



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO**

**Avaliação da estabilidade oxidativa de azeite de oliva  
extra virgem após adição de *trans*-resveratrol**

Daniela Gouveia Vieira

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Maria Jaeger de Carvalho

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Rosemar Antoniassi

2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DE AZEITE DE OLIVA  
EXTRA VIRGEM APÓS ADIÇÃO DE *TRANS*-RESVERATROL

DANIELA GOUVEIA VIEIRA

Dissertação de Mestrado apresentada no  
programa de Pós-Graduação em Nutrição,  
Instituto de Nutrição Josué de Castro,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
como parte dos requisitos necessários à  
obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lucia Maria Jaeger  
de Carvalho

Co-orientadora: Dr<sup>ª</sup>. Rosemar Antoniassi

Rio de Janeiro

Agosto/ 2008

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DE AZEITE DE OLIVA EXTRA  
VIRGEM APÓS ADIÇÃO DE *TRANS*-RESVERATROL

Daniela Gouveia Vieira

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lucia Maria Jaeger de Carvalho

Co-orientadora: Dr<sup>ª</sup> Rosemar Antoniassi

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Aprovada por:

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Lucia Maria Jaeger de Carvalho  
Instituto de Nutrição Josué de Castro/ UFRJ  
Orientadora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eliane Fialho de Oliveira  
Instituto de Nutrição Josué de Castro/ UFRJ  
Revisora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gisela Maria Dellamora Ortiz  
Faculdade de Farmácia/ UFRJ

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mirian Ribeiro Leite Moura  
Faculdade de Farmácia/ UFRJ

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Glorimar Rosa  
Instituto de Nutrição Josué de Castro/ UFRJ  
Suplente

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nancy dos Santos Barbi  
Faculdade de Farmácia/ UFRJ  
Suplente

Rio de Janeiro

Agosto/ 2008

Vieira, Daniela Gouveia

Avaliação da estabilidade oxidativa de azeite de oliva extra virgem após adição de *trans-resveratrol* / Daniela Gouveia Vieira. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Nutrição Josué de Castro, 2008.

96 f. : il.; 31 cm.

Orientadora: Lucia Maria Jaeger de Carvalho.

Dissertação (mestrado) – UFRJ, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-graduação em Nutrição, 2008.

Referências bibliográficas: f. 77-84.

1. Azeite de oliva extra virgem. 2. Óleos – análise. 3. Azeite de oliva – análise.
  4. Monitoramento da oxidação de óleos e gorduras – métodos. 5. Cromatografia de gases – métodos. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência – métodos.
  6. Ciência e Tecnologia de alimentos. 7. Nutrição - Dissertação.
- I. Carvalho, Lucia Maria Jaeger de. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós - graduação em Nutrição. III. Título.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Luiz Carlos Vieira (*in memorian*) e Iracema Gouveia Vieira por todo amor, apoio, incentivo e por sempre “embarcarem” nos meus sonhos;

À querida amiga e irmã de coração, Luciana Figueiredo do Nascimento (*in memorian*) que se foi muito cedo levando consigo diversos sonhos, inclusive o de concluir seu curso de Mestrado;

A todos aqueles que dedicam seu tempo à pesquisa na área acadêmica brasileira, abdicando muitas vezes do convívio de amigos e familiares em prol do avanço da Ciência e Tecnologia.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a fé, a saúde, a coragem e a determinação para superar todos os obstáculos e chegar até aqui;

Aos meus amados pais, Luiz Carlos (*in memoriam*) e Iracema, pelo amor e dedicação incondicionais, por relevarem meus devaneios e por terem me ensinado os valores mais importantes: respeito ao próximo e honestidade;

A Dr<sup>a</sup>. Lucia Maria Jaeger de Carvalho por ter abraçado minhas idéias, acreditado em minha capacidade, pelos ensinamentos profissionais e pessoais e pelo imprescindível financiamento;

A Dr<sup>a</sup>. Rosemar Antoniassi pelos ensinamentos compartilhados e pela parceria de sempre com a Prof<sup>a</sup>. Lucia Maria Jaeger de Carvalho que gerou a oportunidade de realizar as análises nos Laboratórios de Óleos Graxos e Cromatografia Gasosa do CTAA/Embrapa Agroindústria de Alimentos;

Ao pesquisador José Luiz Viana de Carvalho pelo apoio e colaboração;

A Dr<sup>a</sup>. Dahabada Helena, do laboratório de Agregação de proteínas e amilóides – Prof<sup>a</sup>. Débora Fogel, do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ, pela parceria e disponibilidade e a estagiária Nathália Mantuano, pela colaboração plena e atuação direta nas análises e por terem aceitado o desafio de trabalhar com lipídios;

A CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado por 6 meses;

A meu namorado, Carlos Roberto Rocha Júnior, por estar sempre ao meu lado, pela paciência e compreensão nos “clássicos momentos de desespero” proporcionados pelo Mestrado e pelo incentivo constante;

Aos amigos Rodrigo, Cristiane Sobrinho e Marcelly, pelo valioso auxílio na realização das análises, pelo alegre convívio, pelo respeito e por me mostrarem que ainda vale a pena ser ‘uma pessoa do bem’ e à amiga Andressa, por tudo isso e pelo desprendimento, boa-vontade e dedicação ao me ensinar a metodologia de DPPH;

Aos estagiários do Laboratório de Óleos Graxos, especialmente, Érika, Tais Rosa, Vinícius, Luciana, Diogo, Leonardo, Immer e Natasha pela torcida, pelas gargalhadas, pelas ‘cantorias’, por compartilharem as ‘brincas’ e as horas ‘na balança’, ‘na bancada’ e ‘na pia’, pois sem vocês este trabalho não seria possível;

Às amigas Renata Borchetta e Roberta Manhães, companheiras desta longa e difícil caminhada de Mestrado, pelo ombro amigo nas horas difíceis, pelos conselhos, e acima de tudo pelo exemplo de determinação e coragem para alcançar seus objetivos;

A minha família e todos os meus queridos amigos, que mesmo não fazendo parte do meio científico entenderam a importância deste trabalho para mim e relevaram as inúmeras horas dedicadas a ele e subtraídas de nosso convívio;

E a todos que colaboraram para a realização deste trabalho, mas que involuntariamente, não foram aqui mencionados.

*“Teu alimento seja teu remédio”*

*(Hipócrates)*

## RESUMO

### AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DE AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM APÓS ADIÇÃO DE *TRANS*-RESVERATROL

Daniela Gouveia Vieira

Orientadora: Lucia Maria Jaeger de Carvalho

Co-orientadora: Rosemar Antoniassi

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, Instituto Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

O azeite de oliva extra virgem é considerado o de melhor qualidade, pois é obtido da primeira prensagem, a frio, de azeitonas. É rico em ácidos graxos monoinsaturados, antioxidantes fenólicos e fitosteróis. O *trans*-resveratrol (*trans*-3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) é uma fitoalexina encontrada nas cascas de uvas, mas também pode ser sintetizado pela reação de acoplamento de Suzuki. O objetivo deste estudo foi adicionar *trans*-resveratrol ao azeite de oliva extra virgem, a fim de verificar a manutenção ou modificações na sua estabilidade oxidativa, monitorando e comparando a estabilidade oxidativa deste azeite (sem e com adição de *trans*-resveratrol) ao longo do método de *Schaal*. A atividade antioxidante do *trans*-resveratrol foi analisada por meio do método DPPH e sua quantificação por CLAE. Diversos azeites de oliva extra virgem foram adquiridos: dois portugueses (P1 e P2), três espanhóis (E1, E2 e E3), um grego (G) e um italiano (I) os quais foram analisadas quanto ao índice de peróxido (IP) e ao valor de extinção no UV, para que somente marcas e lotes em conformidade com os padrões de identidade e qualidade (PIQ) do IOOC (2003) pudessem ser selecionadas. P1, P2 e E1 apresentaram-se dentro dos PIQ do IOOC (2003) e pela legislação brasileira, no que diz respeito à IP, acidez livre,  $K_{270}$ , composição em ácidos graxos e em esteróis. Os azeites foram submetidos ao método de *Schaal* para selecionar o de maior estabilidade oxidativa. O azeite E1 apresentou as melhores características e foi escolhido para a adição de *trans*-resveratrol. Foram feitas as análises de IP, acidez livre,  $K_{270}$  e Rancimat, em T0 e transferiu-se o restante do azeite para frascos de vidro transparentes idênticos por 37 dias. Ao longo deste período, 3 frascos foram retirados da estufa e analisados quanto a: IP, acidez livre,  $K_{270}$  e CLAE. A análise estatística foi realizada com Testes F e T ( $p < 0,05$ ). Nas condições adotadas neste estudo para armazenamento e monitoramento da estabilidade oxidativa do azeite, a adição de 100 ppm de *trans*-resveratrol não alterou a composição em ácidos graxos e nem a estabilidade oxidativa. De acordo com os resultados da CLAE, todo o *trans*-resveratrol adicionado teria sido oxidado por volta do 20º dia. Quando comparados os percentuais de seqüestro de radicais livres do *trans*-resveratrol, da quercetina e do BHT, nas concentrações comuns aos três, em todos os tempos de reação, a quercetina apresentou maior atividade antioxidante que o *trans*-resveratrol e o BHT, respectivamente.

Palavras-chave: estabilidade oxidativa; azeite de oliva extra virgem; *trans*-resveratrol

Rio de Janeiro

Agosto/ 2008

## ABSTRACT

### ASSESSMENT OF OXIDATIVE STABILITY OF EXTRA VIRGIN OLIVE OIL AFTER ADDITION OF *TRANS*-RESVERATROL

Daniela Gouveia Vieira

Supervisor: Lucia Maria Jaeger de Carvalho

Co-supervisor: Rosemar Antoniassi

*Abstract* da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, Instituto Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

The extra virgin olive oil is considered the best in quality because it is obtained from the first pressing of olives, in the cold. It is rich in monounsaturated fatty acids, phenolic and antioxidant phytosterols. The *trans*-resveratrol (*trans*-3, 5, 4'-trihidroxiestilben) is a fitoalexin found in the skin of grapes, but can also be synthesized by the coupling reaction of Suzuki. The aim of this study was to add *trans*-resveratrol to extra virgin olive oil to verify the maintenance or changes on the oxidative stability. The oxidative stability of that oil (with and without addition of *trans*-resveratrol) was evaluated using the *Schaal* method. The antioxidant activity of *trans*-resveratrol was measured by the DPPH method and its quantification was by HPLC. Several extra virgin olive oils (different origins and brands) were purchased: two Portuguese (P1 and P2), three Spanish (E1, E2 and E3), one Greek (G) and one Italian (I) have been examined as to peroxide values (PV) and UV spectrophotometry, so that only brands and lots in accordance with the standards of identity and quality (PIQ) of the IOOC (2003) would be selected. P1, P2 and E1 were within the PIQ of the IOOC (2003) and the Brazilian law, with respect to PI, free acidity,  $K_{270}$ , fatty acids and sterols profile. The olive oils were submitted to the *Schaal* method to choose the highest oxidative stability. The olive oil E1 presented the best characteristics and was chosen for the addition of *trans*-resveratrol. The analyses of PI, free acidity,  $K_{270}$  and Rancimat were made on T0 and the remainder of the olive oil was transferred to identical transparent glass vials for 37 days. Throughout this period, 3 bottles were removed from the oven and analyzed for: PI, free acidity,  $K_{270}$  and HPLC. Statistical analysis was performed with tests F and T ( $p < 0,05$ ). Under the adopted conditions for this study for storage and monitoring of oxidative stability of the olive oil, the fatty acids profile and oxidative stability of the extra virgin olive oil was not changed by the addition of 100 ppm of *trans*-resveratrol. According to the results of HPLC, the *trans*-resveratrol was completely oxidized around the 20 th day. Comparison of the percentage of radical scavenging activity of *trans*-resveratrol, quercetin and BHT, in corresponding concentrations, in all reaction times, showed that quercetin had higher antioxidant activity than *trans*-resveratrol and BHT, respectively.

Key-words: oxidative stability; extra virgin olive oil; *trans*-resveratrol

Rio de Janeiro

August/ 2008

## SUMÁRIO:

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>15</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1. Azeite de oliva.....	17
1.2. Oxidação lipídica.....	21
1.3. Análise de monitoramento da oxidação de óleos e gorduras.....	22
1.4. Estabilidade oxidativa de óleos e gorduras.....	23
1.5. Métodos de determinação da estabilidade oxidativa.....	23
1.6. Antioxidantes.....	26
1.7. Determinação da atividade antioxidante.....	27
1.8. <i>Trans</i> -resveratrol.....	28
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>33</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
3.1. Objetivo geral.....	34
3.2. Objetivos específicos.....	34
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1. Amostras.....	35
4.1.1. Critérios de compra.....	35
4.1.2. Padrões de identidade e qualidade .....	37
4.1.3. Seleção prévia para adição de <i>trans</i> -resveratrol.....	38
4.1.4. Adição de <i>trans</i> -resveratrol.....	39
4.2. Análises realizadas.....	40
4.2.1. Índice de peróxidos.....	40
4.2.2. Valor de extinção específica no UV.....	41
4.2.3. Acidez livre.....	43
4.2.4. Composição em ácidos graxos - Método Hartman e Lago (1973).....	44
4.2.5. Composição em esteróis.....	45
4.2.6. Índice de estabilidade oxidativa no Rancimat.....	45
4.2.7. Determinação da concentração de <i>trans</i> -resveratrol por Cromatografia de alta eficiência (CLAE).....	46
4.2.8. Atividade antioxidante do <i>trans</i> -resveratrol pelo método do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....	47
4.3. Análise estatística.....	49
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
5.1. Seleção dos azeites de oliva extra virgem.....	50
5.1.1. Índice de peróxidos e valor de extinção no UV iniciais de acordo com PIQ do IOOC (2003).....	50
5.1.2. Acidez livre.....	51
5.1.3. Composição em ácidos graxos.....	51
5.1.4. Composição em esteróis.....	52

5.1.5. Índice de estabilidade oxidativa no Rancimat.....	53
5.1.6. Escolha do azeite de maior estabilidade oxidativa.....	54
5.2. Adição de <i>trans</i> -resveratrol ao azeite de oliva espanhol.....	58
5.2.1. Avaliação da composição em ácidos graxos.....	58
5.2.2. Avaliação da estabilidade oxidativa no Rancimat.....	59
5.2.3. Avaliação do índice de peróxidos.....	61
5.2.4 Avaliação de K <sub>270</sub> .....	63
5.2.5. Avaliação da acidez livre.....	64
5.2.6. Determinação de <i>trans</i> -resveratrol no azeite de oliva extra virgem por CLAE.....	65
5.3. Determinação da atividade antioxidante do <i>trans</i> -resveratrol por DPPH.....	70
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>78</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>87</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>abs</b>	Absorbância
<b>ABTS</b>	<i>2,2-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic-acid)</i>
<b>ADA</b>	<i>American Dietetic Association</i>
<b>Água miliQ</b>	Água deionizada
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AOCS</b>	<i>American Oil Chemists' Society</i>
<b>AOM</b>	<i>Active Oxygen Method</i>
<b>BHA</b>	Butil-hidroxi-anisol
<b>BHT</b>	T-butil-hidroxi-tolueno
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>CTAA</b>	Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos
<b>Cis-resveratrol</b>	<i>Cis-3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno</i>
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>cm</b>	Centímetros
<b>DCV</b>	Doenças cardiovasculares
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>DPPH</b>	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
<b>emiss</b>	Emissão
<b>exc</b>	Excitação
<b>FAME</b>	<i>Fatty Acid Methyl Ester</i>
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
<b>FRAP</b>	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
<b>g</b>	Gramas
<b>h</b>	Horas
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidade
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>IOOC</b>	<i>International Olive Oil Council</i>
<b>IUPAC</b>	<i>International Union Of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>K</b>	Valor de extinção específica
<b>Kg</b>	Kilograma
<b>L</b>	Litro
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baixa densidade
<b>IP</b>	Índice de peróxidos
<b>mEq</b>	Número de miliequivalentes
<b>MI</b>	Matéria insaponificável
<b>μ</b>	Micra
<b>μg</b>	Micrograma
<b>μL</b>	Micro litro
<b>μs</b>	Microsiemens
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro

<b>min</b>	Minutos
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio ativo
<b>OLIVA</b>	Associação Brasileira de produtores, Importadores e Comerciantes de Azeite de Oliva
<b>ORAC</b>	<i>Oxygen Radical Absorption Capacity</i>
<b>p &lt; 0,05</b>	Nível de significância menor que 5%
<b>P.A.</b>	Para análise
<b>PIQ</b>	Padrões de identidade e qualidade
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>%SRL</b>	Porcentagem de sequestro de radicais livres
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinação
<b>t</b>	Tonelada
<b><i>Trans-resveratrol</i></b>	<i>Trans</i> -3, 5, 4' - trihidroxiestilbeno
<b>TBHQ</b>	T-butil-hidroquinona
<b>UFRJ</b>	Universidade Federal do Rio de Janeiro
<b>UA</b>	Unidades arbitrárias
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VIS</b>	Visível
<b>λ</b>	Comprimento de onda

