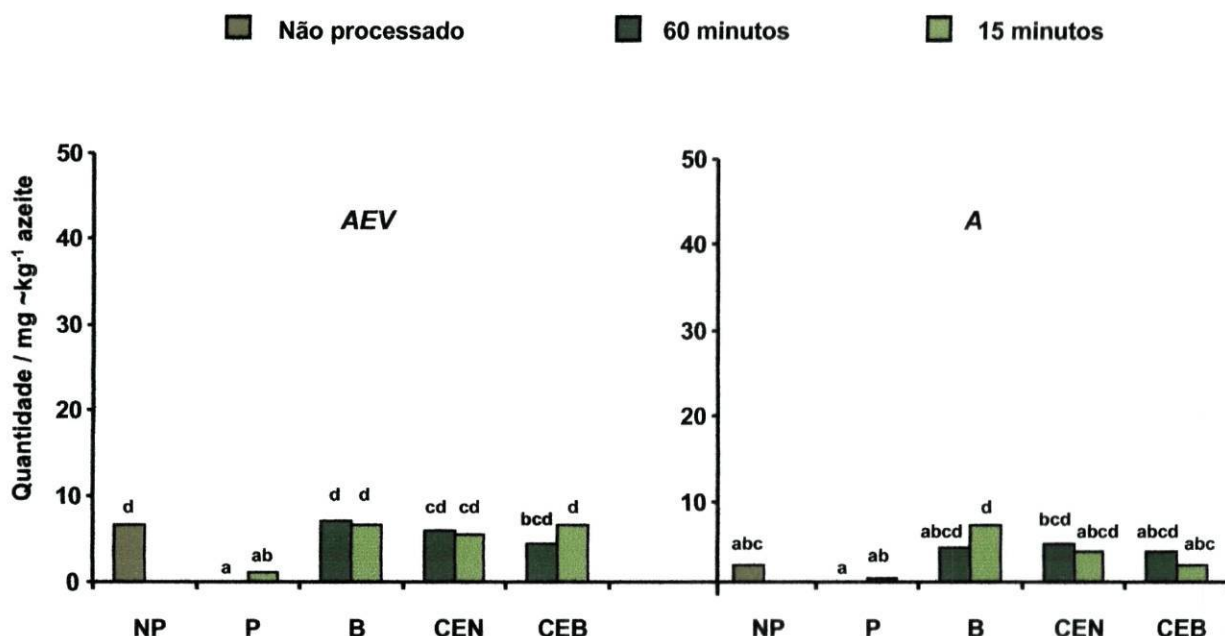


Figura 4-34 : Quantidade de composto desconhecido 1 na fase oleosa das amostras, em mg kg⁻¹ azeite. As letras P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite processado a 100 °C, processado a 100 °C com batata, com cenoura e com cebola. Para o seu cálculo, utilizou-se uma massa molar de 242 g mol⁻¹. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes (p < 0,05).

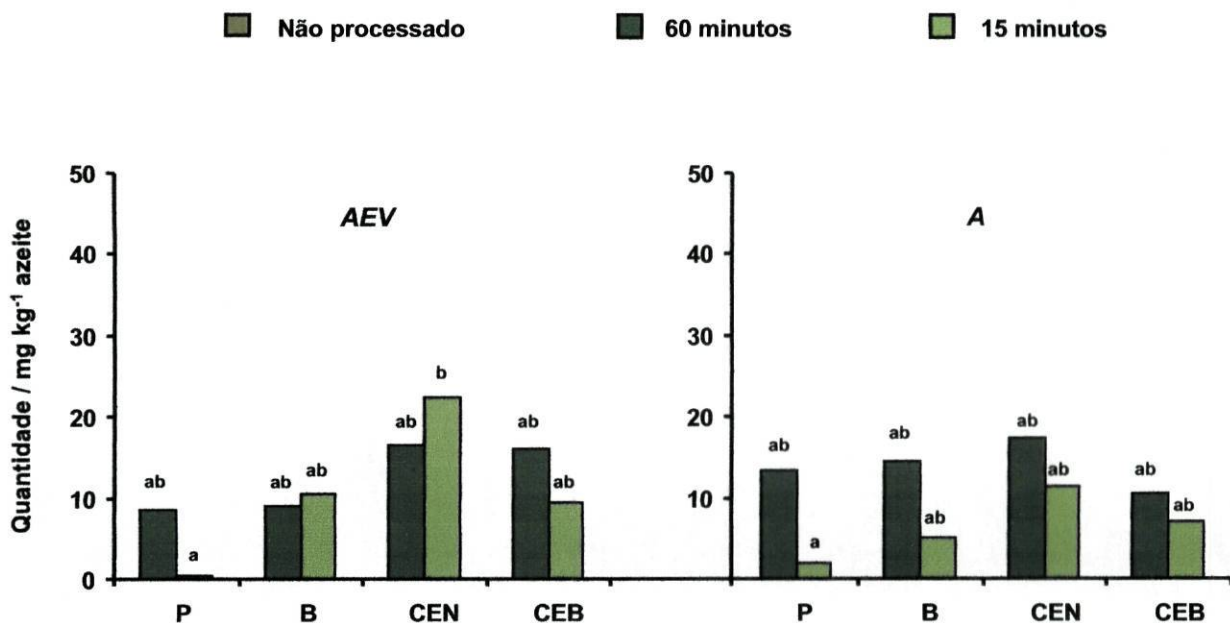


Figura 4-35 : Quantidade de composto desconhecido 1 na fase aquosa das amostras, em mg kg⁻¹ azeite. As letras P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite processado a 100 °C, processado a 100 °C com batata, com cenoura e com cebola. Para o seu cálculo, utilizou-se uma massa molar de 242 g mol⁻¹. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes (p < 0,05).

Os gráficos 4-34 e 4-35 revelam-nos que o composto 1 tem preferência pela fase aquosa, o que nos mostra o seu carácter mais hidrofílico.

Comparando os resultados obtidos em ambas as partes deste trabalho, referentes à quantificação do composto 1 (figuras 4-7 e 4-33), podemos verificar que a presença da água pareceu contribuir para o aumento da concentração deste. Tal facto pode dever-se à hidrólise dos secoiridóides favorecida pela água.

Composto desconhecido 2:

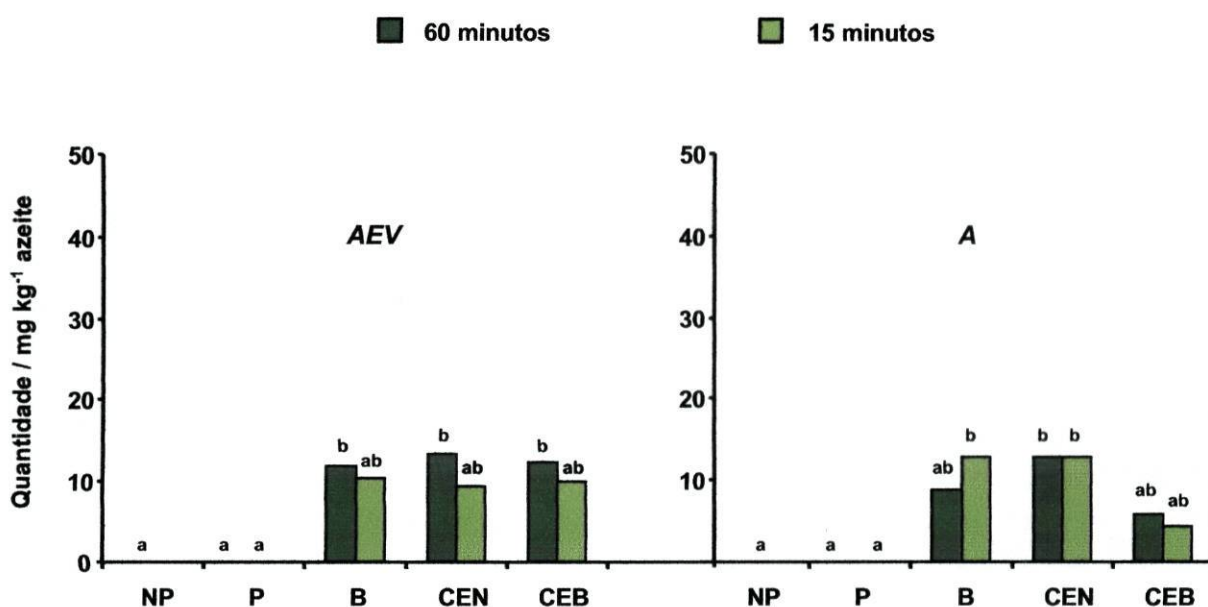


Figura 4-36 : Quantidade de composto desconhecido 2, em mg kg⁻¹ azeite. As letras NP, P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite não processado, processado a 100 °C, processado a 100 °C com batata, com cenoura e com cebola. Para o seu cálculo, utilizou-se uma massa molar média de 320 g mol⁻¹. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A figura 4-36 representa a quantidade total de composto desconhecido 2 (fase oleosa + fase aquosa). Nas figuras seguintes (4-37 e 4-38) podemos observar com mais pormenor a afinidade deste composto com cada uma das fases.