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Fluxograma de obtenção do azeite de oliva extra virgem.....	18
<b>Figura 2</b>	Equipamento Rancimat 679 Metrohm Co ( <i>Switzerland</i> ) .....	25
<b>Figura 3</b>	Esquema de funcionamento do equipamento Rancimat.....	25
<b>Figura 4</b>	Estrutura química do <i>trans</i> -3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno ( <i>trans</i> -resveratrol).....	28
<b>Figura 5</b>	Esquema geral para a síntese de <i>trans</i> -estilbenos substituídos .....	29
<b>Figura 6</b>	Fluxograma e delineamento dos procedimentos gerais do trabalho.....	36
<b>Figura 7</b>	Valores médios de índice de peróxidos dos azeites P1 e P2 durante os 10 dias de armazenamento em estufa (método de <i>Schaal</i> ).....	55
<b>Figura 8</b>	Valores médios de acidez livre dos azeites P1 e P2 durante os 10 dias de armazenamento em estufa (método de <i>Schaal</i> ).....	56
<b>Figura 9</b>	Valores médios de K <sub>270</sub> dos azeites P1 e P2 durante os 10 dias de armazenamento em estufa (método de <i>Schaal</i> ).....	57
<b>Figura 10</b>	Valores médios de índice de peróxidos dos azeites (controle e adicionado de 100 ppm de <i>trans</i> -resveratrol) ao longo do período de armazenamento em estufa (método de <i>Schaal</i> ).....	62
<b>Figura 11</b>	Valores médios de K <sub>270</sub> dos azeites (controle e adicionado de 100 ppm de <i>trans</i> -resveratrol) ao longo do período de armazenamento em estufa (método de <i>Schaal</i> ).....	63
<b>Figura 12</b>	Valores médios de acidez livre dos azeites (controle e adicionado de 100 ppm de <i>trans</i> -resveratrol) ao longo do período de armazenamento em estufa (método de <i>Schaal</i> ).....	65
<b>Figura 13</b>	Cromatogramas: (A) da solução padrão de 100 ppm de <i>trans</i> -resveratrol, (B) da amostra de azeite de oliva extra virgem adicionado de <i>trans</i> -resveratrol, usando detector de fluorescência, com emissão a 370 nm e excitação a 324 nm.....	67
<b>Figura 14</b>	Comportamento do <i>trans</i> -resveratrol (pico 12) adicionado ao azeite de oliva extra virgem e de seu produto de oxidação (pico 10) ao longo do período de armazenamento usando: (A) detector de absorvância (306 nm) e (B) detector de fluorescência (emissão: 370 e excitação: 324 nm).....	68
<b>Figura 15</b>	Concentração de <i>trans</i> -resveratrol e seu produto de oxidação ao longo do tempo. Calculada de acordo com Rudolf et al. (2005).....	69
<b>Figura 16</b>	Curva de calibração do DPPH.....	71
<b>Figura 17</b>	Valores médios de %SRL de <i>trans</i> -resveratrol, em diferentes concentrações, mensuradas após 15, 30 e 45 minutos de reação.....	72
<b>Figura 18</b>	Valores médios de %SRL de BHT, em diferentes concentrações, mensuradas após 15, 30 e 45 minutos de reação.....	72
<b>Figura 19</b>	Valores médios de %SRL de quercetina, em diferentes concentrações, mensuradas após 15, 30 e 45 minutos de reação.....	73
<b>Figura 20</b>	%SRL de <i>trans</i> -resveratrol, BHT e quercetina na concentração de 5 mg/L, mensurada após 15, 30 e 45 minutos de reação.....	74
<b>Figura 21</b>	%SRL de <i>trans</i> -resveratrol, BHT e quercetina na concentração de 10 mg/L, mensurada após 15, 30 e 45 minutos de reação.....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Codificação adotada para as amostras de azeites de oliva extra virgem de diferentes marcas e procedências.....	35
<b>Tabela 2</b>	Padrões de identidade e qualidade (PIQ) para azeite de oliva extra virgem: índice de peróxidos (IP), acidez livre e valor de extinção no UV.....	37
<b>Tabela 3</b>	Valores estabelecidos pelo <i>Codex Alimentarius</i> (2003) em relação à composição em ácidos graxos de azeite de oliva virgem.....	37
<b>Tabela 4</b>	Valores estabelecidos pelo <i>Codex Alimentarius</i> (2003) em relação à composição em esteróis de azeite de oliva virgem.....	38
<b>Tabela 5</b>	Verificação do espectrofotômetro Specord 210 (Analytikjena) de acordo com valores de azeites considerados padrões fornecidos pelo IOOC.....	42
<b>Tabela 6</b>	Valores médios de índice de peróxidos e valor de extinção específica no UV iniciais dos azeites de oliva extra virgem adquiridos.....	50
<b>Tabela 7</b>	Valores médios de acidez livre inicial dos azeites P1, P2 e E1.....	51
<b>Tabela 8</b>	Composição em ácidos graxos dos azeites de oliva extra virgem portugueses (P1 e P2) e do azeite de oliva extra virgem espanhol (E1).....	52
<b>Tabela 9</b>	Composição em esteróis dos azeites de oliva extra virgem portugueses (P1 e P2) e do azeite de oliva extra virgem espanhol (E1).....	53
<b>Tabela 10</b>	Períodos de indução no Rancimat (110 °C e fluxo de ar de 10 L/h) das amostras P1 e P2.....	54
<b>Tabela 11</b>	Períodos de indução no Rancimat (120 °C e fluxo de ar de 10 L/h) das amostras P1 e P2.....	54
<b>Tabela 12</b>	Valores médios da composição em ácidos graxos do azeite de oliva extra virgem, controle e do adicionado de 100 ppm de <i>trans</i> -resveratrol.....	59
<b>Tabela 13</b>	Valores médios dos períodos de indução dos azeites: controle e adicionado de 100 ppm de <i>trans</i> -resveratrol no Rancimat (120 °C e fluxo de ar de 10 L/h).....	60
<b>Tabela 14</b>	Absorbâncias das soluções de DPPH a 518 nm nas diferentes concentrações utilizadas.....	70

## 1. INTRODUÇÃO:

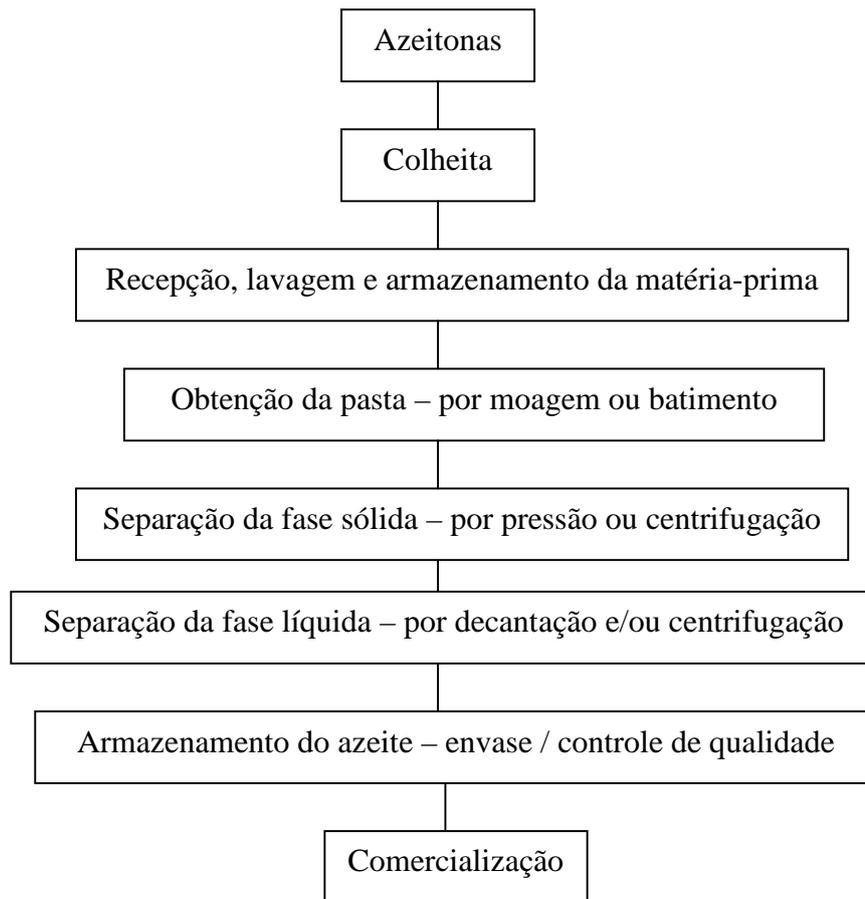
### 1.1. Azeite de oliva:

Óleos e gorduras são substâncias de origem animal ou vegetal, insolúveis em água, formadas, predominantemente, de triglicerídios que diferem em sua aparência física à temperatura ambiente: óleos são líquidos e gorduras, sólidas (MORETTO; ALVES, 1986).

Dentre os óleos vegetais comestíveis comercializados mundialmente, o azeite de oliva é um dos mais importantes e antigos do mundo, sendo largamente utilizado nos países da região mediterrânea (MORETTO; ALVES, 1986; PEIXOTO; SANTANA; ABRANTES, 1998; RUNCIO et al., 2008).

Para obtenção do azeite, a matéria-prima colhida (azeitonas) deve ser processada em curto espaço de tempo, visando limitar a hidrólise enzimática. Na indústria, são lavadas e trituradas até formar uma pasta que sofrerá prensagem (método tradicional) ou centrifugação (método moderno) para extração do azeite (Figura 1). Utiliza-se em torno de seis quilos de azeitonas para que um litro de azeite seja obtido (PEREIRA; BARCELOS, 2003; OLIVA, 2008a).

Segundo o *International Olive Oil Council* (IOOC, 2007), azeite de oliva virgem é aquele obtido do fruto da oliveira (*Olea europaea*, L.) por processos mecânicos ou físicos, sob condições que não geram alterações no óleo.



**Figura 1:** Fluxograma de obtenção do azeite de oliva extra virgem (adaptado de PEREIRA; BARCELOS, 2003).

O azeite de oliva considerado de melhor qualidade é o extra virgem, obtido da primeira prensagem, a frio, de azeitonas (ANGELIS, 2001; AUED-PIMENTEL et al., 2002).

Internacionalmente, existem vários órgãos que regulamentam a classificação e os padrões de identidade e qualidade (PIQ) do azeite de oliva, como: Comissão do *Codex Alimentarius da Food and Agriculture Organization for United Nations* (FAO), Comissão da União Européia e *International Olive Oil Council* (IOOC) e, os que padronizam a metodologia utilizada para as análises como o *American Oil Chemists' Society* (AOCS, 2004).

No Brasil, o azeite de oliva é regulamentado de acordo com a RDC nº. 270, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que determina que “a

identidade de óleos vegetais, incluindo azeites de oliva, e gorduras vegetais deve atender aos requisitos de composição estabelecidos em normas do *Codex Alimentarius*” (ANVISA, 2005).

Segundo a Associação Brasileira de Produtores, Importadores e Comerciantes de Azeite de Oliva (OLIVA), o consumo mundial vem apresentando, desde 1995, taxa de crescimento médio anual de 6%, com consumo médio de 2,768 milhões de toneladas (t) (períodos: 2000/2001 a 2002/2003). Os países da União Européia representam 71,5% do consumo mundial e a Itália é o maior mercado consumidor (740 mil t/ano), seguido por Espanha (610 mil t/ano) e Grécia (270 mil t/ano) (OLIVA, 2008b).

Não há produção comercial de azeite de oliva no Brasil e o mercado de azeites do país apresenta vendas de, aproximadamente, 32.000 t (similares ao Japão e superiores à Austrália e Canadá). Entretanto, ainda há um grande potencial de crescimento para o consumo de azeite de oliva em nosso país, visto o consumo brasileiro, *per capita*, ser ainda muito baixo (170 g/ano), quando comparado, por exemplo, aos gregos (25 Kg/ano). Em relação ao tipo de azeite de oliva consumido, o extra virgem representa 37% do consumo no Brasil, 78% na Itália e 85% na Grécia (PEREIRA; BARCELOS, 2003; OLIVA, 2008a).

Alguns autores consideram o azeite de oliva um alimento funcional, pois possuem nutrientes que podem modificar processos celulares, gerando efeitos fisiológicos protetores (ANGELIS, 2001; MORAES; COLLA, 2006).

De acordo com a Resolução nº. 18, de 30 de abril de 1999 da ANVISA, “um alimento ou ingrediente, para alegar propriedades funcionais ou de saúde, além de possuir funções nutricionais básicas quando se tratar de nutriente pode produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica” (ANVISA, 1999).

Por outro lado, Moraes e Colla (2006) os consideram como “todo aquele que, consumido na alimentação cotidiana, pode trazer benefícios fisiológicos específicos, devido à

presença de ingredientes que demonstram capacidade de regular funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra doenças crônicas não transmissíveis”.

O azeite de oliva é rico em ácidos graxos monoinsaturados (principalmente, ácido oléico) que possuem a propriedade de reduzir as concentrações sanguíneas das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e aumentar as de alta densidade (HDL) (PACE - ASCIAK et al., 1996; BONILLA et al., 1999; ANGELIS, 2001; NISSIOTIS; TASIOULA-MARGARI, 2002; DIMITRIOS, 2006; TORRES DE PINEDO; PEÑALVER; MORALES, 2007).

A determinação da composição em ésteres de ácidos graxos ou composição em ácidos graxos é importante na detecção de fraudes em óleos vegetais e animais, seja esta feita por adição de óleo de sementes ou de amêndoas ou por adição de óleo de oliva refinado ou extraído por solventes (OLIVA, 2008a). Para esta análise a amostra sofre metilação (conversão em ésteres metílicos) a fim de se obter derivados com ponto de ebulição mais baixo que são determinados por cromatografia gasosa. Um dos métodos mais utilizados para obtenção de ésteres metílicos é o método desenvolvido por Hartman e Lago (1973), que consiste na metilação catalisada por ácido clorídrico, sendo aplicável a qualquer tipo de óleo, independente de sua acidez.

Também é elevada a quantidade de polifenóis no azeite de oliva. O azeite de oliva virgem contém entre 50 e 1000 mg/Kg de compostos fenólicos simples e compostos. Há relatos na literatura científica de que são efetivos na prevenção de doenças cardiovasculares (DCV), possuem atividade antioxidante, inibem a atividade plaquetária, têm papel importante no metabolismo de síntese dos eicosanóides, previnem ou inibem a oxidação lipídica da LDL e possuem atividade quimiopreventiva. Além destas atividades biológicas, influenciam a qualidade sensorial e estão relacionados à estabilidade oxidativa do azeite de oliva (BONILLA et al., 1999; ANGELIS, 2001; NISSIOTIS; TASIOULA-MARGARI, 2002; DIMITRIOS, 2006; TORRES DE PINEDO; PEÑALVER; MORALES, 2007).

Uma série de antioxidantes fenólicos tem sido identificada (em concentrações entre 50 e 1000 ppm) na fração polar do azeite de oliva virgem como, por exemplo: os derivados do 3-4 dihidroxifenil etanol (hidroxitirosol) e do p-hidroxifenil etanol (tirosol) (NISSIOTIS; TASIOULA-MARGARI, 2002).

Os fitosteróis (esteróis de vegetais) compõem a maior parte da matéria insaponificável (MI) dos lipídios e são reconhecidos como substâncias biologicamente ativas na prevenção de câncer, por possuírem propriedades antioxidantes e antiinflamatórias. A estrutura química destes esteróis é semelhante a do colesterol. No azeite de oliva, o conteúdo e a composição de esteróis podem variar de acordo com as condições climáticas, qualidade do fruto ou semente, condições de estocagem pré-extração, dos métodos de obtenção, refinamento do azeite e das condições de armazenamento. No azeite de oliva virgem não refinado os fitosteróis predominantes são o  $\beta$ -sitosterol (> 90%) e o estigmasterol (< 4%) (CAÑABATE-DÍAZ et al., 2007; ACÍN et al., 2007; *CODEX ALIMENTARIUS*, 2003).

### **1.2. Oxidação lipídica:**

A oxidação lipídica é um fenômeno espontâneo e inevitável, que influencia negativamente o valor comercial de óleos, gorduras e produtos a partir deles formulados, diminuindo a vida de prateleira e o valor nutritivo dos alimentos (devido à degradação de vitaminas lipossolúveis, ácidos graxos essenciais e polifenóis), levando a alterações sensoriais e podendo gerar compostos potencialmente tóxicos (epóxidos e hidroperóxidos). Sua velocidade depende da composição do óleo ou gordura, da presença de pró-oxidantes (íons metálicos) e de fatores ligados às condições de armazenamento (temperatura, exposição à luz e presença de oxigênio) (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998; BORGES; SILVA; FERREIRA, 1999; REGITANO-D'ARCE; ALMEIDA-DORIA, 2000; CAPONIO et al., 2005).

A oxidação lipídica ou rancificação oxidativa se dá em três etapas ou fases que são reconhecidas pelos produtos formados e pelas características sensoriais destes produtos em cada fase (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

Na primeira fase, denominada fase inicial ou de indução, formam-se os primeiros radicais livres e não há odor ou gosto de ranço; a segunda fase, ou de propagação, apresenta intensificação de odor e sabor desagradáveis e aumento da quantidade de peróxidos e de seus produtos de decomposição; a terceira fase ou terminação caracteriza-se por odor e sabor desagradáveis fortes, alteração na cor, na viscosidade e na composição do óleo ou gordura (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

### **1.3. Análises de monitoramento da oxidação de óleos e gorduras:**

Existem vários métodos internacionais de análise para monitoramento do processo de oxidação de óleos e gorduras. Para a análise de azeite de oliva extra virgem são utilizados, de acordo com a AOCS (2004), o índice de peróxidos (IP), acidez livre e o valor de extinção específica no ultravioleta (UV), análise espectrofotométrica no UV ou valor de extinção no UV.

A Resolução RDC nº. 270, de 22 de setembro de 2005 (ANVISA, 2005) preconiza para o monitoramento e fiscalização do azeite de oliva “os requisitos de composição estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*”: composição em ácidos graxos, IP, absorvância em  $K_{270}$ , entre outros (CODEX ALIMENTARIUS, 2003).

O índice de peróxidos (método oficial Cd 8-53, AOCS) é definido como o número de miliequivalentes (mEq) de oxigênio ativo ( $O_2$ ) ou peróxidos por quilograma de óleo ou gordura. Determina todas as substâncias (peróxidos ou produtos similares) que oxidam o iodeto de potássio a iodo (MORETTO; ALVES, 1986; AOCS, 2004).

A determinação da acidez livre (método oficial Ca 5a-40, AOCS) fornece a

percentagem de ácidos graxos livres, expressa como ácido oléico, em óleos comuns, brutos e refinados (MORETTO; ALVES, 1986; AOCS, 2004).

A análise espectrofotométrica no UV ou valor de extinção no UV (método oficial Ch 5-91, AOCS) dos óleos e gorduras pode fornecer informações quanto à sua qualidade. O grau de oxidação do azeite de oliva pode ser avaliado por este método, com leituras específicas nos comprimentos de onda de 232 e 270 nm. Para o azeite de oliva, a leitura em 270 nm é importante, pois revela a presença de cetonas insaturadas, provenientes de processo oxidativo. A classificação do azeite de oliva em categorias (extra virgem, virgem, dentre outras) foi estabelecida de acordo com os valores de extinção no UV específicos e valores acima das faixas estabelecidas podem indicar a presença de óleos refinados (AOCS, 2004; OLIVA, 2008a; TAKEMOTO et al., 2008).

#### **1.4. Estabilidade oxidativa de óleos e gorduras:**

A estabilidade oxidativa é o tempo necessário para que o óleo ou gordura comece a apresentar sinais de rancidez. É um importante parâmetro para avaliação da qualidade de óleos e gorduras, pois permite estimar sua susceptibilidade à deterioração oxidativa. Tal parâmetro depende não só da composição química, mas também da qualidade da matéria-prima, das condições a que foi submetido o produto durante o processamento e condições de estocagem (ROSALES, 1989; GARCÍA-MESA; LUQUE DE CASTRO; VALCÁRCEL, 1993; APARICIO et al., 1999).

#### **1.5. Métodos de determinação da estabilidade oxidativa:**

Para avaliar a estabilidade oxidativa ou a suscetibilidade de óleos ou gorduras à oxidação, há necessidade de serem submetidos a testes de oxidação acelerada, sob condições padronizadas e, com ponto final escolhido, no qual se observem sinais de deterioração

oxidativa (BORGES; SILVA; FERREIRA, 1999).

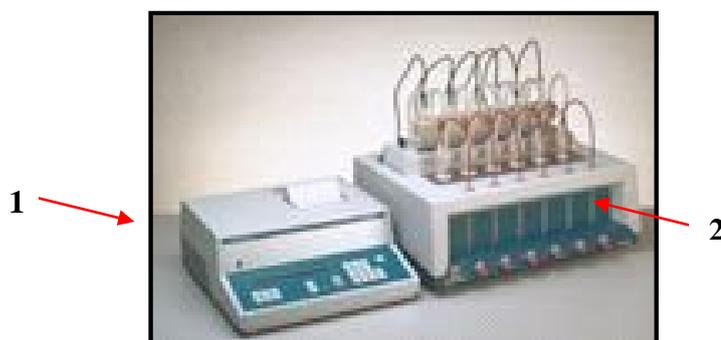
Os testes acelerados permitem estimar de forma rápida a estabilidade oxidativa de óleos ou gorduras ou a eficiência de um antioxidante, isolado ou em associação. Para acelerar a oxidação pode-se elevar a temperatura (meio mais utilizado e eficiente), adicionar metais, aumentar a pressão de oxigênio e estocar sob luz e agitação (BORGES; SILVA; FERREIRA, 1999; ANTONIASSI, 2001).

Dentre os métodos não automatizados de determinação da estabilidade oxidativa encontram-se o *Active Oxygen Method* (AOM) e o método de *Schaal* ou método de estufa. Entre os métodos automatizados pode-se citar o Rancimat (Metrohm Co, *Switzerland*), que se baseia no aumento da condutividade elétrica (GORDON; MURSI, 1994; REGITANO-D'ARCE; ALMEIDA-DORIA, 2000).

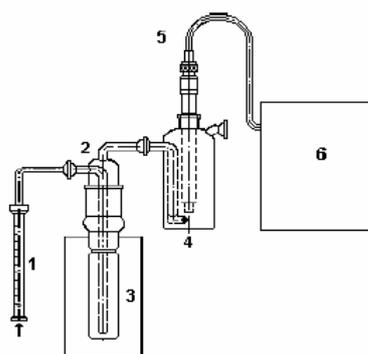
O método de *Schaal* ou de estufa (método oficial Cg 5-97, AOCS) consiste em manter as amostras envasadas em frascos de mesmo *headspace*, em estufa a 60 °C. Neste método, as amostras são analisadas, periodicamente, quanto a IP, acidez livre e ao valor de extinção no UV (AOCS, 2004). Os resultados fornecidos por este teste apresentam boa correlação com a avaliação efetuada nas condições normais de armazenamento (BORGES; SILVA; FERREIRA, 1999).

O equipamento Rancimat é basicamente composto de uma unidade computadorizada e de um bloco de aquecimento (Figura 2). Nele pode-se determinar o índice de estabilidade oxidativa ou período de indução (ponto a partir do qual ocorre rápido aumento na taxa de oxidação). Para que isto ocorra, o fluxo de ar passa pelo óleo no vaso de reação, sob aquecimento (entre 100° e 140 °C), oxidando a amostra e gerando ácidos carboxílicos voláteis, os quais são recebidos em água destilada (contida nos vasos de recepção) aumentando sua condutividade elétrica. A alteração na condutividade é captada por eletrodos de platina que levam esta informação à unidade computadorizada do equipamento, gerando

uma curva de condutividade elétrica ( $\mu\text{s}$ ) *versus* tempo e apresentando o resultado calculado do período de indução (Figura 3). O equipamento desliga-se automaticamente ao final da reação de oxidação (ROSALES, 1989; BORGES; SILVA; FERREIRA, 1999; RAMALHO; JORGE, 2006a).



**Figura 2:** Equipamento Rancimat 679 Metrohm Co (Switzerland). 1- Unidade computadorizada; 2- Bloco de aquecimento.



**Figura 3:** Esquema de funcionamento do equipamento Rancimat, onde: 1- rotâmetro; 2- vaso de reação; 3- bloco de aquecimento; 4- vaso de recepção dos voláteis; 5- eletrodo de platina; 6- amplificador do sinal de condutividade elétrica.

Fonte: HALBAUT et al. (1997).

### **1.6. Antioxidantes:**

Antioxidantes são compostos que podem retardar ou inibir a propagação das reações em cadeia geradas pelos radicais livres, assim como a oxidação de lipídios e outras moléculas (BIANCHI; ANTUNES, 1999; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária, principalmente de frutas e hortaliças, pode produzir uma ação protetora efetiva em processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo. Desta forma, considera-se importante o aumento da ingestão de antioxidantes na dieta humana através dos compostos antioxidantes encontrados nos alimentos *in natura* ou mesmo por meio do enriquecimento de alimentos com estas substâncias (BIANCHI; ANTUNES, 1999; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Muitos antioxidantes têm sido isolados de diversas matérias-primas vegetais: ervas, folhas, frutas, raízes, condimentos e óleos extraídos de sementes, cujas propriedades antioxidantes são atribuídas, principalmente, aos seus componentes fenólicos (SOONG; BARLOW, 2004).

A atividade antioxidante de um composto varia de acordo com seu tipo e sua concentração. A determinação da eficácia da adição de um antioxidante em um alimento corresponde, freqüentemente, à medida do aumento do seu período de indução (BORGES; SILVA; FERREIRA, 1999; ANTONIASSI, 2001).

Os agentes antioxidantes já são rotineiramente empregados nas indústrias de alimentos, porém na maioria das vezes, a escolha para a adição baseia-se apenas no aumento da vida de prateleira dos alimentos processados, não se preocupando com a função protetora que estas substâncias possuem (SOONG; BARLOW, 2004).

Alguns antioxidantes fenólicos sintéticos como o t-butil-hidroxi-tolueno (BHT), butil-hidroxi-anisol (BHA) e t-butil-hidroquinona (TBHQ) são utilizados em óleos por serem

efetivos e de custo menos elevado, quando comparados a alguns antioxidantes naturais. No entanto, podem causar danos à saúde e têm seu uso restrito em alguns países. Alguns estudos demonstraram possíveis danos por eles causados, em animais: o BHA pode induzir aumento da atividade hepática, deficiência no crescimento e formação de carcinoma; o BHT mostrou-se tóxico ao fígado, rins e pulmões; ao TBHQ foi atribuída a redução do nível de hemoglobina sérica (REGITANO-D'ARCE; ALMEIDA-DORIA, 2000; ARUMUGHAN et al., 2004; RAMALHO; JORGE, 2006 a; RAMALHO; JORGE; 2006 b; PAN et al., 2007; TORRES DE PINEDO; PEÑALVER; MORALES, 2007).

Portanto, torna-se necessário identificar novas substâncias com capacidade antioxidante satisfatória e menor toxicidade que possam ser adicionadas aos alimentos, prolongando sua vida de prateleira e, possivelmente, prevenindo algumas doenças (BORGES; SILVA; FERREIRA, 1999; SOONG; BARLOW, 2004; TORRES DE PINEDO; PEÑALVER; MORALES, 2007).

### **1.7. Determinação da atividade antioxidante:**

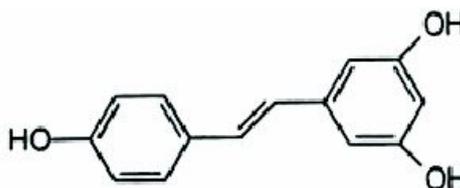
Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, em frutas e vegetais *in natura* e seus derivados, entre elas: *2,2-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic-acid)* (ABTS), *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH), *ferric reducing antioxidant power* (FRAP) e *oxygen radical absorption capacity* (ORAC) (THAIPONG et al., 2006).

O método do DPPH é um dos mais utilizados e consiste em avaliar a capacidade dos antioxidantes em seqüestrar o radical livre DPPH•, que é reduzido formando difenil-picril-hidrazina. Tal capacidade pode ser monitorada pelo decaimento da absorbância em função do tempo. Quanto mais rápido é o decaimento da absorbância, maior a habilidade de doar íons hidrogênio. Os resultados podem ser expressos como percentagem de seqüestro de radicais

livres (%SRL) (JOUBERT; VON GADOW; HANSMANN, 1997; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; SOUSA et al., 2007).

### 1.8. *Trans-resveratrol*:

O 3, 5, 4' - trihidroxiestilbeno é uma substância fenólica presente em mais de 70 espécies vegetais, sob duas formas isômeras: *trans-resveratrol* (*trans*-3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) e *cis-resveratrol* (*cis*-3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno), porém somente o isômero *trans* (Figura 4) é ativo (VIÑAS et al., 2000; FILIP et al., 2003; PENNA; HECKTHEUER, 2004; SAUTTER et al., 2005).

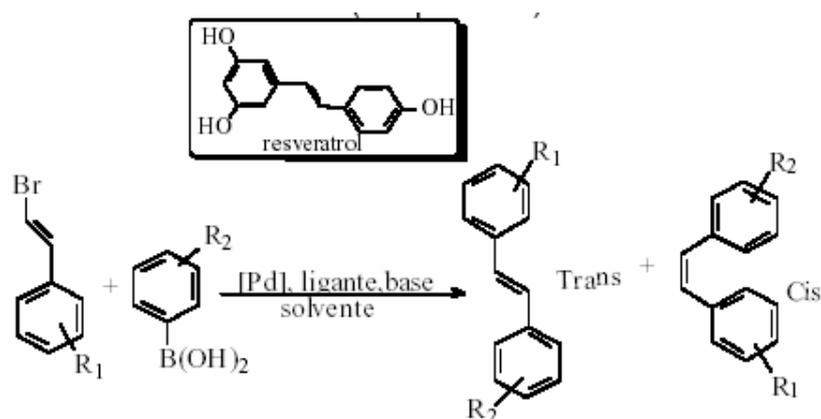


**Figura 4:** Estrutura química do *trans*-3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno (*trans-resveratrol*).

Fonte: PENNA; HECKTHEUER, 2004.

O *trans-resveratrol* é encontrado no eucalipto, no amendoim e na amora, mas são as uvas tintas (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*), principalmente as cascas, sua principal fonte. Faz parte de um conjunto de compostos denominados fitoalexinas que possuem atividade antimicrobiana e são produzidos pelos vegetais em resposta a estímulos exógenos como: radiação UV e, particularmente, infecções fúngicas por *Botrytis cinerea* e *Plasmopora viticola* (RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2002; FILIP et al., 2003; MACÍAS et al., 2003; PENNA; HECKTHEUER, 2004; SAUTTER et al., 2005; ŞENER et al., 2006).

Também pode ser sintetizado a partir da reação de acoplamento de Suzuki (Figura 5), que promove o acoplamento entre arilas halogenadas e arilas organoboradas, por meio de catalisador contendo paládio e que gera um grande número de estruturas, com variação na natureza das arilas (OLIVEIRA et al., 2006). Este método é bastante difundido, por causa de sua tolerância à presença de vários tipos de grupos funcionais presentes nos substratos. Além disso, esta metodologia é mais eficiente devido à síntese relativamente simples dos ácidos arilborônicos e seus derivados e a razoável estabilidade dos reagentes empregados em meio aquoso e sob atmosfera oxidante (SANTOS et al., 2007).



**Figura 5:** Esquema geral para a síntese de *trans*-estilbenos substituídos.

Fonte: NOBRE; PEIXOTO; MONTEIRO, 2006.

Segundo Soleas, Diamandis e Goldberg (1997), Chen, Wu e Chiou (2002), Rodríguez-Delgado et al. (2002) e Penna e Hecktheuer (2004), o conteúdo de *trans*-resveratrol nos frutos varia de acordo com a cultivar, a origem geográfica, a umidade do solo e o estágio de maturação do vegetal.

A literatura atribui diversas atividades ao *trans*-resveratrol, dentre elas estão: atividade antioxidante, prevenindo ou retardando o processo de oxidação de lipídios e de lipoproteínas (principalmente, LDL); atividade antiinflamatória, como modulador na síntese de

eicosanóides e bloqueio da produção de prostaglandinas; atividade quimiopreventiva inibindo a iniciação e progressão de tumores como os de mama e de pele (em ratos); prevenção de DCV devido ao aumento plasmático de HDL (modulação do metabolismo lipídico e de lipoproteínas) e inibição da agregação plaquetária; ação neuroprotetora através da redução do estresse oxidativo de células neuronais; papel hepatoprotetor em relação à toxicidade do acetaminofeno (analgésico) e atuação como fitoestrógeno e vasodilatador (PACE-ASCIAK et al., 1996; SOLEAS; DIAMANDIS; GOLDBERG; 1997; FRÉMONT, 2000; VIÑAS et al., 2000; CHEN; WU; CHIOU, 2002; RODRÍGUEZ - DELGADO et al., 2002; FILIP et al., 2003; GAO et al., 2003; MACÍAS et al., 2003; PENNA; HECKTHEUER, 2004; ŞENER et al., 2006; TORRES DE PINEDO; PEÑALVER; MORALES, 2007).

O *trans*-resveratrol inibe a peroxidação lipídica, no entanto, este mecanismo de inibição não está totalmente elucidado, mas sabe-se que ele a inibe, principalmente pelo carregamento de radicais lipídicos peroxil de modo semelhante ao  $\alpha$ -tocoferol, mas com menor eficiência (MACÍAS et al., 2003).

A literatura relata que o *trans*-resveratrol é o principal fator de proteção à saúde, encontrado no vinho (CHEN; WU; CHIOU, 2002; SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2003; PENNA; HECKTHEUER, 2004).

Segundo Souto et al. (2001), em vinhos tintos têm sido encontradas concentrações de *trans*-resveratrol diferentes, de acordo com o país de origem: Portugal (1,00 mg/L), Chile/Argentina (1,21 mg/L), Grécia (0,87 mg/L) e Estados Unidos (0,13 mg/L). De acordo com Vinãs et al. (2000) a concentração de resveratrol nos vinhos é normalmente menor que 1 mg/L.

No que diz respeito aos vinhos tintos e os sucos de uva brasileiros, de acordo com Penna e Hecktheuer (2004) e Sautter *et al.* (2005), possuem um valor médio de resveratrol de 2,57 mg/L e entre 0,19 e 0,90 mg/L, respectivamente.

A *American Dietetic Association* (ADA, 2004) recomenda que o consumo diário de suco de uva ou vinho tinto entre 240 e 480 mL (baseando-se no resveratrol como composto bioativo) reduz a agregação plaquetária. Como somente a forma *trans* do resveratrol é ativa (FILIP et al., 2003; SAUTTER et al., 2005), fazendo uma estimativa considerando a média de *trans*-resveratrol em vinhos encontrada por Sautter et al. (2005): 2,57 mg/L, poder-se-ia entender que a recomendação da ADA (2004), em relação ao *trans*-resveratrol seria de 0,62 a 1,23 mg de *trans*-resveratrol por dia.

Pace-Asciak et al. (1996) compararam a absorção de *trans*-resveratrol proveniente de vinho tinto, vinho branco, suco de uva comercial e suco de uva enriquecido (enriquecido com *trans*-resveratrol) em homens que consumiram 500 mL/dia, durante um mês. Concluíram que o *trans*-resveratrol no suco de uva também pode ser absorvido em quantidade suficiente para desempenhar funções biológicas diversas.

Segundo Frémont (2000), sua absorção ocorre no intestino delgado e o glicosídeo do resveratrol pode ser absorvido do suco de uva da mesma forma que o glicosídeo dos flavonóides.

Juan, Vinardell e Planas (2002) administraram diariamente, via oral, em ratos (*Sprague-Dawley*) machos, 20 mg de *trans*-resveratrol/Kg de peso da cobaia, durante o período de 28 dias. O peso corporal e o consumo de alimentos e água não diferiram entre os ratos tratados com *trans*-resveratrol e o grupo controle. As variáveis hematológicas e bioquímicas bem como os resultados do exame histopatológico dos órgãos autopsiados não revelaram alterações, demonstrando que o *trans*-resveratrol utilizado em altas concentrações não foi nocivo aos ratos.

Apesar de não existirem relatos de contra-indicações, torna-se necessária cautela quanto à utilização de extratos de *trans*-resveratrol não padronizados ou extraídos sem técnica farmacêutica controlada, pois não se pode assegurar eficácia, existindo a possibilidade de que

eles contenham outras substâncias não especificadas e que possam promover algum efeito tóxico (JUAN; VINARDELL; PLANAS, 2002; MASTEN; HANEKE, 2002).

Marinova, Yanishlieva e Totseva (2002) adicionaram *trans*-resveratrol nas concentrações de: 0,02; 0,05; 0,10 e 0,20% (0,02; 0,05; 0,10 e 0,20 ppm, respectivamente) em triacilgliceróis purificados de banha, óleo de girassol e de óleo de girassol comercial. As amostras foram submetidas à oxidação, no escuro, a 100 °C ( $\pm 0,2$  °C), com fluxo de ar de 100 mL/min. O *trans*-resveratrol aumentou o período de indução tanto dos triacilgliceróis purificados da banha quanto do óleo de girassol, sendo mais efetivo sobre os triacilgliceróis purificados da banha (concentração: 0,20%). No óleo de girassol comercial não apresentou atividade antioxidante.