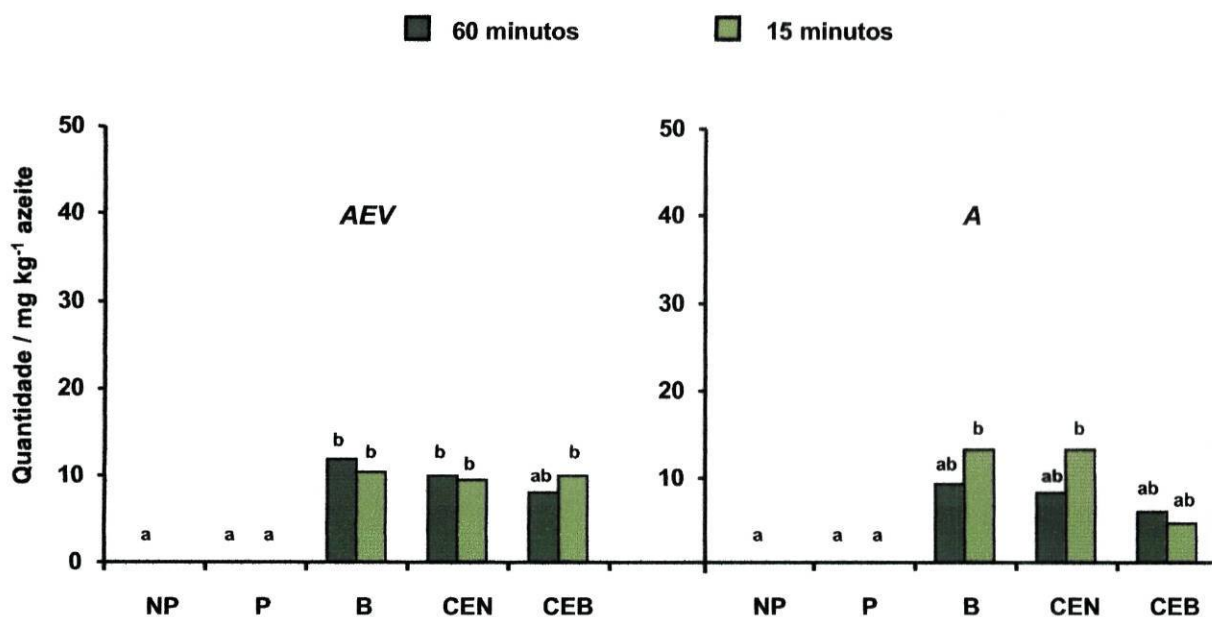


Figura 4-37 : Quantidade de composto desconhecido 2 na fase oleosa das amostras, em mg kg⁻¹ azeite. As letras NP, P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite não processado, processado a 100 °C, processado a 100 °C com batata, com cenoura e com cebola. Para o seu cálculo, utilizou-se uma massa molar média de 320 g mol⁻¹. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

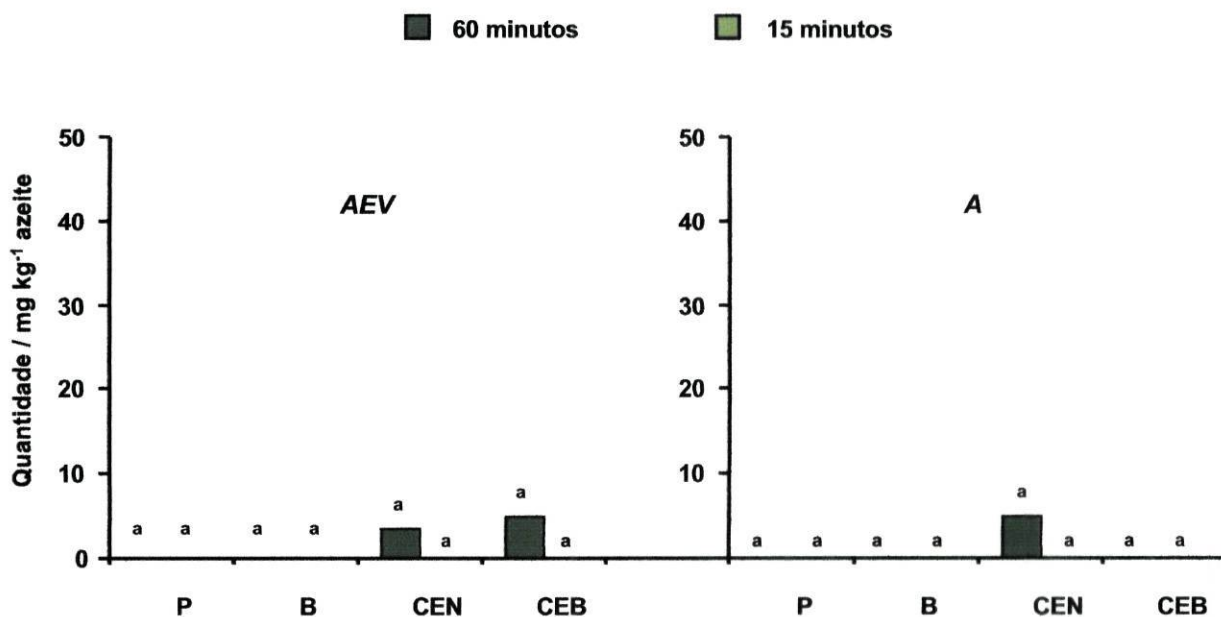


Figura 4-38 : Quantidade de composto desconhecido 2 na fase aquosa das amostras, em mg kg⁻¹ azeite. As letras P, B, CEN e CEB correspondem, respectivamente, às amostras de azeite processado a 100 °C, processado a 100 °C com batata, com cenoura e com cebola. Para o seu cálculo, utilizou-se uma massa molar média de 320 g mol⁻¹. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Atendendo às figuras supra representadas, o composto desconhecido 2 apresenta um carácter mais lipofílico, uma vez que a maior parte ficou retida nas fases oleosas das amostras. Um dado curioso, é que este composto permanece ausente nas amostras de azeite não processado e processado sem alimentos, formando-se apenas na presença destes. Uma análise mais profunda terá que ser realizada para a descoberta da sua identificação, o que não foi possível até agora devido à falta de tempo.

4.2.3. DETERMINAÇÃO DO α -TOCOFEROL NAS AMOSTRAS DE AZEITE

Na figura 4-39 encontram-se representados os valores obtidos de α -tocoferol presentes nas várias amostras de AEV e A.

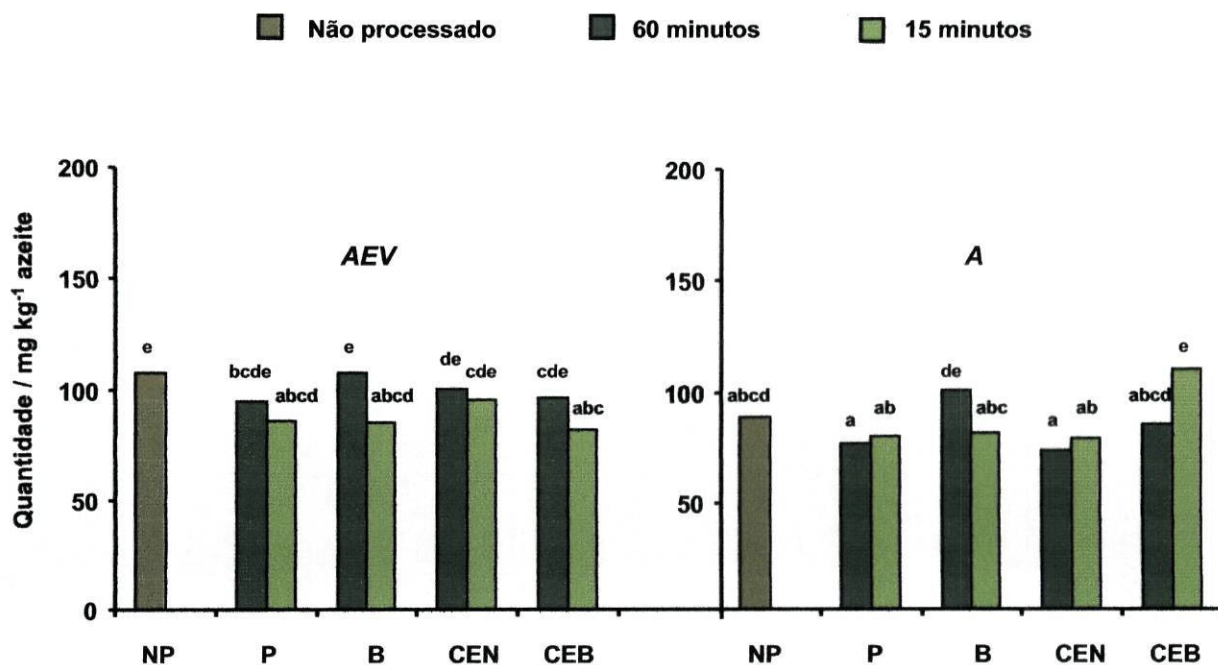


Figura 4-39 : Quantidade de α -tocoferol nas amostras, em mg kg⁻¹ azeite. As letras NP, P, B, CEN e CEB correspondem às amostras de azeite não processado, processado, com batata, com cenoura e com cebola. Os valores representados são médias de duplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Como podemos observar, a concentração de α -tocoferol existente nas amostras de azeite não sofreu alterações muito significativas com o processamento a 100 °C. Os tocoferóis parecem suportar melhor esta temperatura, relativamente aos polifenóis. As amostras contendo AEV, independentemente do seu tempo de processamento (60 ou 15 minutos), possuem uma quantidade superior comparativamente às amostras de A. O facto de haver amostras processadas com alimentos (ACEB15) com uma concentração um pouco superior à concentração inicial, pode ser explicada pela presença deste tipo de antioxidantes nos vegetais, que poderão ter passado para a fase oleosa das amostras.

4.2.4. AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA DOS AEV e A APÓS O PROCESSAMENTO, A 100 °C

Como já foi referido anteriormente, o teste dos dienos conjugados realizado às várias amostras de azeite permite-nos verificar a existência de hidroperóxidos nas mesmas. A determinação do índice de *p*-anisidina identifica a presença de compostos secundários de oxidação.

Nas tabelas 4-4 e 4-5 apresentam-se, respectivamente, a variação da percentagem dos dienos conjugados e do índice de *p*-anisidina das várias amostras de azeite logo após o processamento, a 100 °C.

Tabela 4-4: Variação da percentagem de dienos conjugados ($\Delta\%DC$) das amostras de AEV e de A logo após o processamento, a 100 °C.

	60 minutos	15 minutos
AEVP	-0,01	-0,03
AEVB	0,05	-0,01
AEVCEN	0,00	-0,03
AEVCEB	-0,04	-0,03
<hr/>		
AP	0,01	0,02
AB	0,00	-0,02
ACEN	-0,01	0,01
ACEB	0,01	-0,02

Tabela 4-5: Variação do índice de *p*-anisidina (ΔIA) das amostras de AEV e de A logo após o processamento, a 100 °C.

	60 minutos	15 minutos
AEVP	-2,88	-5,09
AEVB	-4,64	-4,15
AEVCEN	-4,88	-4,73
AEVCEB	-4,66	-4,08
<hr/>		
AP	-3,01	-2,93
AB	-3,34	-3,77
ACEN	-2,89	-3,04
ACEB	-2,90	-2,34

Atendendo aos valores apresentados nas tabelas 4-4 e 4-5, podemos verificar a estabilidade oxidativa de todas as amostras de azeite, logo após o seu processamento, a 100 °C.

4.2.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRACTOS FENÓLICOS DAS AMOSTRAS DE AZEITE APÓS O PROCESSAMENTO, A 100 °C

Para se avaliar a capacidade antioxidante total ainda existente nos extractos do azeite após o processamento, a 100 °C recorreu-se, novamente, ao teste da estufa de Schaal. Determinou-se igualmente a capacidade anti-radicalar do extracto polifenólico das fases aquosa e oleosa do azeite, usando o teste de DPPH[•].

4.2.5.1. Teste da Estufa de Schaal ("Schaal Oven Test")

- Determinação do conteúdo em dienos conjugados:

Na figura 4-39 encontram-se os resultados da variação da percentagem dos dienos conjugados das várias amostras de azeite, desde os 0 dias (logo após o processamento a 100 °C) até aos 70 dias na estufa a 60 °C (2 meses + 10 dias).

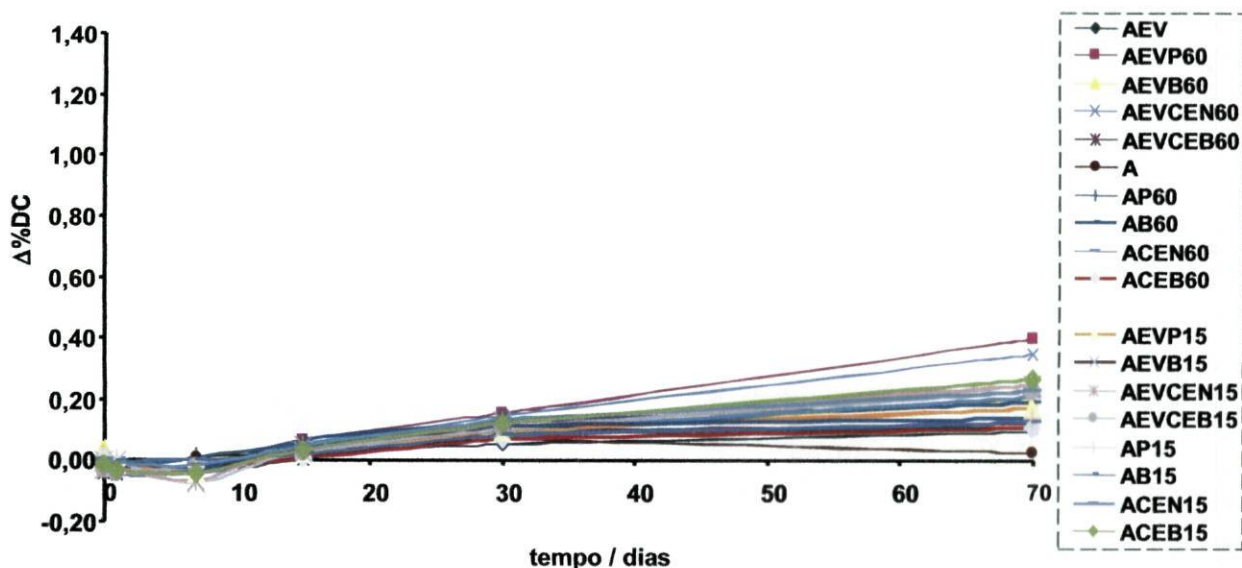


Figura 4-40 : Variação da percentagem de dienos conjugados das amostras de AEV e de A desde os 0 até aos 70 dias na estufa a 60°C.

Observando a figura 4-40, podemos verificar que logo após o processamento a 100 °C todas as amostras estudadas não se encontravam oxidadas. Esta estabilidade oxidativa manteve-se até o fim de 70 dias de armazenamento na estufa a 60 °C, visto que, até à altura, não existiram diferenças muito significativas na variação da percentagem de dienos conjugados. Infelizmente, o teste não pôde ser continuado devido à quantidade insuficiente de amostra, resultante das várias análises efectuadas ao longo deste período.

- Determinação do índice de *p*-anisidina:

O teste da *p*-anisidina também foi realizado às várias amostras em estudo. Os resultados obtidos experimentalmente estão representados na figura 4-41.