Marinova, Yanishlieva e Toneva (2004) adicionaram diferentes concentrações de antioxidantes (100 ppm de *trans*-resveratrol,  $\alpha$ -tocoferol; 50 ppm e 100 ppm de ácido caféico e 50 ppm de quercetina) a óleo de girassol e investigaram o sinergismo (aumento da atividade antioxidante obtido pela combinação de vários antioxidantes) dos fenólicos presentes no vinho tinto (resveratrol, ácido caféico, quercetina) e o  $\alpha$ -tocoferol, na oxidação de triglicerídios em óleo de girassol comercial a 100 °C ( $\pm 0,2$  °C), com fluxo de ar de 50 mL/min. As combinações de *trans*-resveratrol (100 ppm) tanto com o ácido caféico (50 ppm) quanto com a quercetina (50 ppm) foram sinérgicas na prevenção da oxidação lipídica.

Filip *et al.* (2003) adicionaram *trans*-resveratrol nas concentrações: 0,01; 0,02; 0,05 e 0,10% (0,01; 0,02; 0,05 e 0,10 ppm, respectivamente) para testar seu efeito antioxidante nos óleos de girassol e de canola. Os melhores resultados foram observados com a adição de 0,10%, em ambos os óleos.

## 2. JUSTIFICATIVA:

Existem relatos na literatura de que o mercado consumidor mundial de azeite encontra-se em expansão, além dos diversos estudos que suportam e/ou embasam as propriedades do azeite de oliva, os benefícios da presença de antioxidantes na dieta e, mais especificamente, os efeitos antioxidantes positivos do *trans*-resveratrol. Associando-se a estes benefícios, a escassez de dados no Brasil sobre a utilização do *trans*-resveratrol como antioxidante adicionado a alimentos e, sobre seu papel na estabilidade oxidativa de óleos comestíveis, torna-se relevante, interessante e inédita, a possibilidade de aumentar a vida de prateleira do azeite de oliva extra virgem por meio da adição de *trans*-resveratrol. Esta adição poderá, não só agregar valor comercial ao produto, mas também auxiliar na manutenção de suas propriedades funcionais por um maior intervalo de tempo.

### **3. OBJETIVOS:**

#### **3.1. Objetivo geral:**

- Adicionar *trans*-resveratrol ao azeite de oliva extra virgem, a fim de verificar a sua estabilidade oxidativa.

#### **3.2. Objetivos específicos:**

- Selecionar entre diferentes marcas e procedências de azeite de oliva extra virgem, amostras com maior estabilidade oxidativa que atendam aos padrões de identidade e qualidade para azeite de oliva extra virgem estabelecidos pelo IOOC (2003);

- Monitorar, avaliar e comparar a estabilidade oxidativa do azeite de oliva extra virgem (sem e com adição de *trans*-resveratrol) ao longo do tempo em estufa com circulação de ar a 60 °C, ao abrigo da luz;

- Quantificar o *trans*-resveratrol, adicionado ao azeite de oliva extra virgem, ao longo do armazenamento em estufa com circulação de ar a 60 °C, no escuro;

- Determinar a atividade antioxidante do *trans*-resveratrol, comparando com quercetina e BHT.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS:

### 4.1. Amostras:

#### 4.1.1. Critérios de compra:

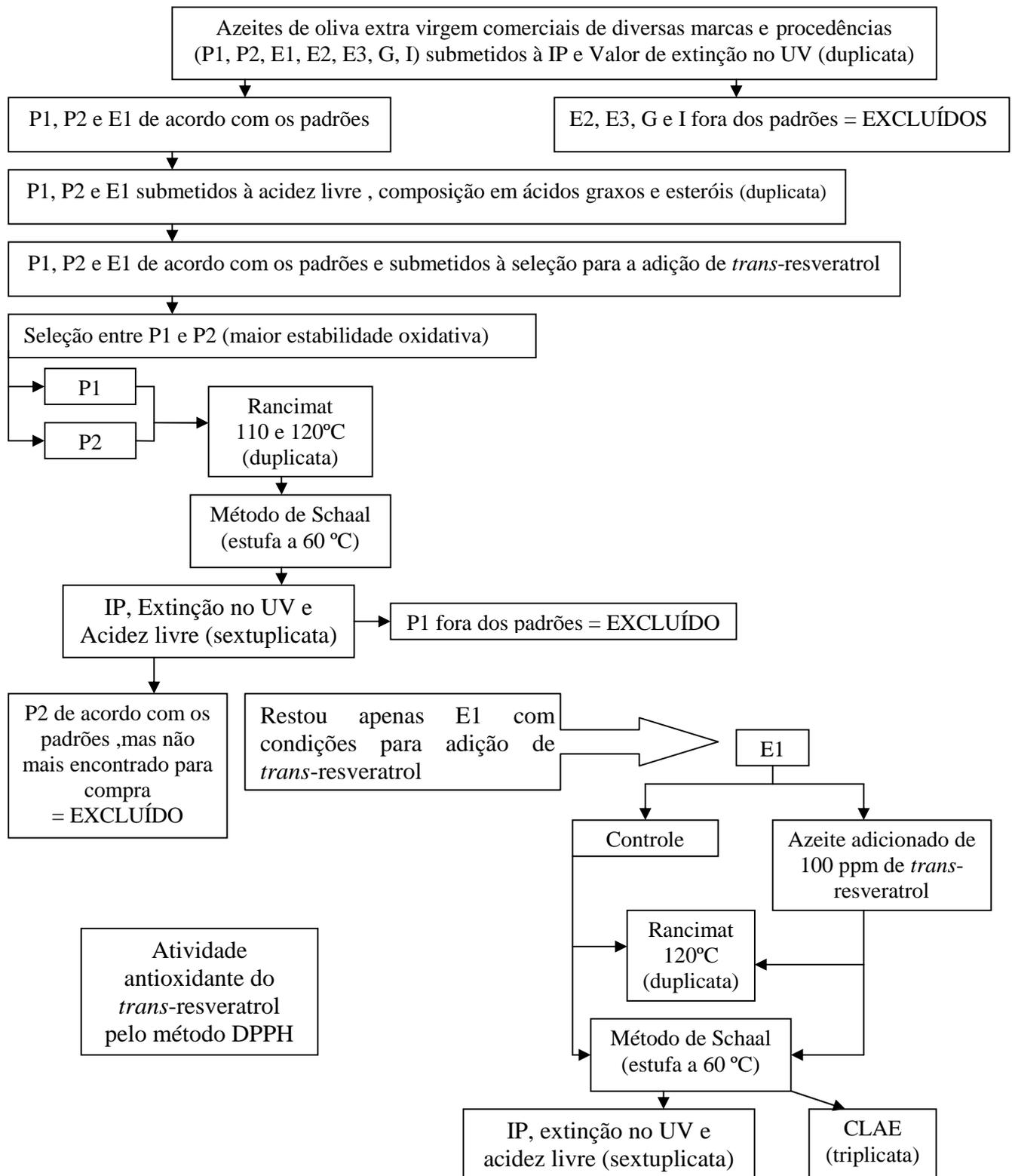
Foram adquiridos em supermercados do Município do Rio de Janeiro (RJ), azeites de oliva extra virgem de diferentes marcas e procedências, sendo: duas marcas portuguesas (P1 e P2), três espanholas (E1, E2 e E3), uma grega (G) e uma italiana (I) (Tabela1).

Os critérios para a compra dos azeites foram: a) serem produzidos e embalados no exterior (país de origem); b) serem encontrados na maioria dos estabelecimentos pesquisados (marcas com maior frequência) e, c) possuírem data de envase próximas, entre si, e o mais próximo, possível, da data de compra.

**Tabela 1:** Codificação adotada para as amostras de azeites de oliva extra virgem de diferentes marcas e procedências.

Procedência dos azeites de oliva extra virgem de marcas diferentes	Codificação adotada
Português 1	P1
Português 2	P2
Espanhol 1	E1
Espanhol 2	E2
Espanhol 3	E3
Grego	G
Italiano	I

Na Figura 6 pode ser observado o fluxograma contendo o delineamento relativo aos procedimentos e métodos adotados.



**Figura 6:** Fluxograma e delineamento dos procedimentos gerais do trabalho.

#### 4.1.2. Padrões de identidade e qualidade:

Foram adotados como parâmetros neste estudo, os padrões de identidade e qualidade (PIQ) para azeite de oliva extra virgem estabelecidos pelo IOOC (2003) (Tabela 2) e de acordo com a legislação brasileira, que se baseia nos valores estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (2003) em relação à composição em ácidos graxos e esteróis (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 2:** Padrões de identidade e qualidade (PIQ) para azeite de oliva extra virgem: índice de peróxidos (IP), acidez livre e valor de extinção no UV.

Índice de Peróxidos (mEq O <sub>2</sub> /Kg de azeite)	Acidez livre (% de ácido oléico)	Valor de extinção específica no UV (nm)		
		K <sub>232</sub>	K <sub>270</sub>	ΔK
≤ 20	≤ 0,8	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,001

Fonte: IOOC (2003).

**Tabela 3:** Valores estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (2003) em relação à composição em ácidos graxos de azeite de oliva virgem.

Fórmula	Ácido graxo	<i>Codex Alimentarius</i> (2003) (%)
C 16:0	Palmítico	7,5 - 20,0
C 16:1	Palmitoléico	0,3 - 3,5
C 18:0	Estearico	0,5 - 5,0
C 18:1	Oléico	55,0 - 83,0
C 18:2	Linoléico	3,5 - 21,0
C 20:0	Araquídico	< 0,6
C 18:3	Linolênico	< 0,9
C 20:1	Eicosanóico	< 0,4

Fonte: *Codex Alimentarius* (2003).

**Tabela 4:** Valores estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (2003) em relação à composição em esteróis de azeite de oliva virgem.

Esteróis	<i>Codex Alimentarius</i> (2003) (%)
Campesterol	≤ 4,0
Estigmasterol	< Campesterol
β-sitosterol aparente (incluindo Δ-5-avenasterol)	≥ 93,0

Fonte: *Codex Alimentarius* (2003).

#### 4.1.3. Seleção prévia para adição de *trans*-resveratrol:

Azeites de oliva extra virgem de diferentes marcas e procedências foram analisados quanto ao IP e ao valor de extinção no UV, em duplicata, imediatamente após a abertura dos frascos, a fim de que somente marcas e lotes em conformidade com os PIQ do IOOC (2003) pudessem ser selecionadas (Tabela 2).

Os azeites em conformidade com os PIQ do IOOC (2003) em relação ao IP e valor de extinção no UV (P1, P2 e E1) (Tabela 2) foram então submetidos às análises de acidez livre, composição em ácidos graxos e em esteróis, cujos resultados também mostraram conformidade com os padrões (IOOC, 2003 e *Codex Alimentarius*, 2003) (Tabelas: 2, 3 e 4 respectivamente). O que indica que tanto P1 quanto P2 e E1 poderiam ser adicionados de *trans*-resveratrol.

No entanto, a adição de *trans*-resveratrol aos três azeites exigiria um número muito extenso de vidrarias, gasto excessivo de reagentes e matéria-prima, necessidade de equipamentos com maior capacidade (por exemplo: estufa) e uma equipe maior para realizar as análises, fatores inviáveis para o laboratório onde o experimento foi executado. Desta forma, tentou-se minimizar o problema utilizando-se um azeite de origem portuguesa e outro

de origem espanhola. Como foram obtidos dois azeites de origem portuguesa (P1 e P2) dentro dos padrões, tornou-se necessário escolher, dentre eles, o de maior estabilidade oxidativa para juntamente com o azeite de origem espanhola E1 ser adicionado de *trans*-resveratrol e para isto utilizou-se o método de *Schaal* (teste acelerado) (método oficial Cg 5-97 da AOCS, 2004).

O preparo das amostras P1 e P2 para o método de *Schaal* ocorreu da seguinte forma: dois frascos de lotes iguais de cada uma das marcas (500 mL) foram misturados a fim de que se obtivesse 1L de cada marca.

Após homogeneização das amostras, retirou-se, cerca de 42 ml de cada amostra, para as análises de IP, acidez livre, valor de extinção no UV e índice de estabilidade oxidativa no Rancimat no tempo zero, e transferiu-se o restante para frascos de vidro transparente idênticos, com 2 cm de diâmetro e mesmo *headspace*. O volume dos frascos foi completado com azeite até a altura de 4,3 cm, com relação área/volume de, aproximadamente, 0,24 e colocados sem tampa em estufa (Memmert) a 60 ° C, com circulação de ar (fluxo de 3 L/h), por um período de 10 dias.

Diariamente, foram retirados da estufa três frascos, dos quais foram recolhidas amostras para as análises de IP, acidez livre e valor de extinção no UV, realizadas em sextuplicata no Laboratório de Óleos Graxos do CTAA/ Embrapa Agroindústria de Alimentos.

#### **4.1.4. Adição de *trans*-resveratrol:**

Uma vez que o azeite de oliva extra virgem de origem espanhola (E1) apresentou as melhores características (IP, valor de extinção no UV, acidez livre, composição em ácidos graxos, esteróis e Rancimat) para a adição de *trans*-resveratrol, quatro litros (8 frascos de 500 mL; aproximadamente 3,6 Kg) de azeite E1, de mesmo lote, foram misturados e

homogeneizados em béqueres e separados em dois grupos: azeite controle (aproximadamente 1,8 Kg) e azeite para ser adicionado de *trans*-resveratrol (1,8 Kg) e submetidos ao método de *Schaal*.

Pesou-se cerca de 0,18 g de *trans*-resveratrol (Sigma, 99% de pureza), que foi solubilizado em 5 mL de acetona (Tedia) e em 50 mL de álcool etílico (Tedia) a 95% e adicionado a 1,8 Kg de azeite (100 ppm, de acordo com Marinova, Yanishlieva e Toneva, 2004). Posteriormente, o azeite foi submetido a banho de ultra-som até completa homogeneização. A remoção dos solventes foi realizada com nitrogênio sob aquecimento brando ( $\pm 27^\circ\text{C}$ , em placa Corning – *Stirer/ Hot Plate*) por aproximadamente 6 horas.

Cerca de 12g dos azeites espanhóis foram retiradas para a realização das análises (IP, acidez livre, valor de extinção no UV e Rancimat) no tempo zero e transferiu-se o restante para frascos de vidro transparentes idênticos (2 cm de diâmetro e mesmo *headspace*) conforme procedimento descrito anteriormente (altura: 4,3 cm, relação área/volume: 0,24; colocados sem tampa em estufa com circulação de ar, fluxo: 3 L/h, a  $60^\circ\text{C}$ ) por um período de 37 dias. Ao longo deste período, 3 frascos foram retirados, periodicamente, da estufa, e analisados quanto a: IP, acidez livre e valor de extinção no UV, em sextuplicata e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em triplicata.

## **4.2. Análises realizadas:**

### **4.2.1. Índice de peróxidos:**

Para a determinação do IP, pesou-se em balança analítica digital (Mettler Toledo AB 204), 1 g de azeite em erlenmeyer de boca esmerilhada de 250 mL, dissolveu-se com 30 mL de solução 3:2 de ácido acético glacial (Tedia) e clorofórmio (Merck) e adicionou-se 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio (Spectrum). O frasco foi fechado e agitado manual e periodicamente, por um tempo total de 60 segundos. Decorrido este tempo, adicionou-se água

destilada (30 mL) e titulou-se, sob agitação magnética (titulador automático Metrohm 655 Dosimat e placa magnética Ika RH-KT/ C) com solução de tiosulfato de sódio (Merck) 0,01N, até o aparecimento de coloração amarelo claro. A partir deste ponto, adicionou-se solução de amido (Merck) a 1% e titulou-se, novamente, até o desaparecimento da coloração. Paralelamente, foi realizado, um ensaio em branco. A análise foi realizada em sextuplicata e os resultados foram expressos em mEq (miliequivalentes) de oxigênio ativo (O<sub>2</sub>)/Kg de azeite de oliva extra virgem (método oficial Cd 8-53 da AOCS, 2004).

O IP em mEq O<sub>2</sub> ou peróxidos/Kg foi calculado a partir da fórmula:

$$\text{IP (mEq O}_2\text{/Kg)} = \frac{(a-b) \times N \times 1000}{P}$$

Onde:

a = volume da solução de tiosulfato de sódio gasto na amostra (mL)

b = volume da solução de tiosulfato de sódio gasto no branco (mL)

N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio

P = peso da amostra (g)

#### **4.2.2. Valor de extinção específica no UV:**

Para a determinação do valor de extinção no UV, foram pesados em balança analítica digital (Mettler Toledo AB 204) 100 mg de azeite, em balões volumétricos de 10 mL, completando-se o volume com isoctano grau espectrofotométrico (Tedia), em sextuplicata. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro Specord 210 (Analytikjena) utilizando-se cubetas de quartzo de 10 mm (Micronal –  $\lambda = 200$  a 380 nm, em UV), nos comprimentos de 232 e 270 nm para avaliação da qualidade do azeite e, de 266 e 274 nm para o cálculo de  $\Delta K$  (método oficial Ch 5-91 da AOCS, 2004).

Antes de cada análise, foi realizada a verificação do espectrofotômetro a fim se confirmar a calibração do equipamento. Tal verificação foi realizada com azeites considerados padrão, fornecidos pelo IOOC, cujos valores de  $K_{270}$  são conhecidos (Tabela 5) e observou-se que o equipamento estava corretamente calibrado.

**Tabela 5:** Verificação do espectrofotômetro Specord 210 (Analytikjena) de acordo com valores de azeites considerados padrões fornecidos pelo IOOC.

Azeites de oliva	Valores $K_{270}$ padrão		Valores $K_{270}$ encontrados		
	IC*	Média	1**	2**	Média***
IOOC 30-06	0,215 a 0,185	0,200	0,207	0,1941	0,2006
IOOC 31-06	0,366 a 0,406	0,386	0,378	0,3771	0,3413

\* IC= intervalo de confiança

\*\* Duplicata

\*\*\* Média de duas determinações

O cálculo de valor de extinção específica foi realizado de acordo com a seguinte fórmula:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ ou } K \text{ (nm)} = \frac{\lambda \times 0,1000\text{g} \times V}{P \times 10 \text{ mL}}$$

Onde:

$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  ou  $K$  = valor de extinção específica (nm)

$\lambda$  = comprimento de onda (nm)

V=volume do balão (mL)

P = peso da amostra (g)

O cálculo de  $\Delta K$  foi efetuado com a seguinte fórmula:

$$\Delta K = K_{270} - (K_{266} + K_{274}) / 2$$

Onde:

$K_{270}$  = absorvância em 270 nm

$K_{266}$  = absorvância em 266 nm

$K_{274}$  = absorvância em 274 nm

#### 4.2.3. Acidez livre:

Para determinação da acidez foi pesado, em balança analítica digital (Mettler Toledo AB 204), 1 g de azeite, posteriormente dissolvido em 30 mL de álcool etílico 95% (Tedia), previamente neutralizado com solução 0,01 N de hidróxido de sódio (Merck). Adicionou-se solução alcoólica de fenolftaleína 1% (Spectrum) e levou-se a amostra a aquecimento brando ( $\pm 30$  °C, em placa Corning – Stirrer/ *Hot Plate*), previamente aquecida, por 30 segundos). Titulou-se (bureta calibrada de 10 mL) com solução de hidróxido de sódio 0,01 N até a manutenção da cor rósea por 60 segundos. Esta análise foi realizada em sextuplicata e os resultados foram expressos em % de ácido oléico (método oficial Ca 5a-40 da AOCS, 2004).

O cálculo de acidez livre foi realizado de acordo com a fórmula:

$$AGL\% = \frac{V \times N \times 28,2}{P}$$

P

Onde:

AGL% = porcentagem de ácidos graxos livres

V = volume da solução de NaOH gasto na amostra (mL)

N = normalidade da solução de NaOH, devidamente, padronizada segundo o método oficial Ca 5a-40 da AOCS (2004)

P = peso da amostra (g)

#### 4.2.4. Composição em ésteres de ácidos graxos – Método Hartman e Lago (1973):

A composição em ésteres de ácidos graxos ou composição em ácidos graxos foi determinada, em duplicata, por cromatografia gasosa de alta resolução após preparo dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME – *Fatty Acid Methyl Ester*) de acordo com o método descrito por Hartman e Lago (1973). Pesou-se em balança analítica digital (Mettler Toledo AB 204) 0,2 g de azeite em balão de fundo redondo de 125 mL, adicionou-se 2,5 mL de solução metanólica de hidróxido de potássio (Merck) a 0,5 N. O balão foi conectado ao condensador e mantido em manta de aquecimento. A amostra foi mantida sob refluxo por 4 minutos, a partir do início da condensação do solvente, sendo retirada do balão somente após o resfriamento. A seguir, acrescentou-se 7,5 mL de reagente de esterificação (120 mL de metanol P.A., 4 g de cloreto de amônio P.A. e 6 mL de ácido sulfúrico concentrado P.A., todos Merck). Realizou-se novo refluxo por mais 3 minutos, retirou-se novamente o aquecimento, mantendo-se o balão conectado ao condensador. Em seguida, adicionou-se 15 mL de álcool etílico 95% P.A. (Tedia) e 25 mL de água destilada e transferiu-se o conteúdo para um funil de separação de 250 mL. O funil de separação foi tampado e agitado, repetidas vezes, até a formação de duas camadas líquidas límpidas (superior: etérea e inferior: aquosa). Descartou-se a fase aquosa e filtrou-se a fase etérea em sulfato de sódio anidro P.A. (Tedia) para balão de fundo redondo de 50 mL. Evaporou-se o solvente no evaporador rotativo (Buchi modelo 121 com banho modelo RE 461), passou-se em corrente de nitrogênio e pesou-se o FAME. A amostra foi diluída em diclorometano (Tedia) até concentração final de 1%.

Para a análise cromatográfica foi utilizado o cromatógrafo HP 5890 (Hewlett Packard, Series II) e a coluna Quadrex 007 Cyanopropyl Methyl Sil (60 m X 0,32 mm X 0,25 µm). A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C, a do detector a 280 °C e a temperatura inicial da coluna foi de 150 °C, com taxa de aquecimento de 1,3 °C/min. A vazão da coluna foi de 2,4 mL/min e a pressão na cabeça da coluna de, aproximadamente, 70 kPa. O volume injetado foi

de 1,0 µL com taxa de divisão de fluxo de 1:50. A identificação dos picos de ácidos graxos foi realizada através da comparação dos tempos de retenção das amostras e dos padrões (NU-CHECK: 62, 79 e 87) e a quantificação por normalização de área.

#### **4.2.5. Composição em esteróis:**

A amostra de azeite foi saponificada com solução etanólica de hidróxido de potássio (Merck). A extração da MI foi feita com solução de sabão com éter etílico e a quantidade de resíduo determinada por evaporação do solvente através da passagem de corrente de nitrogênio. A partir da MI os esteróis foram isolados por cromatografia em camada delgada (método oficial 2.404 da IUPAC, 1992) e analisados por cromatografia em fase gasosa em coluna capilar de sílica fundida de filme metil silicone HP-1 (25 m X 0,32 mm X 0,17 µm), com programação de temperatura de 260 °C a 290 °C, 3 °C/ min. Foi injetado 1 µL de amostra em injetor operado no modo de divisão de fluxo de 1:20. Os compostos foram identificados por co-injeção de padrões e a quantificação por normalização interna.

#### **4.2.6. Índice de estabilidade oxidativa no Rancimat:**

Para a análise de estabilidade oxidativa no Rancimat 679 (Metrohm Co, Switzerland) foram pesados em balança analítica digital (Mettler Toledo AB 204) 5 g de azeite (em cada um dos seis vasos de reação do equipamento). Foi feita previamente a calibração e a programação do equipamento para fluxo de ar de 10L/h e temperatura de 110 e 120 °C (para os azeites portugueses P1 e P2) e 120 °C, para o azeite espanhol (controle e adicionado de 100 ppm de *trans*-resveratrol). As análises foram realizadas em duplicata.

Os resultados (índice de estabilidade oxidativa ou período de indução), expressos em horas, são as médias dos períodos de indução calculados automaticamente pelo Rancimat com os períodos de indução calculados manualmente (ponto de interceptação de duas paralelas a

curva de condutividade elétrica ( $\mu\text{s}$ ) *versus* tempo gerada pelo Rancimat). Os gráficos gerados pelo equipamento encontram-se nos Anexos I, II e III.

A manipulação, armazenamento das amostras em estufa (método de *Schaal*) e análises acima descritas (IP, valor de extinção no UV e acidez livre) foram realizadas no Laboratório de Óleos Graxos do Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos (CTAA)/ Embrapa Agroindústria de Alimentos e a composição em ésteres de ácidos graxos e em esteróis, neste e no laboratório de Cromatografia Gasosa do CTAA, Embrapa Agroindústria de Alimentos.

#### **4.2.7. Determinação da concentração de *trans*-resveratrol por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):**

A identificação e quantificação de *trans*-resveratrol (Sigma, 99% de pureza) adicionado ao azeite de oliva extra virgem foi feita por CLAE ao longo do experimento segundo Calderón et al. (1993), com modificações.

As amostras de azeite foram envasadas em frascos de vidro transparente, limpos e com tampa, e congeladas ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até análise por CLAE. Para a análise cromatográfica foi utilizado o cromatógrafo líquido equipado com detector de absorvância e fluorescência (Shimadzu LC - 10 AS; SPD - 10 A UV/VIS; RF-535, respectivamente), coluna analítica de fase reversa Spherisorb ODS 2 (Waters, 250 mm X 4,6 mm, 5 $\mu$ ) com volume total 16,6 ml e fase móvel composta por acetonitrila (Merck): água (30:70). Para o detector de absorvância utilizou-se 306 nm e para o detector de fluorescência, emissão a 370 nm e excitação de 324 nm. O volume de amostra injetado diretamente (NOGUERA-ORTÍ, VILLANUEVA-CAMAÑAS, RAMIS-RAMOS; 1999) foi de 5  $\mu\text{L}$ , em um *loop* de 8  $\mu\text{L}$ , com fluxo de 0,25 mL/ minuto para a corrida. Antes de cada análise, a coluna era lavada com sucessivas injeções

de água e ao final, com acetonitrila (100%) (fluxo de 1mL/min). As corridas foram feitas em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

A identificação do *trans*-resveratrol foi feita por comparação do tempo de retenção e a quantificação por normalização das áreas dos picos com uma solução padrão (controle) de 100 ppm de *trans*-resveratrol.

As concentrações de *trans*-resveratrol ao longo do tempo (Figura 15) foram calculadas de acordo com Rudolf et al. (2005), a seguir:

$$x = [(y + 675.94 \mu\text{g}/\text{UA}) / 4.000.000 \text{ UA}] / 0,015 \text{ mL}$$

Onde:

x = concentração de *trans*-resveratrol (ppm)

y = área do pico

UA= unidades arbitrárias

Os gráficos (Figuras 13, 14 e 15) foram construídos no programa Prisma.

A determinação da concentração de *trans*-resveratrol por CLAE foi realizada, em triplicata, no Laboratório de agregação de proteínas e amilóides – Prof<sup>ª</sup> Débora Fogel, do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

#### **4.2.8. Atividade antioxidante do *trans*-resveratrol pelo método do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH):**

A determinação da atividade antioxidante do *trans*-resveratrol (Sigma, 99% de pureza) por DPPH foi realizada segundo Soares, Andrezza e Salvador (2003), com modificações, e os padrões utilizados para comparação foram BHT (Sigma) e quercetina (Sigma).

Foram preparados 50 mL de solução etanólica estoque de DPPH (Sigma) na concentração de 219,20 mg/L, mantidos no escuro. O espectrofotômetro (Shimadzu UV-VIS

mini 240) foi zerado (branco) com etanol (Tedia) e programado para leitura de varredura (*scan*) com a solução estoque, a fim de que fosse determinado o comprimento de onda mais adequado para leitura (518 nm).

A partir da solução estoque de DPPH foram preparadas diluições de 21,92mg/L, 43,84 mg/L, 87,68 mg/L e 109,60 mg/L. A curva de calibração foi construída a partir dos valores de absorvância de todas as diluições a 518 nm, à temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ), em triplicata, em cubetas de quartzo de 10 mm (Micronal -  $\lambda = 380$  a 780 nm, no VIS) (Figura 16).

Determinou-se a absorvância nos tempos de 15, 30 e 45 minutos, a partir do início da reação. As concentrações utilizadas para o *trans*-resveratrol foram: 1; 2,5; 5; 10; 25; 30 mg/L; para o BHT: 5; 10; 25; 50; 75; 100 mg/L e, para quercetina: 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 mg/L. O espectrofotômetro foi inicialmente “zerado”, realizada leitura de referência com o solvente das soluções, etanol, que por sua vez foi o branco do controle. Foram realizadas leituras dos controles (1 mL de solução de DPPH + 2,5 mL de etanol), utilizando o etanol como branco na cubeta de referência. As leituras das amostras (1 mL de solução de DPPH + 2,5 mL da solução da amostra) foram realizadas utilizando os brancos das respectivas amostras (2 mL de etanol + 5 mL da solução da amostra), atentou-se para que o preparo do dobro dos volumes em relação as amostras, para que pudéssemos efetuar a leitura do branco, dessa forma, “zerando” o equipamento para cada amostra, ou seja, realizando leitura de referência para os respectivos brancos. Todas as reações ocorreram em temperatura ambiente, em frascos de mesmo *headspace* e com tampa. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos como percentagem de seqüestro de radicais livres (%SRL) (Figuras 17, 18, 19, 20 e 21).

O cálculo da percentagem de seqüestro de radicais livres (%SRL) foi realizado de acordo com Duarte-Almeida et al. (2006), a seguir:

$$\%SRL = \frac{(A_c - A_{am}) \times 100}{A_c}$$

Ac

Onde:

$A_c$  = absorbância do controle

$A_{am}$  = absorbância da amostra

A atividade antioxidante por DPPH foi realizada em triplicata no laboratório do Departamento de Produtos Naturais, Setor de alimentos, da Faculdade de Farmácia da UFRJ.

#### **4.3. Análise estatística:**

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através dos Testes F e T em nível de significância  $p < 0,05$ , no programa Microsoft Excel, versão 2003.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 5.1. Seleção dos azeites de oliva extra virgem:

#### 5.1.1. Índice de peróxidos e valor de extinção no UV iniciais de acordo com PIQ do IOOC (2003):

No que diz respeito à seleção de marcas e lotes com características em conformidade com os padrões estabelecidos pelo IOOC (2003) (Tabela 2), dois azeites de origem portuguesa (P1 e P2) e um de origem espanhola (E1) apresentaram os melhores resultados. Os azeites de origem grega (G), italiana (I) e dois de origem espanhola (E2 e E3) apresentaram IP dentro dos limites aceitáveis pelos PIQ do IOOC (Tabela 2), mas foram excluídos, tendo em vista que seus valores de  $K_{270}$  e  $\Delta K$  apresentaram-se acima dos limites estabelecidos (IOOC, 2003), o que pode indicar a adição de óleos refinados como o de soja (Tabela 6).

**Tabela 6:** Valores médios de índice de peróxidos e valor de extinção específica no UV iniciais dos azeites de oliva extra virgem adquiridos.

Azeite de oliva extra virgem	IP (mEq O <sub>2</sub> /Kg)	K <sub>232</sub> (nm)	K <sub>266</sub> (nm)	K <sub>270</sub> (nm)	K <sub>274</sub> (nm)	$\Delta K$
P1	7,782	1,803	0,164	0,162	0,157	0,001
P2	9,445	2,007	0,158	0,148	0,142	-0,002
E1	10,447	1,981	0,136	0,130	0,126	-0,001
E2	7,985	1,926	0,220	0,224*	0,217	0,005*
E3	7,933	1,937	0,185	0,186	0,180	0,003*
G	8,675	2,954*	0,421	0,439*	0,423	0,016*
I	10,545	2,190	0,253	0,260*	0,239	0,013*

\*Valores fora dos padrões estabelecidos para azeite de oliva extra virgem (IOOC, 2003)

### 5.1.2. Acidez livre:

Os resultados obtidos das análises de acidez livre dos azeites P1, P2 e E1 (Tabela 7) mostraram que estes encontravam-se em conformidade com os PIQ do IOOC (2003) (Tabela 2), indicando que foram provenientes de matéria-prima de boa qualidade, sendo apropriados para a adição de *trans*-resveratrol.

**Tabela 7:** Valores médios de acidez livre inicial dos azeites P1, P2 e E1.

Azeite de oliva extra virgem	Acidez livre* (% de ácido oléico $\pm$ DP)
P1	0,48 $\pm$ 0,05
P2	0,63 $\pm$ 0,05
E1	0,39 $\pm$ 0,02

\*Médias de 2 determinações

### 5.1.3. Composição em ácidos graxos:

Os resultados das análises da composição em ácidos graxos dos azeites P1, P2 e E1 mostraram que estes se encontraram de acordo com o que preconiza o *Codex Alimentarius* (Tabela 3) para identidade e qualidade de azeite de oliva, indicando que não foram adulterados e, portanto, eram de boa qualidade (Tabela 8).

Os perfis cromatográficos dos ácidos graxos presentes em P1, P2 e E1 encontram-se nos Anexos IV, V, VI e VII. Observou-se em todos, predominância do ácido oléico, o que já era esperado, uma vez que a literatura ressalta que o azeite de oliva caracteriza-se pela elevada quantidade de ácido oléico (PEREIRA; BARCELOS, 2003) e, como ácido graxo de menor teor o eicosanóico, em consonância com a legislação (Tabelas 3 e 8).

**Tabela 8:** Composição em ácidos graxos dos azeites de oliva extra virgem portugueses (P1 e P2) e do azeite de oliva extra virgem espanhol (E1).

Fórmula	Ácido graxo	P1* (% ± DP)	P2* (% ± DP)	E1* (% ± DP)
C 16:0	Palmítico	11,31 ± 0,34	9,92 ± 0,23	11,73 ± 0,01
C 16:1	Palmitoléico	0,81 ± 0,03	0,59 ± 0,01	0,98 ± 0,00
C 18:0	Esteárico	3,03 ± 0,02	3,30 ± 0,00	3,50 ± 0,03
C 18:1	Oléico	72,45 ± 0,31	74,94 ± 0,25	73,51 ± 0,07
C 18:2	Linoléico	7,72 ± 0,03	6,90 ± 0,02	6,28 ± 0,00
C 20:0	Araquídico	0,43 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,40 ± 0,00
C 18:3	Linolênico	0,74 ± 0,52	0,71 ± 0,01	0,69 ± 0,01
C 20:1	Eicosanóico	0,28 ± 0,00	0,29 ± 0,01	0,24 ± 0,01

\*Médias de 2 determinações

#### 5.1.4. Composição em esteróis:

Os resultados das análises da composição em esteróis dos azeites P1, P2 e E1 (Tabela 9) mostraram que estes se encontraram de acordo com o *Codex Alimentarius* (Tabela 4) para identidade e qualidade de azeite de oliva, indicando boa qualidade.

Os perfis cromatográficos dos esteróis presentes em P1, P2 e E1 encontram-se nos Anexos VIII, IX e X. Observou-se em todos, valores de estigmasterol menores que os valores de campesterol, conforme o que preconiza o *Codex Alimentarius* (Tabela 4).

**Tabela 9:** Composição em esteróis dos azeites de oliva extra virgem portugueses (P1 e P2) e do azeite de oliva extra virgem espanhol (E1).

Esteróis	P1* (% ± DP)	P2* (% ± DP)	E1* (% ± DP)
Campesterol	3,28 ± 0,10	3,21 ± 0,10	3,32 ± 0,02
Estigmasterol	1,15 ± 0,07	0,82 ± 0,05	0,89 ± 0,46
β-sitosterol aparente (incluindo Δ-5-avenasterol)	94,98 ± 0,49	95,23 ± 0,45	94,76 ± 1,46

\*Médias de 2 determinações

Uma vez que as amostras P1, P2 e E1 apresentaram-se em conformidade com os PIQ do IOOC (2003) (Tabela 2) e com o que preconiza o *Codex Alimentarius* (Tabelas 3 e 4), os três poderiam ser escolhidos para adição de *trans-resveratrol*.

### 5.1.5. Índice de estabilidade oxidativa no Rancimat:

A análise estatística dos resultados dos experimentos da estabilidade oxidativa por Rancimat dos azeites portugueses P1 e P2, submetidos ao método de *Schaal*, mostrou que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores do período de indução à temperatura de 110 °C, nem entre os valores encontrados a 120 °C. O que indicou que as amostras P1 e P2 possuíam estabilidades oxidativas semelhantes, nas condições avaliadas.

Observou-se que os valores do período de indução foram maiores a 110 °C (Tabela 10 e Anexo I) do que a 120 °C (Tabela 11 e Anexo II), revelando que o aumento da temperatura acelerou o processo oxidativo, reduzindo o período de indução. O que também foi demonstrado por Hasenhuettl e Wan (1992) ao determinarem o período de indução do azeite de oliva e de outros óleos por Rancimat em diversas temperaturas (100, 110, 130 e 140 °C).