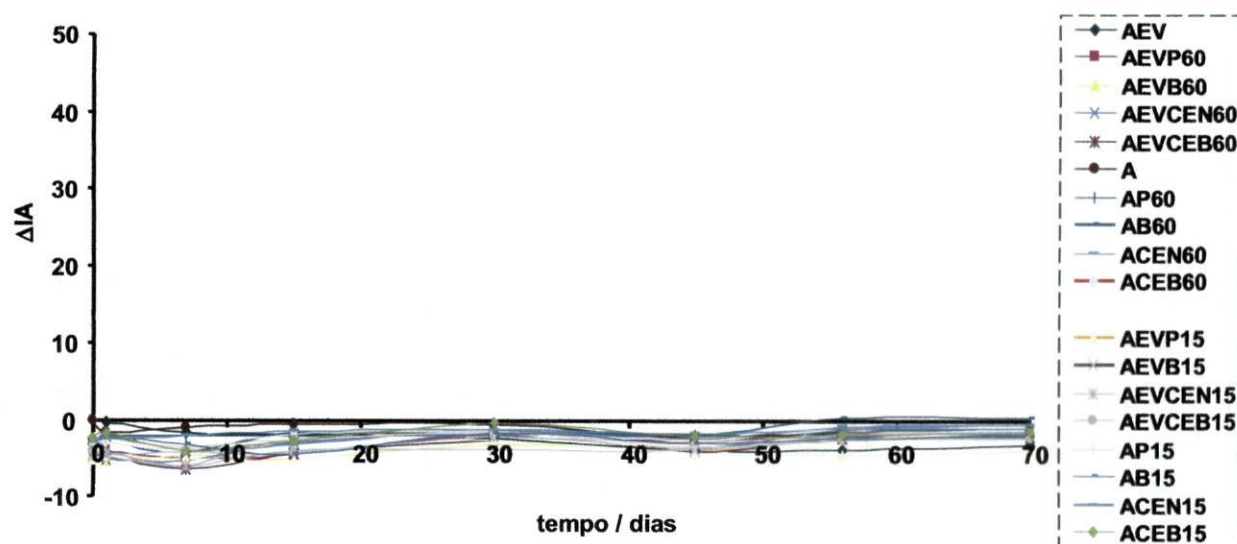


Figura 4-41 : Variação do índice de *p*-anisidina (IA) das amostras de AEV a A desde os 0 até aos 70 dias na estufa a 60°C.

Atendendo à figura, podemos confirmar a estabilidade oxidativa das amostras ao fim de 70 dias na estufa a 60 °C, revelada anteriormente pelo teste dos dienos conjugados. Deste modo, podemos ficar com a ideia da elevada capacidade anti-radicalar das várias amostras, mesmo após 70 dias de armazenamento na estufa a 60 °C.

4.2.5.2. Teste de DPPH[•]

As figuras 4-42 e 4-43 mostram-nos as alterações da actividade antioxidante dos extractos fenólicos do azeite nas fases oleosa e aquosa das amostras, analisadas pelo teste de DPPH[•] ao fim de 15 minutos de reacção.

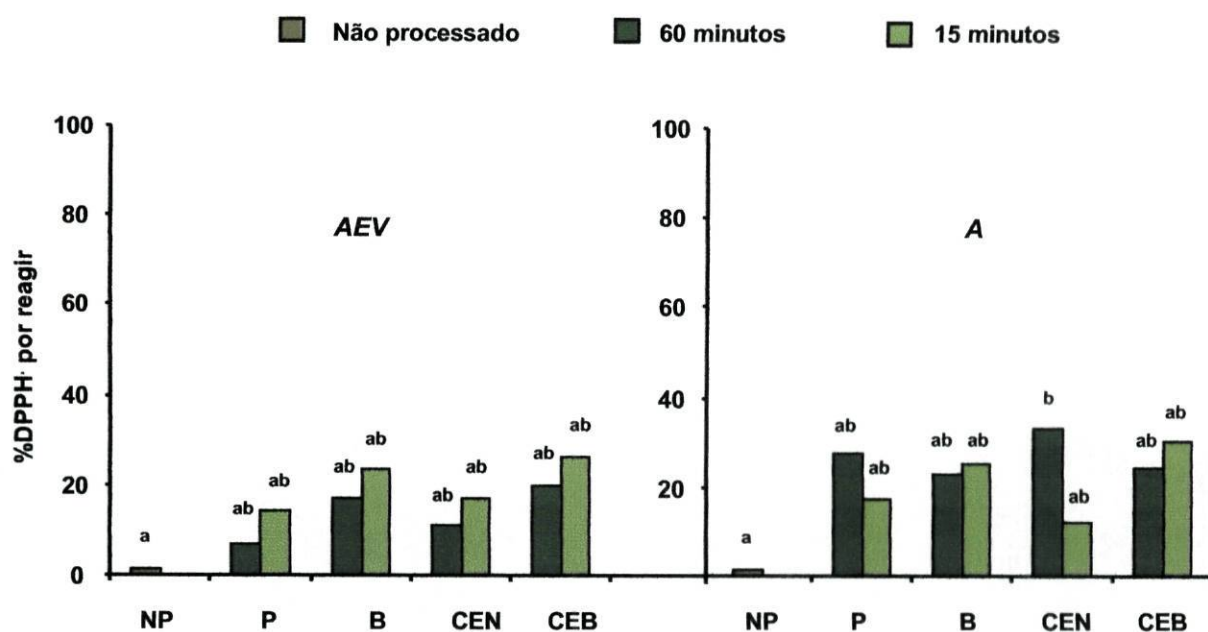


Figura 4-42 : Percentagem de *DPPH por reagir nos extractos fenólicos das fases oleosas* das amostras ao fim de 15 minutos de reacção. As letras P, B, CEN e CEB correspondem às amostras de azeite processado, com batata, com cenoura e com cebola. Os valores representados são médias de quadruplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

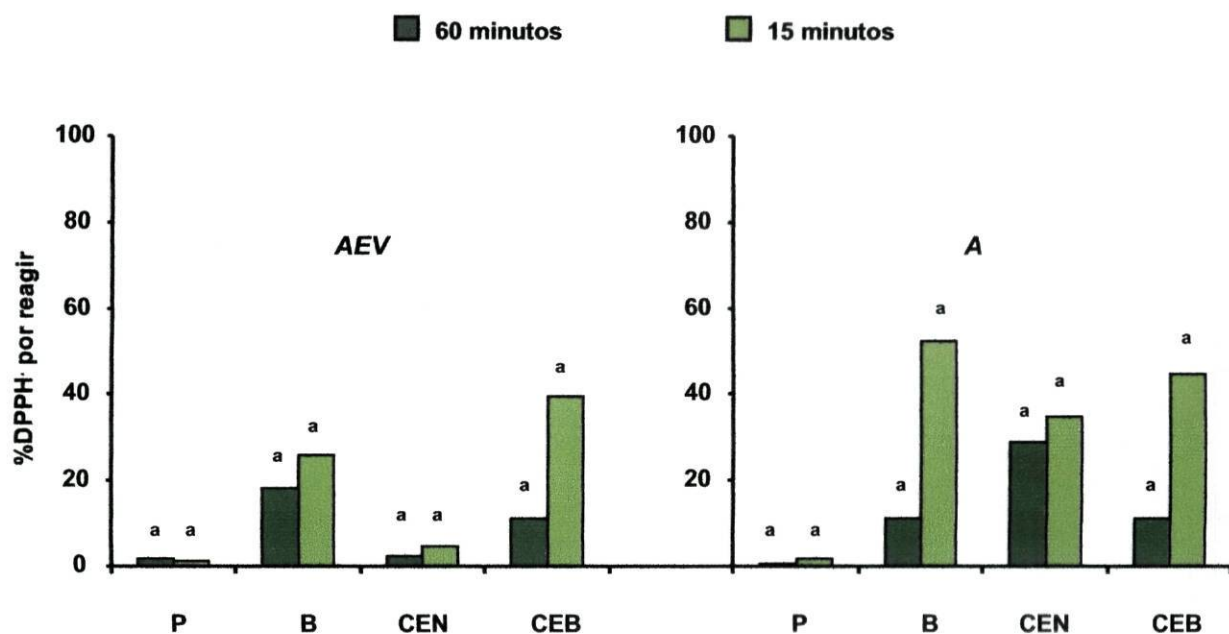


Figura 4-43 : Percentagem de *DPPH por reagir nos extractos fenólicos das fases aquosas* das amostras ao fim de 15 minutos de reacção. As letras P, B, CEN e CEB correspondem às amostras de azeite processado, com batata, com cenoura e com cebola. Os valores representados são médias de quadruplicados de amostras. Letras minúsculas diferentes mostram amostras estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Através dos gráficos, podemos observar que os extractos fenólicos das amostras de AEV e A, presentes quer na fase oleosa como na aquosa possuem um certo poder anti-radicalar. Essa capacidade é mais notória nas amostras não processadas e processadas sem alimentos, facto que parece estar directamente relacionado com o teor fenólico existente nas várias amostras. Deste modo, a presença de alimentos contribuiu para a diminuição da capacidade anti-radicalar das mesmas.