**Tabela 10:** Períodos de indução no Rancimat (110 °C e fluxo de ar de 10 L/h) das amostras P1 e P2.

Amostras	Períodos de indução* (h ± DP)
P1	20,68 ± 0,13
P2	21,85 ± 0,05

\* Médias de 2 determinações

**Tabela 11:** Períodos de indução no Rancimat (120 °C e fluxo de ar de 10 L/h) das amostras P1 e P2.

Amostras	Períodos de indução* (h ± DP)
P1	9,33 ± 0,06
P2	9,82 ± 0,24

\* Médias de 2 determinações

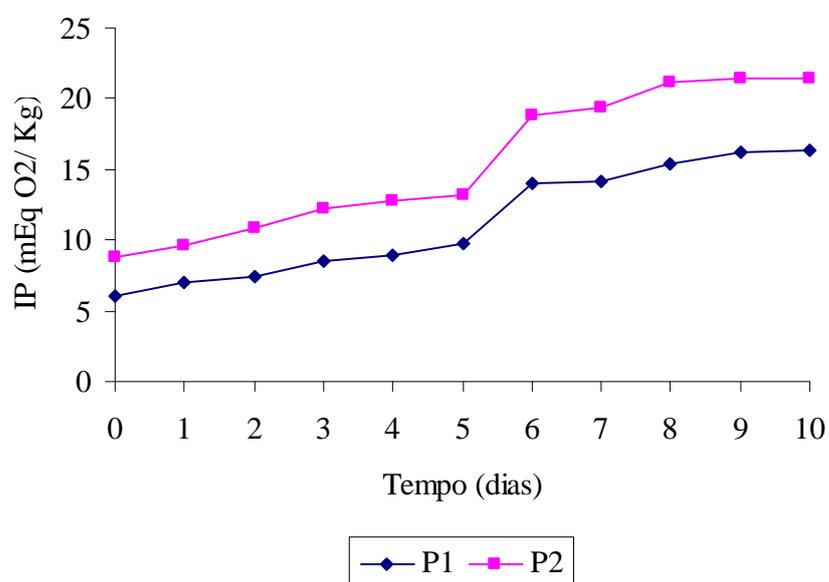
Uma vez que os valores de período de indução não diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) também por este método, pode-se afirmar que as duas amostras de azeite seriam apropriadas para a adição de *trans*-resveratrol.

#### 5.1.6. Escolha do azeite de maior estabilidade oxidativa:

A utilização de apenas duas amostras de azeites de origens diferentes (um português e um espanhol) poderia minimizar os problemas gerados pela adição de *trans*-resveratrol aos três azeites selecionados previamente (P1, P2 e E1) e citados anteriormente. Contudo, dois azeites de origem portuguesa (P1 e P2) encontravam-se dentro dos padrões do IOOC (2003), sendo necessário escolher, o de maior estabilidade oxidativa através do método de *Schaal*

(AOCS, 2004), para que juntamente com o azeite E1 estivesse em condições de ser adicionado de *trans*-resveratrol.

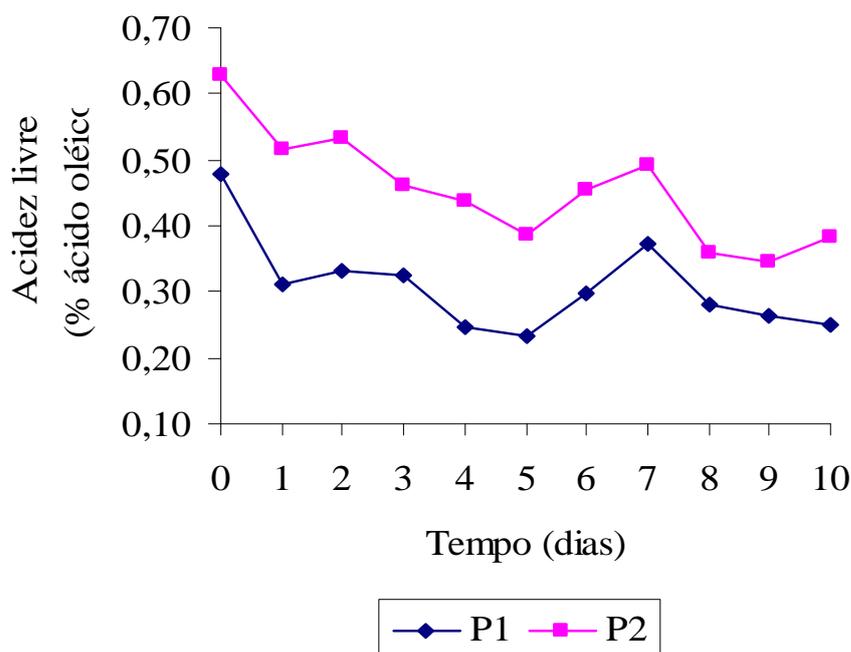
A partir dos resultados obtidos, observou-se que os valores de IP do azeite P1 (IP inicial: 6,0) mantiveram-se dentro dos padrões ao longo dos dez dias de armazenamento, enquanto que os de P2 (IP inicial: 8,7) ultrapassaram o valor padrão ( $\leq 20$  mEq O<sub>2</sub>/Kg) a partir do oitavo dia (Figura 7).



**Figura 7:** Valores médios de índice de peróxidos dos azeites P1 e P2 durante os 10 dias de armazenamento em estufa (método de *Schaal*).

Em relação aos valores de acidez livre, nenhuma das amostras (P1 e P2) ultrapassou o preconizado ( $\leq 0,8\%$  em ácido oléico) durante o experimento, o que indica boa qualidade da matéria-prima, manipulação e armazenamento adequados (Figura 8).

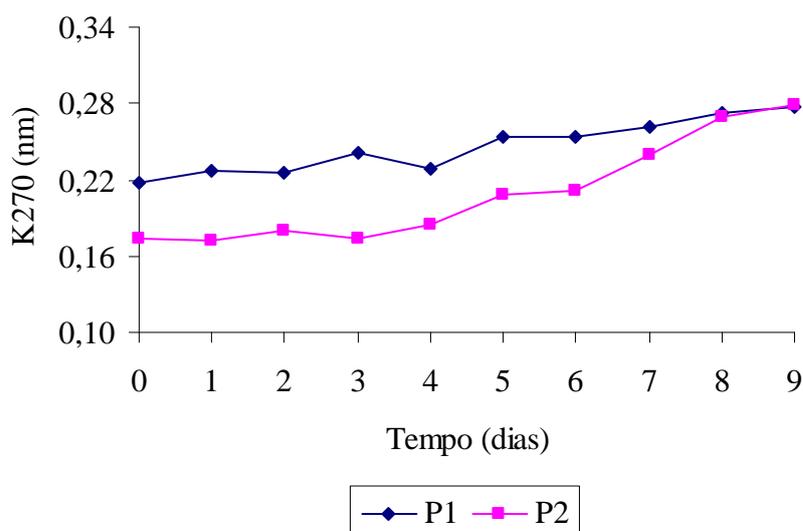
De acordo com a análise estatística, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores de IP, nem de acidez livre dos azeites P1 e P2 ao longo do método de *Schaal*.



**Figura 8:** Valores médios de acidez livre dos azeites P1 e P2 durante os 10 dias de armazenamento em estufa (método de *Schaal*).

Em relação aos valores de  $K_{270}$ , dos azeites P1 e P2, o valor de P1 ultrapassou o padrão ( $\leq 0,22$ ) já em T1, enquanto P2, somente no sétimo dia (Figura 9), havendo diferença significativa entre eles ( $p < 0,05$ ), indicando maior estabilidade de P2.

Matos et al. (2007) encontraram  $K_{270}$  inicial médio de 0,30 em azeites de oliva virgem de três cultivares diferentes, já acima do padrão estabelecido pelo IOOC (2003) ( $\leq 0,22$ ). Por outro lado, De Nino et al (2008) ao avaliarem azeite de oliva encontraram  $K_{270}$  inicial médio de 0,12, abaixo do valor inicial médio encontrado no presente estudo. Entretanto os autores não mencionam o comportamento deste parâmetro ao longo do experimento.



**Figura 9:** Valores médios de  $K_{270}$  dos azeites P1 e P2 durante os 10 dias de armazenamento em estufa (método de *Schaal*).

A amostra de azeite P1 revelou, na seleção prévia,  $K_{270}$  inicial (0,16), dentro dos PIQ do IOOC (2003) (Tabela 2) e, quando submetida ao método de *Schaal*, mostrou rápida alteração de  $K_{270}$  logo no primeiro dia (0,23) demonstrando que, apesar dos bons resultados em outras análises, não era suficientemente estável para ser adicionada de *trans*-resveratrol, fator que a fez ser excluída do presente estudo.

Desta forma, no que diz respeito à estabilidade oxidativa durante o método de *Schaal*, avaliada através de IP, acidez livre e  $K_{270}$  ao longo de 10 dias, tinha-se como melhor opção o azeite português P2 (devido aos melhores resultados quando comparado ao azeite P1) para a adição do *trans*-resveratrol e, como segunda, o de origem espanhola E1. No entanto, lotes de P2 (mesma marca) que apresentassem características de qualidade semelhantes não foram mais encontrados. Sendo assim, apenas o azeite E1 apresentava condições adequadas para a adição de *trans*-resveratrol.

## **5.2. Adição de *trans*-resveratrol ao azeite de oliva extra virgem espanhol:**

### **5.2.1 Avaliação da composição em ácidos graxos:**

Como reportado, anteriormente, nas Tabelas 2 e 3, o azeite E1 encontrava-se dentro dos padrões preconizados pelo PIQ do IOOC (2003) e pelo *Codex Alimentarius* (2003) em relação à composição em ácidos graxos (*CODEX ALIMENTARIUS*, 2003), respectivamente, podendo ser utilizado como controle neste estudo.

Psomiadou e Tsimidou (2002) analisaram amostras de azeite de oliva extra virgem e observaram que no tempo zero, tanto os valores de ácido oléico (valor médio: 76,25%) quanto de linoléico (7,47%) foram pouco superiores aos encontrados nas amostras do presente estudo (Tabela 12).

Gómez-Alonso et al. (2007), embora tenham analisado amostras de azeite de oliva virgem, também observaram concentrações de ácido oléico superiores (valor médio de 80%) e de linolênico, próximas (média de 0,60%) às encontradas no presente de estudo (controle e adicionada de 100 ppm de *trans*-resveratrol) e todas estavam em conformidade com o *Codex Alimentarius*, como pode ser confirmado nas Tabelas 3 e 12 (*CODEX ALIMENTARIUS*, 2003).

Cardoso (2006) analisando azeite de oliva de nove cultivares diferentes, no tempo zero, encontrou concentrações de ácido linolênico que variaram de 0,19 a 0,40% (de acordo com o *Codex Alimentarius*) e de ácido linoléico entre 0,54 e 0,93% (fora do padrão estabelecido pelo *Codex Alimentarius* - Tabela 3), bem menores que as encontradas neste estudo (Tabela 12), onde não se possui informação sobre a procedência em termos de cultivar dos azeites de oliva extra virgem utilizados.

A adição de 100 ppm de *trans*-resveratrol ao azeite de oliva extra virgem espanhol (E1), como esperado, não levou a alterações em sua composição em ácidos graxos (Tabela

12). Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os resultados encontrados, quando se comparou a amostra controle e o azeite espanhol adicionado de *trans*-resveratrol.

**Tabela 12:** Valores médios da composição em ácidos graxos do azeite de oliva extra virgem, controle e do adicionado de 100 ppm de *trans*-resveratrol.

Fórmula	Ácido graxo	Controle* (% $\pm$ DP)	Azeite adicionado de 100 ppm de <i>trans</i> -resveratrol* (% $\pm$ DP)
C 16:0	Palmítico	11,73 $\pm$ 0,01	11,81 $\pm$ 0,04
C 16:1	Palmitoléico	0,98 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00
C 18:0	Estearíco	3,50 $\pm$ 0,03	3,47 $\pm$ 0,00
C 18:1	Oléico	73,51 $\pm$ 0,07	73,43 $\pm$ 0,02
C 18:2	Linoléico	6,28 $\pm$ 0,00	6,29 $\pm$ 0,02
C 20:0	Araquídico	0,40 $\pm$ 0,00	0,39 $\pm$ 0,01
C 18:3	Linolênico	0,69 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,00
C 20:1	Eicosanóico	0,24 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,00

\* Médias de 2 determinações

### 5.2.2 Avaliação da estabilidade oxidativa no Rancimat:

Para a análise de estabilidade oxidativa por Rancimat dos azeites controle (E1) e do adicionado de 100 ppm de *trans*-resveratrol, optou-se por utilizar a temperatura de 120 °C, tendo em vista que ao analisarem-se os azeites P1 e P2, observou-se que nesta temperatura um menor período de indução seria obtido.

O azeite adicionado de 100 ppm de *trans*-resveratrol apresentou um maior período de indução, no entanto, a análise estatística revelou que este aumento não foi significativo ( $p < 0,05$ ) (Tabela 13 e Anexo III). Nas condições utilizadas neste estudo, a adição de *trans*-resveratrol não levou a alterações na estabilidade oxidativa do azeite de oliva extra virgem espanhol, o que não impede que a utilização de concentrações mais elevadas possa aumentar significativamente o período de indução.

**Tabela 13:** Valores médios dos períodos de indução dos azeites: controle e adicionado de 100 ppm de *trans*-resveratrol no Rancimat (120 °C e fluxo de ar de 10 L/h).

Amostras	Períodos de indução* (h $\pm$ DP)
Controle	6,82 $\pm$ 0,50
Azeite adicionado de 100 ppm de <i>trans</i> -resveratrol	7,20 $\pm$ 0,68

\* Médias de 2 determinações

Rosales (1989) analisou a estabilidade oxidativa, no Rancimat, de 26 amostras de azeite de oliva virgem (2,5 g de amostra, temperatura de 100 °C, fluxo de 10 L/h) e encontraram um período de indução médio de 40,17 h (mínimo: 6,76 e máximo: 78,85 h), maiores que os encontrados no presente experimento, provavelmente devido a menor temperatura utilizada, pois quanto menor a temperatura, maior o período de indução.

Del Caro et al. (2006) e Bilancia et al. (2007) analisaram azeites de oliva extra virgem no Rancimat (120°C, fluxo de 20L/h). No primeiro estudo, o período de indução foi de 8,79 h no tempo zero e 8,18 h no décimo sexto mês de armazenamento, resultados mais próximos

dos obtidos neste trabalho; já no segundo, os valores foram 17,3 e 11,2 h no tempo zero e após 12 meses respectivamente. Embora ambos avaliassem azeite de oliva extra virgem, os cultivares eram diferentes (*cv.* Bosana e *cv.* Coratina, respectivamente) o que possivelmente influenciou nos períodos de indução.

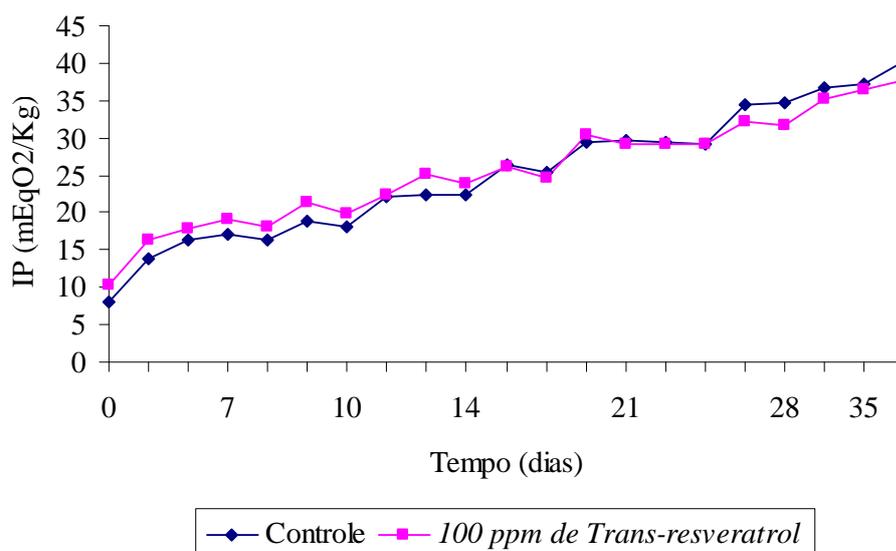
### 5.2.3. Avaliação do índice de peróxidos:

A partir do décimo segundo dia de experimento tanto o azeite controle, quanto o adicionado de 100 ppm de *trans*-resveratrol ultrapassaram o valor padrão  $\leq 20$  mEq O<sub>2</sub>/Kg de azeite (IOOC, 2003).

No decorrer do experimento, observou-se que, na maior parte do tempo, os valores de IP do azeite com *trans*-resveratrol foram mais elevados do que os do azeite controle. Somente a partir do trigésimo dia de experimento os valores de IP do azeite controle passaram a ser mais elevados que os do azeite com *trans*-resveratrol (Figura 10), no entanto esta diferença não foi significativa ( $p < 0,05$ ).

Marinova, Yanishlieva e Totseva (2002) analisaram IP em óleo de girassol (principal ácido graxo: linoléico) adicionado de *trans*-resveratrol e observaram, nas seguintes condições: 100 °C, fluxo de ar de 100 mL/min (6L/h) e concentrações de 0,02; 0,05; 0,10 e 0,20% (0,02; 0,05; 0,10 e 0,20 ppm, respectivamente), um aumento no período de indução do óleo de girassol adicionado de *trans*-resveratrol o que indicou a efetividade desta substância como antioxidante nesta matriz.

Neste trabalho, foi utilizado o método oficial da AOCS (método de *Schaal*) que estabelece 60 °C para teste acelerado em estufa e não sendo observado um aumento efetivo na estabilidade oxidativa do azeite de oliva extra virgem (principal ácido graxo oléico), provavelmente devido à composição do azeite de oliva extra virgem que o tornaria, naturalmente, um óleo vegetal de maior estabilidade oxidativa em relação aos outros.



**Figura 10:** Valores médios de índice de peróxidos dos azeites (controle e adicionado de 100 ppm de *trans*-resveratrol) ao longo do período de armazenamento em estufa (método de *Schaal*).