5. CONCLUSÕES

Após a análise efectuada a todos os resultados obtidos na **1ª parte** deste trabalho, pôde concluir-se que o azeite, independentemente da sua qualidade, possui uma maior estabilidade oxidativa relativamente aos restantes óleos de oleaginosas processados, com e sem alimentos (carne e batata), a 180 °C durante 60 minutos. No entanto, atendendo ao elevado teor fenólico do AEV, o “tempo de prateleira” destas amostras foi superior ao das amostras de AV e A. O processamento a 180 °C, afectou, de um modo geral, essa quantidade, sobretudo nas amostras que continham alimentos, possivelmente porque foram necessários para a protecção do azeite face à oxidação lipídica resultante da temperatura elevada a que as amostras foram submetidas. Os secoiridóides mostraram ser, de facto, os polifenóis mais abundantes no azeite, no entanto, juntamente com o HyTy foram os mais afectados com o processamento. Os lignanos, sobretudo o PyAc, foram os que mostraram sofrer menos alterações. Por outro lado, todas as amostras processadas nos outros óleos vegetais apresentaram-se oxidadas ou com um “tempo de prateleira” mais curto.

Os óleos de oleaginosas possuem uma concentração de tocoferol bastante mais elevada relativamente ao azeite. No entanto, essa quantidade não foi suficiente para evitar a degradação destes óleos, muito ricos em ácidos gordos polinsaturados. O OG mostrou ser de todos os óleos alimentares estudados o mais susceptível à oxidação, uma vez que todas as suas amostras se oxidaram logo após o processamento. A presença de uma quantidade elevada de PUFAs e de α -tocoferol, possivelmente numa concentração demasiado elevada e deste modo já com efeitos pró-oxidantes, poderá ser uma explicação para a fraca estabilidade oxidativa deste óleo. O OM e o OS, apesar de serem constituídos maioritariamente por este tipo de ácidos gordos, mostraram ser menos instáveis relativamente ao OG, provavelmente devido à presença de γ e δ -tocoferóis, tocoferóis mais activos nas concentrações existentes. O OA foi o que menos apresentou qualquer tipo de tocoferol.

O processamento, a 180 °C, afectou todas as amostras em geral, e em particular aquelas que foram processadas sem alimentos. Assim, observou-se um efeito protector dos alimentos, sobretudo da batata, no conteúdo de tocoferol presente nos óleos de oleaginosas, o que provavelmente contribuiu para uma melhor estabilidade oxidativa destas amostras. De referir ainda que a quantidade de tocoferóis presente nestas não foi tão afectada com o processamento como o teor em polifenóis.

Verificou-se o aparecimento de dois compostos desconhecidos (1 e 2) nos extractos fenólicos do azeite após o processamento, em especial nas amostras contendo alimentos. A análise do composto 1 por LC-DAD-MS, permitiu-nos concluir que este se trata de um derivado do ácido elenólico, resultante, possivelmente, da degradação hidrolítica dos secoiridóides do EA, nomeadamente do 3,4-DHPEA-EA e *p*-HPEA-EA. Quanto ao composto

2, nada foi concluído, dada a co-eluição de outros compostos. No entanto, a sua presença foi verificada apenas nas amostras contendo alimentos.

De acordo com os resultados obtidos no teste de DPPH[·], todos os extractos fenólicos das amostras de azeite mostraram possuir capacidade anti-radicalar. No entanto, as amostras de AEV foram as que apresentaram um melhor poder antioxidante, comparativamente às restantes amostras de AV e A. O mesmo teste realizado aos extractos lipofílicos contendo tocoferol das amostras de óleos de oleaginosas, mostrou-nos que o OG é o que tem pior poder antioxidante relativamente aos restantes. Nestes óleos alimentares não foram detectados compostos polifenólicos, pelo que a actividade anti-radicalar avaliada por este teste está essencialmente correlacionada com o conteúdo em tocoferóis presente nas amostras. Contudo, durante o processamento, deverão formar-se compostos com actividade anti-radicalar, o que nos impossibilita de correlacionar esta actividade com o conteúdo em tocoferóis e com a estabilidade oxidativa das amostras. Para a avaliação da capacidade anti-radicalar dos extractos de tocoferol presente nos azeites, o método da estufa mostrou ser o mais indicado, uma vez que com o teste de DPPH[·] há uma grande probabilidade de se formarem compostos, durante o processamento, que absorvem ao mesmo comprimento de onda do DPPH[·], conduzindo a falsos resultados.

A avaliação da extensão da oxidação lipídica das amostras de carne revelou que as amostras de carne processadas em AEV e em A se mantêm não oxidadas mesmo após 1 mês de armazenamento a -20 °C, ao contrário do que aconteceu com aquelas processadas nos restantes óleos alimentares. Após a determinação da quantidade de compostos fenólicos presentes nas fases aquosas libertas pela carne foram detectados compostos, cuja identificação não nos foi possível, mas supõe-se que estes sejam compostos cedidos pelo azeite, ou pelo próprio alimento, que possuem uma certo poder anti-radicalar provado, posteriormente, pelo teste de DPPH[·].

Atendendo a tudo o que foi dito anteriormente, podemos concluir que apesar do processamento afectar essencialmente os compostos minoritários dos óleos alimentares, todas as amostras de azeite apresentaram um estado oxidativo semelhante, próprio para consumo. No entanto, os AEV e AV poderão ainda possuir a mais valia de exercer uma actividade biológica benéfica no organismo, contribuindo, deste modo, para a prevenção de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose. No que respeita aos óleos de oleaginosas, o OA, mas sobretudo o OG não são, de facto, os mais indicados para este tipo de processo culinário ("assados") já que se oxidam muito facilmente quando submetidos a temperaturas elevadas, não sendo aconselhados ao consumo humano. Os OM e OS mostraram ser

relativamente semelhantes quando usados nas referidas condições, ou seja, podem ser consumidos logo após o seu processamento. No entanto, o seu tempo de "prateleira" é bastante reduzido comparativamente a qualquer tipo de azeite utilizado. Estes resultados evidenciam ainda a necessidade de se conhecer melhor o verdadeiro conteúdo em tocoferóis dos óleos alimentares, uma vez que a sua concentração irá influenciar a instabilidade destes, podendo conduzir a efeitos nefastos. Neste trabalho, a identidade dos tocoferóis mostrou possuir um papel mais importante na estabilidade oxidativa destes óleos relativamente sua composição em ácidos gordos.

No que respeita à **2ª parte** desta tese, pôde concluir-se que:

Todas as amostras de AEV e A processadas, a 100 °C, com e sem alimentos se mantiveram estáveis até aos 70 dias (2 meses + 10 dias) de armazenamento na estufa a 60 °C.

À semelhança do que aconteceu na 1ª parte deste trabalho, o processamento conduziu à redução do teor fenólico de todas as amostras, em geral, e em particular, das amostras que continham alimentos (batata, cenoura e cebola). Verificou-se ainda que uma quantidade considerável (40 a 70%) destes compostos "migram" para a fase aquosa das amostras, confirmando-se, deste modo, o seu carácter essencialmente hidrofílico. Na tabela 5-1 encontra-se uma tabela que nos mostra as quantidades, em %, de compostos retidos nas fases oleosa e aquosa das amostras de AEV e A processadas, sem alimentos.

Tabela 5-1: Quantidade, em %, de compostos fenólicos nas fases oleosa e aquosa das amostras de azeite extra-virgem processado a 100°C (AEVP) e de azeite processado a 100°C (AP) adicionados no início (60min.) e a 15 minutos do fim do processamento.

Composto	Fases (%)	AEVP		AP	
		60 min.	15 min.	60 min.	15 min.
HyTy	Oleosa	0	0	0	0
	Aquosa	0	0	0	0
Ty	Oleosa	0	0	0	0
	Aquosa	100	100	100	100
HyTyAc	Oleosa	0	28	100	25
	Aquosa	100	72	0	75
Py	Oleosa	37	31	18	10
	Aquosa	63	69	82	90
HyTy-EDA	Oleosa	20	18	5	20
	Aquosa	80	82	95	80
HyTy-EA	Oleosa	35	21	13	22
	Aquosa	65	79	87	78
Ty-EDA	Oleosa	43	25	18	26
	Aquosa	57	75	82	74
Ty-EA	Oleosa	65	39	31	27
	Aquosa	35	61	78	73

Atendendo aos resultados da tabela 5-1, podemos concluir que apesar destes compostos possuírem valores diferentes de $\log P$ [118], todos se encontravam maioritariamente na fase aquosa. No entanto, estas percentagens podem não corresponder à quantidade que seria de se esperar pelos $\log P$, uma vez que também dependem da velocidade a que os compostos se degradam nas duas fases. Trata-se de um processo dinâmico e não de um equilíbrio.

Apesar das amostras, às quais o azeite foi adicionado apenas a 15 minutos do fim do processamento, terem mostrado melhores resultados relativamente àquelas em que este foi adicionado logo no início, essa diferença não foi muito significativa.

A presença dos compostos desconhecidos 1 e 2, tanto nas fases oleosas como nas aquosas das amostras, foi igualmente verificada nesta 2ª parte do trabalho. No entanto, foram encontrados em muito maior quantidade do que o observado aquando do processamento a 180 °C na ausência de água adicionada, confirmando-nos que a presença da água poderá contribuir para a degradação hidrolítica dos secoiridóides. Os alimentos pareceram contribuir para a aceleração desta hidrólise. Atendendo aos resultados obtidos, pudemos ainda verificar que o composto 1 possui um carácter mais hidrofílico. No que respeita ao composto 2, ainda não identificado, este continuou ausente nas amostras não

processadas e processadas sem alimentos e apresentou possuir uma carácter mais lipofílico.

A quantidade de α -tocoferol presente nas amostras de azeite não sofreu grandes alterações após o processamento a 100 °C, o que nos mostra que este tipo de antioxidante é mais resistente a esta temperatura relativamente aos polifenóis.

O teste de DPPH[·] realizado aos extractos fenólicos das amostras de azeite mostrou-nos que, apesar da sua quantidade ter sido reduzida após o processamento, estes compostos continuam a possuir uma boa actividade anti-radicalar, sobretudo nas amostras em que o alimento está ausente.

Deste modo, o azeite torna-se um alimento essencial nos nossos cozinhados diários que pode ser consumido cru ou processado a 180 °C e a 100 °C na presença de alimentos porque, ao contrário do que acontece com a maioria dos óleos de oleaginosas, para além da sua estabilidade oxidativa, tem ainda a mais valia de ajudar na prevenção de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

O azeite e alguns óleos de oleaginosas são largamente utilizados na preparação de alimentos, quer a nível doméstico como industrial. Neste trabalho de investigação, pudemos verificar que o processamento destes óleos a 100 °C ("sopas") e a 180 °C ("assados"), na presença de alimentos afecta essencialmente a composição minoritária dos mesmos, nomeadamente em polifenóis e em tocoferol. No entanto, são necessárias mais pesquisas para informar os consumidores da forma mais correcta de utilização destas gorduras no processamento dos alimentos, sem por em causa a sua saúde e incentivá-los à sua utilização diária uma vez que é uma mais valia na protecção do organismo.

A avaliação da estabilidade dos azeites e de outros óleos alimentares durante o processamento de peixe, cebola, tomate e alho, entre outros alimentos; o estudo da influência da utilização da água da companhia, normalmente rica em sais minerais e agentes desinfectantes; da utilização do cloreto de sódio (NaCl) e do sal da cozinha (composto por NaCl e outras impurezas); da altura de adição de azeite à sopa com o intuito da procura de melhores tempos (ex. adição de azeite a 5 minutos do fim do processamento) e de outros métodos, que não o DPPH', para avaliar a capacidade anti-radicalar dos extractos e o estudo da água na presença de alimentos e na ausência de qualquer tipo de óleo vegetal, são algumas sugestões que, no futuro, poderão ser executadas.

7. REFERÊNCIAS

- [1]. Faria, A. A., Leles, M. I. G., Ionashiro, M., *et al.*, "Estudo da estabilidade Térmica de Óleos e Gorduras Vegetais por TG/DTG e DTA", *Encicl. Química*, São Paulo, **2002**, 27, 111-119.
- [2]. Lehninger, A., Nielson, D. L., Cox, M. M., "Bioquímica", 3ª edição, New York: Worth Publisher, **1995**, 1152.
- [3]. Moretto, E., Fett, R., "Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais", São Paulo:Varela, **1998**, 150.
- [4]. Lidon, F. J., Silvestre, M. M., "Indústrias Alimentares – Aditivos e Tecnologia", Escolar Editora, **2007**, 49-53, 143, 144, 252-259.
- [5]. Chatzilazarou, A., Gortzi, O., Lalas, S., Zoidis, E. and Tsaknis, J., Physicochemical changes of Olive Oil and selected vegetable oils during frying, *Journal of Food Lipids*, **2006**, 13, 27-35.
- [6]. Boskou, D., "Química y Tecnología del Aceite de Oliva", AOCS Press, 1ª Edição, Illinois, 1998, 67-104.
- [7]. Servili, M., Montedoro, G., Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, 104, 602-613.
- [8]. Blei, Ira, Odian George. "Organic and Biochemistry: Connecting Chemistry to your Life", W. H. Freeman and Company, New York, **2000**, 333-342.
- [9]. Harwood, J., Yaqoob, P., Nutritional and health aspects of olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, 104, 685-697.
- [10]. Viola, Publio, Considerações à Margem de um Congresso sobre o Valor Biológico do Azeite. *Jornal Nacional do Azeite*, **1971**, 82, 118-121 e 128.
- [11]. Tuberoso, C.I. G., Kowalczyk, A., Sarritzu, E., Cabras, P., Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oil seeds for food use, *Food Chemistry*, **2007**, 103, 1494-1501.
- [12]. Coppen, P. P., "Rancidity in Foods", Allen, J. C. & Hamilton, R. J. eds., Chapman & Hall, Glasgow, **1994**, 84-103.
- [13]. Frankel, N. E., Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality, *Food Chemistry*, **1996**, 57 (1), 51-55.

- [14]. Simic, M. G. & Karel, M., "Autoxidation in Foods and Biological Systems", Plenum Press, New York, **1998**.
- [15]. Reische D. W., Lillard, D. A., Eitenmiller, R. R., "Antioxidants", In: Akoh CC, Min DB editors, Food Lipids, New York: Marcel Dekker, **2002**, 489-516.
- [16]. Lee, H.O. & Montag, A., Antioxidative wirksamkeit von Tocochromanolen – Rangfolge bestimmung mit - Response Surface Methodology (RSM), *Fat Sci. Technol.*, **1992**, 94, 213-217.
- [17]. Cillard, J., Cillard, P., Cormier, M., Effect of experimental factors on the prooxidant behaviour of α -Tocopherol, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1980**, 57, 255-261.
- [18]. Marinova, E. M. & Yanishlieva, N. V., Effect of temperature on the antioxidative action of inhibitors in lipid autoxidation, *J. Sci. Food Agric.*, **1992**, 60, 313-318.
- [19]. Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., Suara-Calixto, F. A., Procedure do Measure the Antiradical Efficiency of Poliphenols. *J. Sci. Food Agric.* **1998**, 76, 270-276.
- [20]. Oliveira, Maria Augusta, Apontamentos das aulas de Química dos Produtos Naturais, 2006/2007.
- [21]. Paiva Martins, Fátima, Gordon, H. M., Interactions of Ferric Ions with Olive Oil Phenolic Compounds, *Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 2704-2709.
- [22]. Beardsell, D., Francis, J., Ridley, D., Health promoting constituents in plant derived edible oils, *Journal of Food Lipids*, **2002**, 9, 1-34.
- [23]. Boskou, D., "Olive oil chemistry and technology", AOCS Press, Champaign, IL (USA), **1996**, 52-83.
- [24]. Trichoupoulou, A., Lagiou, P. and Papas, A., "Mediterranean diet: are antioxidants central to its benefits?" In Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health, CRC Press, Boca Raton, FL, 1998, 107-118.
- [25]. Belitz, D., Grosch, W., Schieberle, P. "Food Chemistry", 3rd revised edition, Springer, 2004, 194-196, 201, 205-206, 232-240, 463, 464, 822.
- [26]. Psomiadou, E., Tsimidou, M., Stability of virgin olive oil - Photo-oxidation studies, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 722-727.