Caponio et al. (2005) e Bilancia et al. (2007) analisaram azeite de oliva extra virgem (IP inicial de aproximadamente 7,5) durante 12 meses de armazenamento. O primeiro estudo utilizou temperaturas entre 15 e 25 °C e o segundo temperatura fixa de 20 °C, no escuro. Ambos observaram que o IP não ultrapassou o valor padrão ( $\leq 20$  mEq O<sub>2</sub>/Kg de azeite) durante todo o experimento.

Gómez-Alonso et al. (2007) analisaram amostras de azeite de oliva virgem em temperatura ambiente e protegido da luz. O IP inicial das amostras foi aproximadamente 4,7 mEq O<sub>2</sub>/Kg de azeite e as amostras só ultrapassaram o valor padrão a partir do vigésimo sétimo dia.

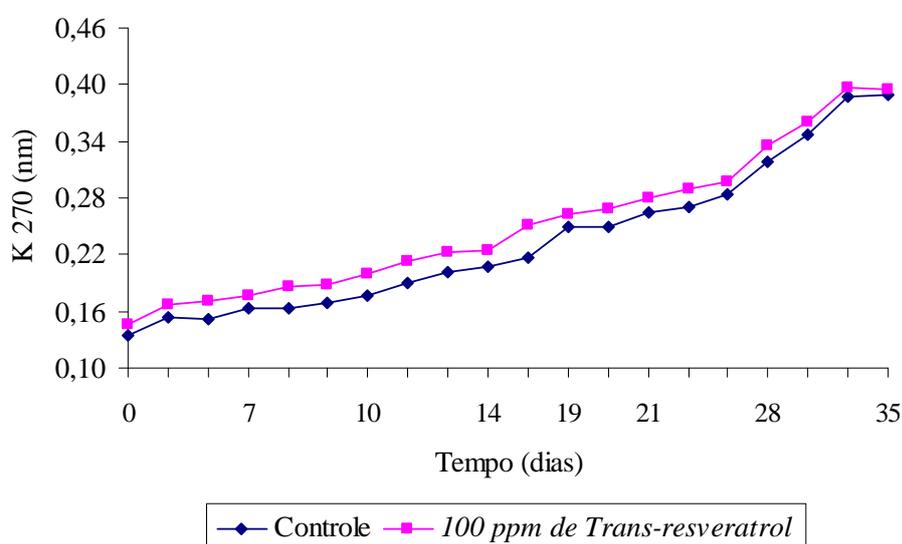
A comparação dos resultados obtidos no presente estudo com a literatura pertinente encontrada, torna-se bastante dificultada, devido ao fato de que os estudos realizados por

outros autores não avaliam o azeite de oliva extra virgem pelo método de *Schaal* (60 °C), bem como utilizam, normalmente, amostras recém processadas o que gera diferentes resultados.

#### 5.2.4. Avaliação de $K_{270}$ :

Na Tabela 5 são mostrados os resultados obtidos na verificação da calibração do espectrofotômetro realizada com azeites considerados padrão (fornecidos pelo IOOC) cujos valores de  $K_{270}$  são conhecidos. Os dados mostraram que o equipamento estava corretamente calibrado.

A partir do décimo quinto dia, o valor de  $K_{270}$  do azeite adicionado de 100 ppm de *trans*-resveratrol ultrapassou o valor considerado padrão (0,22 nm) pelo IOOC, o que só aconteceu com o azeite controle a partir do décimo nono dia (Figura 11).



**Figura 11:** Valores médios de  $K_{270}$  dos azeites (controle e adicionado de 100 ppm de *trans*-resveratrol) ao longo do período de armazenamento em estufa (método de *Schaal*).

Observou-se ao longo do experimento que os valores de  $K_{270}$  do azeite adicionado de 100 ppm de *trans*-resveratrol mostrou-se sempre mais elevado que os do controle (Figura 11), porém tal elevação não foi significativa ( $p < 0,05$ ), não podendo, portanto, ser atribuída ao *trans*-resveratrol, capacidade pró-oxidante nos azeites avaliados.

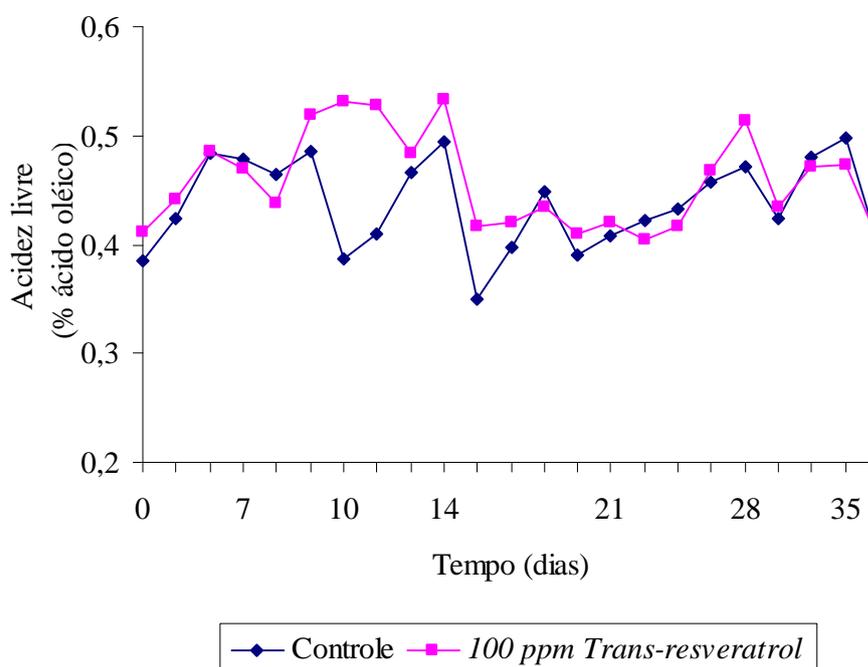
Caponio et al. (2005), Del Caro et al. (2006) e Bilancia et al. (2007) analisaram azeites de oliva extra virgem. O primeiro estudo, em temperatura entre 15 e 25 °C, armazenados por 12 meses, o segundo em temperatura ambiente durante 16 meses e o terceiro, a 20 °C armazenados por 12 meses, no escuro e todos observaram que os valores de  $K_{270}$  não ultrapassaram o valor padrão durante o experimento ( $\leq 0,22$ ). Gómez-Alonso et al. (2007) analisando azeite de oliva virgem observaram valor de  $K_{270}$  inicial de 0,13 e que após 19 meses tal valor alcançou 0,22. Todos estes estudos avaliaram azeites em temperatura próxima a ambiente e por um período maior que o presente estudo, que utilizou um teste acelerado, o que pode explicar as diferenças nos resultados.

#### **5.2.5. Avaliação da acidez livre:**

Durante todo o período do experimento a acidez livre dos azeites, tanto controle quanto o adicionado de 100 ppm de *trans*-resveratrol não ultrapassou o valor padrão:  $\leq 0,8\%$  em ácido oléico (IOOC, 2003) (Figura 12), não variando significativamente ( $p < 0,05$ ).

Bilancia et al. (2007), ao analisarem azeites de oliva extra virgem, como no presente estudo, também obtiveram acidez livre dentro dos padrões do IOOC (2003), tanto no tempo zero (0,26%) quanto durante todo o período de armazenamento de 12 meses a temperatura de 20°C.

Gómez-Alonso et al. (2007) analisando azeite de oliva virgem encontraram acidez livre inicial de aproximadamente 0,38%, também dentro do padrão (IOOC, 2003), mas não mencionam seu comportamento ao longo do armazenamento.



**Figura 12:** Valores médios de acidez livre dos azeites (controle e adicionado de 100 ppm de *trans*-resveratrol) ao longo do período de armazenamento em estufa (método de *Schaal*).

### 5.2.6. Determinação de *trans*-resveratrol no azeite de oliva extra virgem por CLAE:

As amostras de azeite de oliva extra virgem espanhol adicionado de 100 ppm de *trans*-resveratrol foram recolhidas diariamente, durante o armazenamento em estufa a 60°C, armazenadas sob congelamento e levadas a cada 7 dias para que fossem analisadas por CLAE.

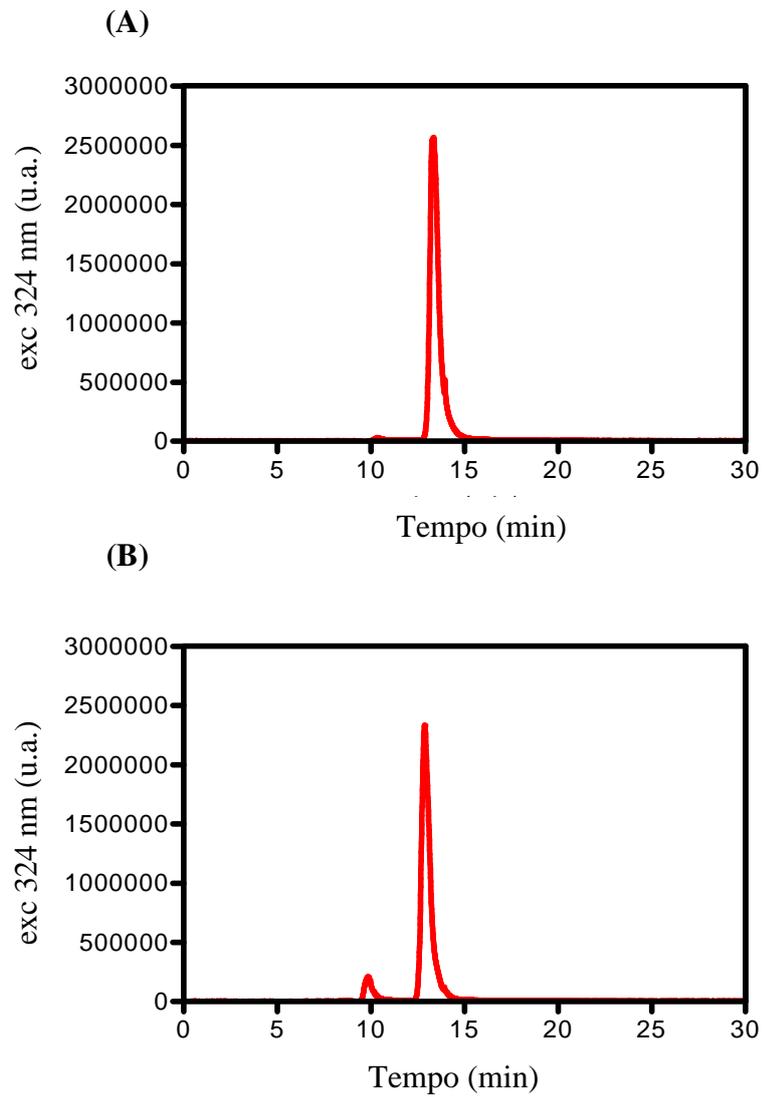
A partir da injeção de uma solução padrão de 100 ppm de *trans*-resveratrol (Figura 13 A) foram feitas a identificação e a quantificação por comparação do tempo de retenção e áreas dos picos. O pico de *trans*-resveratrol foi identificado como pico 12 (12 minutos).

Os resultados mostraram, até o décimo dia, a presença de apenas um pico (pico 12). A partir do décimo oitavo dia observou-se o aparecimento de mais um pico (pico 10),

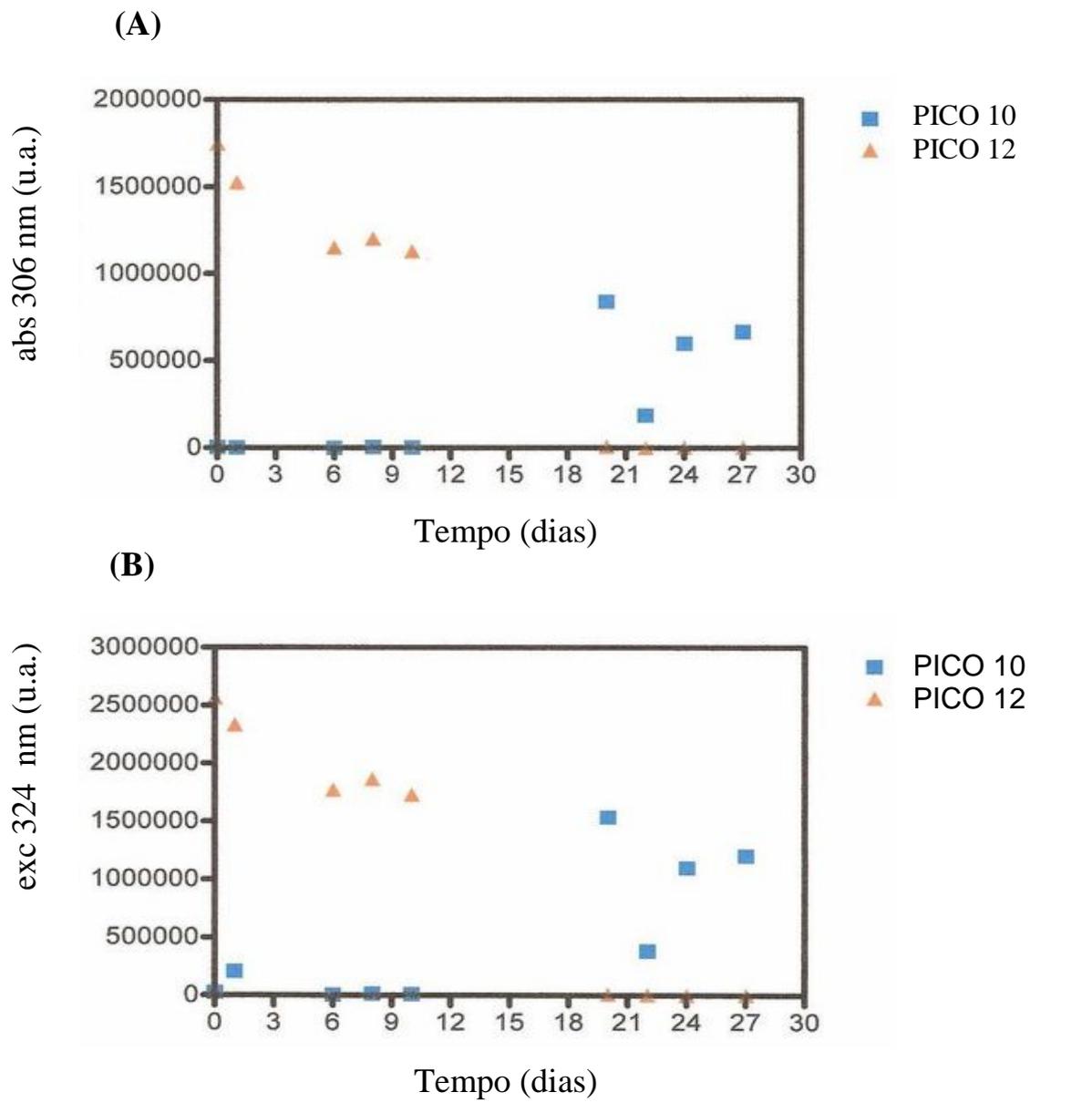
possivelmente um produto da oxidação do *trans*-resveratrol, uma vez que sua concentração é inversamente proporcional a do mesmo ao longo do tempo (dias de armazenamento em estufa) (Figuras 13, 14 e 15).

De acordo com os resultados obtidos por CLAE, nas condições do teste acelerado, (armazenamento em estufa a 60° C, fluxo de ar 3 L/h, no escuro) num período de 37 dias, provavelmente, todo o *trans*-resveratrol adicionado tenha sido oxidado por volta do vigésimo dia (Figuras 14 e 15).

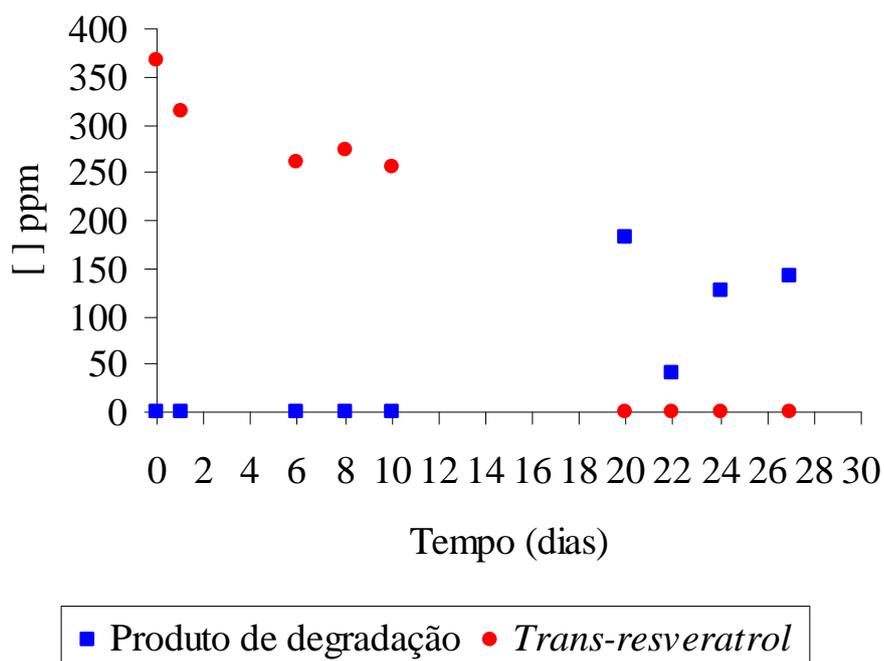
Não foram encontrados na literatura estudos que relatem o comportamento do *trans*-resveratrol adicionado a matrizes alimentares ao longo do tempo.



**Figura 13:** Cromatogramas: (A) da solução padrão de 100 ppm de *trans*-resveratrol, (B) da amostra de azeite de oliva extra virgem adicionado de *trans*-resveratrol, usando detector de fluorescência, com emissão a 370 nm e excitação a 324 nm.



**Figura 14:** Comportamento do *trans*-resveratrol (pico 12) adicionado ao azeite de oliva extra virgem e de seu produto de oxidação (pico 10) ao longo do período de armazenamento usando: (A) detector de absorvância (306 nm) e (B) detector de fluorescência (emissão: 370 e excitação: 324 nm).



**Figura 15:** Concentração de *trans*-resveratrol e seu produto de oxidação ao longo do tempo. Calculada de acordo com Rudolf et al. (2005).