- [27]. Naczk, M., Oickle, D. and Shahidi, F., Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**, *41* (5), 1523-1542.
- [28]. Cortesi, N. and Fedeli, E., Polar Components of Virgin Olive Oil. Note *J. Riv. Ital. Sost. Agr.*, **1972**, *10*, 264.
- [29]. Díez, M. J. G. F., Adamos, M. R., "Table Olives", Chapman & Hall, London (UK), 1997, 67-109.
- [30]. Roncero, A. V., Costante, E. G., Durán, R. M., Componentes fenólicos de la aceituna, Polifenoles de la pulpa, *Gracas y Aceites*, **1974**, *25*, 269-274.
- [31]. Montedoro, G., Servilli, M., Baldioli, M., Miniato, E., Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil – Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by (HPLC), *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, *40*, 1571-1576.
- [32]. Bernes, M., Garcia, A., Garcia, P., Rios, J. J., Garrido, A., *Agric. Food Chem.*, **1999**, *47*, 3535-3540.
- [33]. Montedoro, G. F., I costituenti fenólico presenti negli oli vergini de oliva. Nota1: identificazione di alcuni acidi fenocili e loro potere antiossidante, *S. T. A3*, 1972, 177-186.
- [34]. Roncero, A. V., Les polyphenols de l'huile d'olive et leur influence sur les caracteristiques de l'huile, *Rev. Fr. Corps Gras.*, **1978**, *25*, 21-26.
- [35]. Litwinienko, G., Kasprzyscka-Guttman, T., Jamanek, D., DSC study of antioxidant properties of dihydroxyphenols, *Thermochimica Acta*, Warraw, março **1999**, *331*, 79-86.
- [36]. Rovelli, P., Cortesi, N., Fedeli, E., Analysis of flavonóides from *Olea europaea* by HPLC-UV and HPLC-electrospray-MS, *Riv. Ital. Sostanze Crasse*, 1997, *74*, 273-279.
- [37]. Paiva Martins, Fátima. Apontamentos de Química dos Alimentos e Nutrição - Lípidos, 2002/2003.
- [38]. Montedoro, G., Servilli, M., Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2002**, *104*, 602-613.

- [39]. Gordon, H. M., Paiva-Martins, Fátima, Almeida, M., Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol Acetate Compared with That of Other Olive Oil Polyphenols, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 2480-2485.
- [40]. Paiva-Martins, Fátima and Gordon, H. M., Isolation and Characterization of the Antioxidant Component 3,4-Dihydroxyphenylethyl-4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from Olive (*Olea europaea*) Leaves, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 4214-4219.
- [41]. Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, M., Macchioni, A., Montedoro, G. F., Phenolic compounds of olive fruit: one and two dimensional Nuclear Magnetic Resonance characterization of nüzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, *47*, 12-18.
- [42]. Mateos, R., Espartero, L. J. *et al.*, Determination of Phenols, Flavones and Lignans in Virgin Olive Oil by Solid-Phase Extration and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection, *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 2185-2192.
- [43]. Deiana, M., Rosa, A., Cao, C. F., Pirisi, F. M., Bandino, G., Dessi, M. A., Novel approach to study oxidative stability of extra virgin olive oils: Importance of α -tocopherol concentration, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 4442-4446.
- [44]. Jung, M. Y., Yoon S. H., Min, D. B., Effects of processing steps on the contents of minor compounds and oxidation stability of soybean oil, *J., Am. Oil Chem. Soc.*, **1989**, *66*, 118-120.
- [45]. Eidhin, D. N., Burke, J., O'Beirne, Oxidative stability of ω -3 rich camelina oil and camelina oil-based spread compared with plant and fish oils and sunflower spread, *J. Food Sci.*, **2003**, *68*, 345-353.
- [46]. Coultate, TP., "FOOD The chemistry of its components", Royal Society of Chemistry, **1984**, *50*, 53 e 173.
- [47]. Burton, G., W., Ingold, K. U., Vitamin E: Application of the Principles of Physical Organic Chemistry to the Exploration of Its Structure and Function, *Acc. Chem. Res.*, **1986**, *19*, 194-201.
- [48]. Sheppard, A. J., Pennington, J. A. T. and Weihrauch, J. L., "Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods", In Vitamin E in Health and Disease, Packer, L. and Fuchs, J., eds, Marcel Dekker, Inc., New York, **1993**, 9-31.
- [49]. Visioli, F., Galli, C., Olive Oil more than just oleic acid, *Am. J. Clin. Nutr.*, **2000**, *72*, 853.

- [50]. Perez-Jimenez, F., Alvarez de Cienfuegos, G., Bandimon, L., Barja, G. *et al.*, International conference on the healthy effect of virgin olive oil, *Eur. J. Clin. Invest.*, **2005**, 35, 421-424.
- [51]. Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C., Trichopoulou, D., Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population, *N. Engl. J. Med.*, **2003**, 348, 2599-2608.
- [52]. Sirtori, C. R., Gatti, E., Tremoli, E., Galli, C. *et al.*, Olive oil, corn oil and n-3 fatty acids differently affect lipids, lipoproteins, platelets, and superoxide formation in type II hypercholesterolemia, *Am. J. Clin. Nutr.*, **1992**, 56, 113-122.
- [53]. Fenneme, O. R., "Química de los alimentos", Editorial Acribia, S. A. Department of Food Science, University of Wisconsin-Madison. Madison, Wisconsin, **1993**, 197-221 e 263-265.
- [54]. Ranalli, A., Ferrante, M. L., DeMattia, G., *et al.*, Analytical Evaluation of Virgin Olive Oil of First and Second Extration. *J. Agric. Food Chem.* jan. **1999**, 47 (2), 417-424.
- [55]. Aviram, M., Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrophages in atherosclerosis, and the anti-atherogenicity of antioxidants, *Eur. J. Chem. Clin. Biochem.*, **1996**, 34, 599-608.
- [56]. Wiseman, S. A., Mathot, J. N., De Fouw, N. J. and Tijburg, L. B., Dietary non- tocopherol, antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of Low Density Lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis*, **1996**, 120, 15-23.
- [57]. Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Mattei, A. *et al.*, Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans, *FEBS Lett.*, 2000, 468, 159-160.
- [58]. Fito, M., Covas, M. I., Lamuela-Raventos, R. M., Vila, J., Torrents, J., De La Torre, C. And Marrugat, J., Protective effect of olive oil and its phenolics compounds against low density lipoprotein oxidation, *Lipids*, **2000**, 35, 633-638.
- [59]. Manna, C., Galletti, V., Cucciolla, P., Montedoro, G. F., Zappia, V., Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages, *J. Nutr. Biochem.*, **1999**, 10, 159-165.
- [60]. Petroni, M., Blasevich, M., Salami, N., Papini, G. F., Montedoro, C., Inhibition of plaquet aggregation and eicosanoid production by phenolic component of olive oil, *Thromb. Res.*, **1995**, 78, 151-160.

- [61]. Bisignono, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., Saija, A., On the *in vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol, *J. Pharm Pharmacol.*, **1999**, 31, 971-974.
- [62]. Servili, M., Selvaggini, R., Esposito, S., Taticchia, A. *et al.*, Health and Sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil, *J. Chromatogr. A.*, **2004**, 1054, 113-127.
- [63]. Beauchamp, G., K., Keast, R. S. J., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Lee, C-H., Smith, A. B., Breslin, P. A. S., Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil, *Nature*, **2005**, 437, 45-46.
- [64]. Smith, A. B., Han, Q., Breslin, P. A. S., Beauchamp, G., K., Synthesis and assignment of absolute configuration of (-)-oleocanthal: A potent, naturally occurring non-steroidal anti-inflammatory and anti-oxidant agent derived from extra-virgin olive oils. *Org. Lett.*, **2005**, 7, 5075-5078.
- [65]. Owen, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W., Spiegelhalder, B. and Bartsch, H, Phenolic compounds and squalene in olive oils: The concentration and antioxidant potencial of total phenols, simple phenols, secoiridóides, lignans and squalene, *Food Chem. Toxicol.*, **2002**, 38, 647-659.
- [66]. Stampfer, M., Hennekens, C., Manson, J., Colditz, G., Rosner, B. and Willett, W., Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women, *N. Engl. J. Med.*, **1993**, 328, 1444-1449.
- [67]. Rimm, E. R., Stampfer, M., Ascherio, A., Giovannucci, E., Colditz, G. and Willett, W., Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women, *N. Engl. J. Med.*, **1993**, 328, 1450-1456.
- [68]. Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H., *et al*, Dietary antioxidant flavonoids and risk of Coronary Heart Disease: the Zutphen Elderly Study, *Lancet*, out. **1993**, 342, 1007-1011.
- [69]. Traber, M. G. and Sies, H., Vitamin E in humans: demand and delivery, *Annu. Rev. Nutr.*, **1996**, 16, 321-347.
- [70]. *Enciclopédia de Medicina*, 1ª edição, Selecção do Reader's Digest, Lisboa, **1992**, 1, 158, 537.
- [71]. Demjanov, Ivan, "The Cardiovascular System em Pathology for the health" – Related Professions, 2ª ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, **1996**, 147-158.

- [72]. Lusi, A. J., *Nature*, **2000**, 407, 233-241.
- [73]. Reaven P., Grasse, B. J. *et al.*, Effects off oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoproteins- The Jerusalem Nutrition Study: high MUFAs vs high PUFAs, *Am. J. Clin. Nutr.*, **1991**, 53, 899-907.
- [74]. G. W. Burton and K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 6472.
- [75]. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm-Wiss. Technol.*, **1995**, 28, 25-30.
- [76]. Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., Rice-Evans, C., *FEBS Letters*, **1996**, 387, 240-242.
- [77]. Bondet, V., Brand-Williams, W. and Berset, C., Kinetic and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH[•] Free radical method, *Lebensm.-Wiss. Technol.*, **1997**, 30, 609-615.
- [78]. Wright, J. S., Johnson, E. R., DiLabio, G. A., Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families antioxidants, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 1173-1183.
- [79]. Foti, M. C., Daquino, C., Geraci, C., Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with DPPH radical in alcoholic solutions, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 2309-2314.
- [80]. Jiménez, A., Selga, A., Torres, J. L., Julià, L., Reducing activity of polyphenols with stable radicals of the TTM series. Electron transfer versus H-abstraction reactions in flavan-3-ols, *Org. Lett.*, **2004**, 6, 4583-4586.
- [81]. Prior, R. L., Xianli and Shaich, K., Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 4290-4302.
- [82]. St. Angelo, A., *J. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1996**, 36, 175.
- [83]. Noruma, T., Kikuchi, M., Kawakami, Y., Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with DPPH[•], *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **1997**, 42, 361-370.
- [84]. Antoniassi, R., "Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras", Boletim do Centro de Pesquisa e processamento de alimentos, Curitiba, **2001**, 19, (2), 353-380.

- [85]. Hill, S. E., A comparison of modern instruments for the analysis of the oxidation stability of fats, oils and foods, *Inform.*, **1994**, 5 (1), 104-109.
- [86]. Williams, K. A., "Oils, Fats and Fatty Foods", 4th edn, J and A Churchill, London, 1996.
- [87]. Gray, J. I., Measurement of lipid oxidation: a review, *Journal of the American Oil Chemist's Society*, **1978**, 55, 538-546.
- [88]. Gómez-Alonso, S., *et al.*, Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature, *Food Chemistry*, **2007**, 100 (1), 36-42.
- [89]. Castera-Rossignol, A., Bosque, F., *OCL* **1994**, 1, 131.
- [90]. Frankel, E. N., "Lipid Oxidation", The oily Press, Dundee, **1998**, 166.
- [91]. Berset, C., Cuvelier, M. E., *Sciences des Aliments*, **1996**, 16, 219.
- [92]. Coupland, J. N., McClements, D. J., *Trends Food Sci. & Technol.*, **1996**, 7, 83.
- [93]. Hamilton, R. J., Rossell, J. B., Hudson, B. J. F., Lölliger, J., In *Rancidity in Foods*; Allen J. C., Hamilton, R. J.; Ed.; Applied Science Publishers LTD.; London, **1983**, 1.
- [94]. Ladikos, D., Lougovois, V., *Food Chem.*, **1990**, 35, 295.
- [95]. Choe, E. and Min, D.B., Mechanisms and Factors for edible oil oxidation, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2006**, 5, 169-186.
- [96]. Frankel E. N., *Progr.Lipid Res.*, **1980**, 19, 1.
- [97]. Shahidi, F., Yung, J., Rubin, L.J., Wood, D.F., *Can. Inst. Food Sci. Technol.*, **1987**, 20, 104.
- [98]. DeMan, J. M., En Fatty Acids in Foods and their Health Implications. Ch. K Chow(ed), Marcel Dekker Inc, New York, **1992**, 17.
- [99]. Dobarganes, C., Velasco, J., Oxidative stability of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2002**, 104, 661-676.

- [100]. Cort, W. M., Scott, J. W., Araujo, M., Mergens, W. J., Cannalunga, M. A., Osadca, M., Harley, H., Parrish, D. R. & Pool, W. R., Antioxidant activity of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1975**, 52, 174-178.
- [101]. Porter, W. L., Black, E. D., Drolet, A. M., Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems, *J. Agric. Food Chem.*, **1989**, 37, 615-624.
- [102]. Frankel, E. N., Huang, S. W., Kanner, J. & German, J. B., Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulks oils versus emulsions, *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, 1054-1059.
- [103]. Rhee, K. S., *Food Technol.*, **1988**, 42, 127.
- [104]. Kingston, E.R., Monaham, D.J., Buckeley, D.J., Lynch, P.B., Lipid oxidation in cooked pork as affected by vitamin E cooking and storage conditions, *Journal of Food Science* **1998**, 3, 63, 386-389.
- [105]. Silva, F. A. M., Ferreira, M. A., Métodos para a avaliação do grau da oxidação lipídica e da capacidade antioxidante, *Química Nova*, **1999**, 22 (1), 94-103.
- [106]. D. C. Eaton, "Laboratory Investigations in Organic Chemistry", McGraw-Hill Book Company, New York, **1989**, 513-532.
- [107]. Grenha, J. F. C. S., Estudo da decomposição de compostos fenólicos em solução – Tese de Seminário Científico, FCUP, 2000.
- [108]. Tasioula-Margari, M., Okogeri, O., Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection, *Food Chemistry*, **2001**, 74, 377-383.
- [109]. Brenes, M., García, A., Dobarganes, C., M., Velasco, J. and Romero, C., Influence of thermal treatments simulating cooking processes on the polyphenols content in virgin olive oil, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 5962-5967.
- [110]. Allouche, Y., Jiménez, A., Gaforio, J. J., Uceda, M. and Beltrán, G., How heating affects extra virgin olive oil quality indexes and chemical composition, *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 9646-9654.

- [111]. Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., Spectroscopic Methods in Organic Chemistry, Thieme Medical Publishers, 2nd edition, 2007.
- [112]. Huang, Shu-Wen, Frankel, E. N. And German, J. B., Effects of individual tocopherols and tocopherol mixtures on the oxidative stability of corn oil triglycerides, *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 2345-2350.
- [113]. Huang, Shu-Wen, Frankel, E. N. And German, J. B., Antioxidant activity of α - and γ -tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions, *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, 2108-2114.
- [114]. Caballero, B., Trugo, L. C., & Finglas, P. M., "Encyclopedia of food sciences and nutrition", 2nd edition, Oxford: Academic Press, Elsevier Science Ltd, **2003**.
- [115]. Mondy, N. L., Gosselin, B., Effect of peeling on the total phenols, total glycoalkaloids, discoloration and flavour of cooked potatoes, *J. Food Sci.*, **1988**, 53, 756-759.
- [116]. Malmeberg, A. G., Theander, O., Determination of chlorogenic acid in potato tubers, *J. Agric. Food Chem.*, **1985**, 33, 549-551.
- [117]. Paiva-Martins, F., Gordon, H. M., Effects of pH and ferric ions on the antioxidant activity of olive oil polyphenols in oil-in-water emulsions, *JAOCS*, **2002**, 79 (6), 571-576.
- [118]. Paiva-Martins, F., Gordon, Michael, H., Gameiro, P., Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes, *Chemistry and Physics of Lipids*, **2003**, 124, 23-36.