Embora não tenha sido objeto da presente dissertação, na Figura 15 observa-se o aparecimento de um produto de degradação do vigésimo dia até o final do experimento em concentrações entre 150 a 180 ppm. No vigésimo segundo dia a concentração do metabólito é bastante reduzida (< 50 ppm), porém, no vigésimo quarto e vigésimo sétimo dia observa-se um aumento na sua concentração (150 ppm), o que pode ser explicado por algum problema na homogeneização da amostra antes da injeção.

Por outro lado, o *trans*-resveratrol e o metabólito formado não foram detectados entre o décimo primeiro e o décimo nono dias do experimento, o que reforçou a necessidade de repetição do experimento e das análises as quais serão realizadas posteriormente.

### 5.3. Determinação da atividade antioxidante do *trans*-resveratrol por DPPH:

A curva de calibração foi construída a partir de diversas concentrações de solução de DPPH como descrito na Tabela 14.

**Tabela 14:** Absorbâncias das soluções de DPPH a 518 nm nas diferentes concentrações utilizadas.

Concentração (mg/L)	$\lambda$ 518 nm	$\lambda$ 518 nm	$\lambda$ 518 nm	Médias (*)
21,920	0,2348	0,2348	0,2348	0,2348
43,840	0,4382	0,4382	0,4383	0,4382
87,680	0,8128	0,8127	0,8127	0,8127
109,600	0,9621	0,9621	0,9620	0,9621

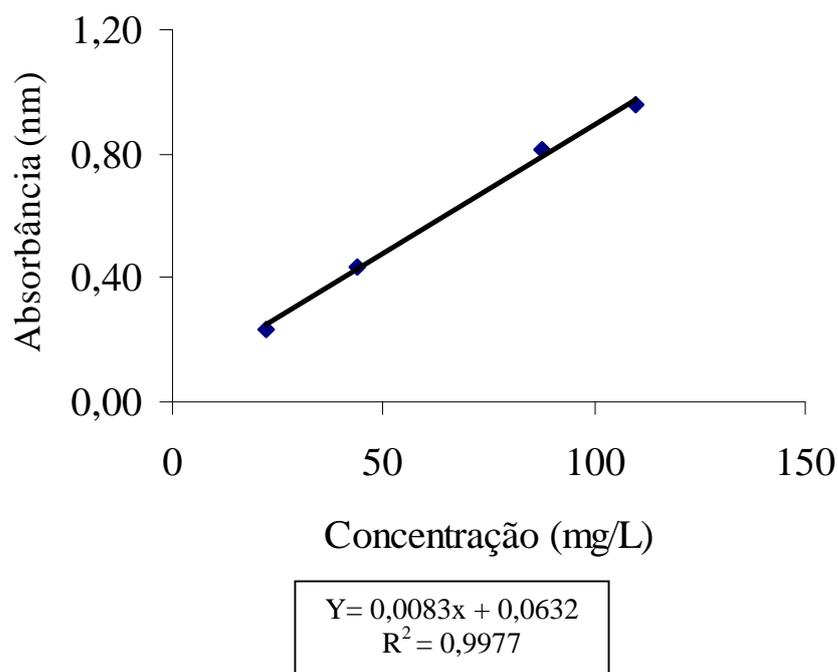
\* Médias de três determinações

A equação da curva de calibração do DPPH foi:  $y = 0,0083x + 0,0632$ , gerou um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9977, valor este compatível com o esperado (Figura 15).

Onde:

$y$  = absorbância medida no comprimento de onda 518 nm

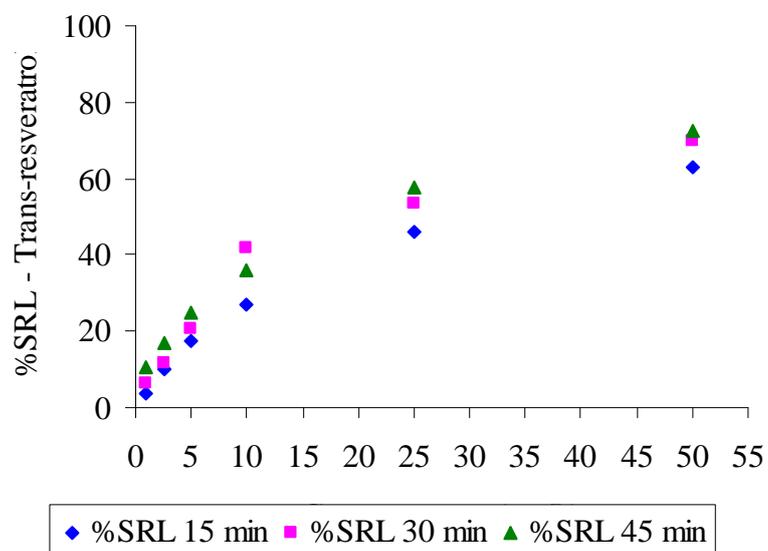
$x$  = concentração de DPPH no meio



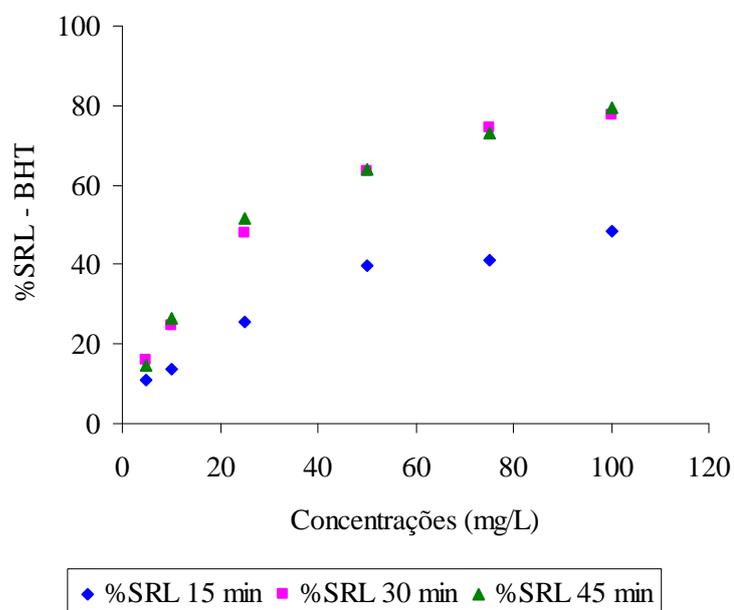
**Figura 16:** Curva de calibração do DPPH.

Os resultados obtidos com o método DPPH permitem considerar que após 15 minutos a reação alcançou o equilíbrio, nas concentrações de *trans*-resveratrol utilizadas neste estudo, e que o *trans*-resveratrol apresentou maior %SRL nas concentrações de 25 e 50 mg/L (57,55% e 72,72%, respectivamente) (Figura 17).

No que diz respeito ao BHT, observa-se que aos 15 minutos a reação não foi completa, ou seja, este tempo não foi suficiente para que ocorresse toda a reação com o radical DPPH, o que acontece após 30 minutos de reação, nas concentrações estudadas. O maior valor de % SRL para o BHT foi à concentração de 100 mg/L (79,4%) (Figura 18).

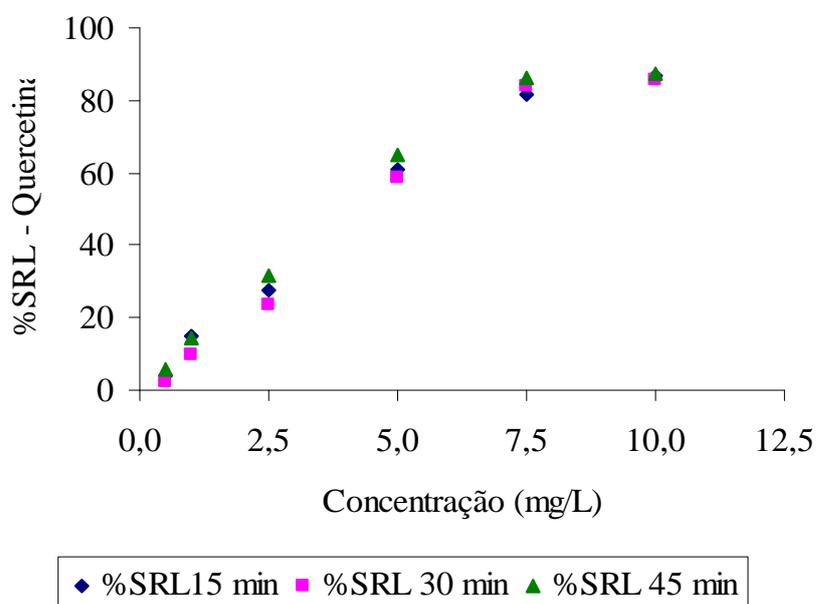


**Figura 17:** Valores médios de %SRL de *trans*-resveratrol, em diferentes concentrações, mensuradas após 15, 30 e 45 minutos de reação.



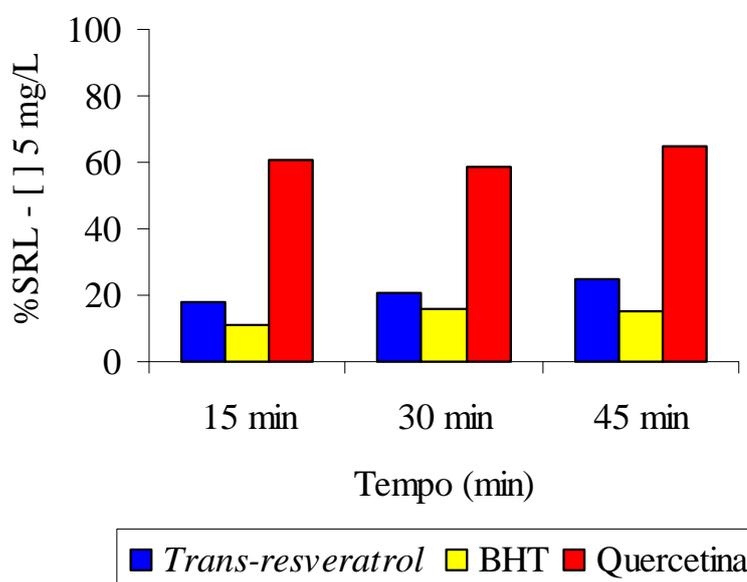
**Figura 18:** Valores médios de %SRL de BHT, em diferentes concentrações, mensuradas após 15, 30 e 45 minutos de reação.

Para a quercetina, observa-se que após 15 minutos a reação já alcançou o equilíbrio, de modo que este tempo foi suficiente para que a quercetina reagisse completamente com o radical DPPH. Os maiores valores de %SRL da quercetina foram à concentração de 10 mg/L (86,71, 85,82 e 87,35%, após 15, 30 e 45 minutos respectivamente) (Figura 19).



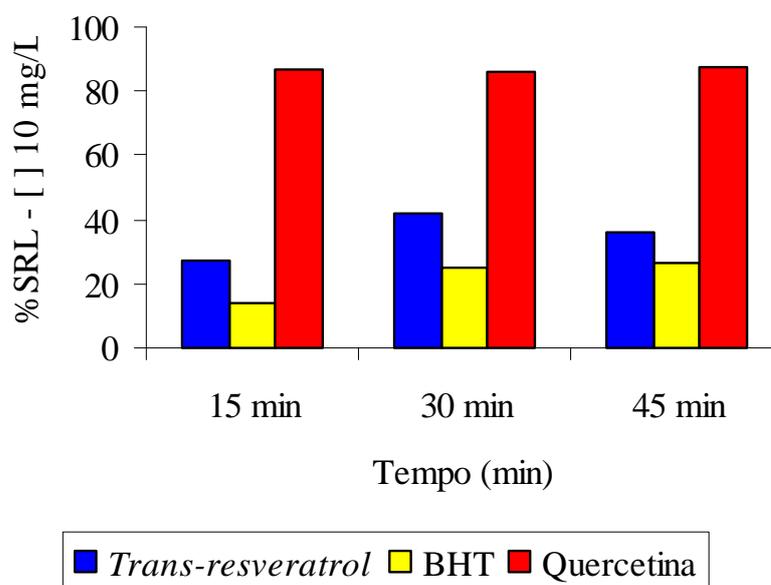
**Figura 19:** Valores médios de %SRL de quercetina, em diferentes concentrações, mensuradas após 15, 30 e 45 minutos de reação.

Ao comparar os três antioxidantes na concentração de 5 mg/L observa-se que a quercetina e o *trans*-resveratrol possuem as maiores %SRL após 45 minutos de reação (65,03 e 24,96%, respectivamente) e o BHT após 30 minutos (16,17%) (Figura 20). O que indica que para a quercetina e o *trans*-resveratrol, o melhor tempo de reação é 45 minutos e para o BHT é 30 minutos.



**Figura 20:** %SRL de *trans*-resveratrol, BHT e quercetina na concentração de 5 mg/L, mensurada após 15, 30 e 45 minutos de reação.

Ao se comparar os resultados na concentração de 10 mg/L observa-se que o *trans*-resveratrol, possui a maior %SRL após 30 minutos de reação (36,06 %) e que tanto a quercetina, quanto o BHT, possuem as maiores %SRL após 45 minutos de reação: 87,35 e 26,59 %, respectivamente (Figura 21).



**Figura 21:** %SRL de *trans-resveratrol*, BHT e quercetina na concentração de 10 mg/L, mensurada após 15, 30 e 45 minutos de reação.

Quando comparados os %SRL dos três antioxidantes testados nas concentrações de 5 e 10 mg/L (concentrações comuns aos três) a quercetina apresentou sempre os maiores valores de %SRL e o BHT os menores, não dependendo do tempo de reação, ou seja, em todos os tempos de reação observou-se: %SRL quercetina > %SRL *trans-resveratrol* > %SRL BHT (Figuras 20 e 21) indicando que a quercetina possui maior capacidade de seqüestrar os radicais DPPH e, portanto, maior atividade antioxidante que o *trans-resveratrol* e o BHT.

Diversos estudos utilizaram o método DPPH para avaliar a atividade antioxidante de *trans-resveratrol* e quercetina, dentre outros antioxidantes, comparando-os entre si.

Pan et al. (2007) avaliaram a atividade antioxidante entre BHT e resveratrol, e observaram maior atividade antioxidante do BHT em relação ao resveratrol, diferindo do encontrado neste estudo. Os autores não mencionam se este resveratrol encontrava-se sob a forma *cis* ou *trans* ou se era composto por mistura das duas formas.

Joubert, Von Gadow e Hansmann (1997) e Duarte-Almeida et al. (2006) compararam padrões de quercetina e BHT, por DPPH, observando maior atividade antioxidante da quercetina em relação ao BHT, sendo o mesmo observado no presente estudo.

Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998) compararam padrões de quercetina e *trans*-resveratrol, por DPPH e encontraram maior atividade antioxidante na quercetina que no *trans*-resveratrol, assim como foi encontrado neste estudo.

## 6. CONCLUSÕES:

- Os valores de IP,  $K_{270}$  e acidez livre do azeite adicionado de 100 ppm de *trans*-resveratrol durante o armazenamento em estufa e os índices de estabilidade oxidativa por Rancimat (120°C) não apresentaram diferença significativa quando comparados ao controle.

- A adição de 100 ppm de *trans*-resveratrol ao azeite de oliva extra virgem nas condições do presente estudo não influenciou na estabilidade oxidativa do azeite e também não alterou a sua composição em ácidos graxos mantendo-o dentro dos PIQ do IOOC (2003).

- A atividade antioxidante da quercetina determinada pelo método DPPH, apresentou maior percentual de seqüestro de radicais livres, nas condições deste estudo, o que indica maior atividade antioxidante.

- De acordo com os resultados obtidos por CLAE, nas condições de armazenamento adotadas neste estudo (teste acelerado, estufa a 60 °C, com fluxo de ar de 3L/h e num período de 37 dias) provavelmente, todo o *trans*-resveratrol adicionado seria oxidado por volta do vigésimo dia.

- Por ser este um estudo preliminar inédito, a escassez de dados publicados na literatura e a não padronização das metodologias reportadas por outros autores dificultaram a comparação de resultados. Os dados existentes são relacionados à adição de *trans*-resveratrol em outras matrizes lipídicas, tais como: óleo de girassol e canola, com composições diferentes dificultando a comparação com o azeite de oliva.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O fato da adição de 100 ppm de *trans*-resveratrol não ter alterado a estabilidade oxidativa do azeite de oliva extra virgem, nos deu subsídios para a continuidade de estudos já programados no projeto de pesquisa os quais também avaliem a toxicidade do azeite adicionado de *trans*-resveratrol por meio de ensaio biológico e, se aprovado, a análise sensorial com provadores treinados e futuros testes para avaliar se tal adição confere aumento das propriedades funcionais do azeite de oliva extra virgem.

Também estão previstos no mesmo projeto de pesquisa da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Maria Jaeger de Carvalho: a adição de outras concentrações de *trans*-resveratrol a outros óleos comestíveis; a adição de quercetina, que tendo uma maior atividade antioxidante que o *trans*-resveratrol talvez pudesse levar a uma elevação do índice de estabilidade oxidativa no azeite de oliva extra virgem; a observação de sinergismos entre *trans*-resveratrol e outros antioxidantes; a observação do comportamento do *trans*-resveratrol adicionado ao azeite de oliva extra virgem durante o armazenamento em temperatura ambiente (vida de prateleira), os quais não foram objetivos da presente dissertação.

Supondo que o azeite adicionado de *trans*-resveratrol após testes de toxicidade mostre-se inócuo e levando em consideração a estimativa, anteriormente relatada, baseada na recomendação de ingestão diária de resveratrol sugerida pela ADA (2004) e no valor médio de 2,57 mg/L *trans*-resveratrol encontrado no vinho tinto (Sautter et al., 2005), poder-se-ia entender que em relação ao *trans*-resveratrol a recomendação diária da ADA (2004) equivaleria a faixa de 0,62 a 1,23 mg de *trans*-resveratrol, que poderia ser suprida com 2 a 3 colheres de sopa de azeite de oliva extra virgem adicionado de 100 ppm de *trans*-resveratrol.

A adição de *trans*-resveratrol a matrizes alimentares é interessante e viável e já existe no mercado um iogurte de soja, sabor pêssego, adicionado de *trans*-resveratrol cujo rótulo informa que em cada 140 g do produto existem 2,60 mg de *trans*-resveratrol.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ACÍN, S. et al., Olive oil preparation determines the atherosclerotic protection in apolipoprotein E knockout mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 6, p. 418-424, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução n. 18**, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=135/> Acesso em: 10 nov. 2007.

\_\_\_\_\_. **Resolução n.270**, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico Para Óleos vegetais, Gorduras Vegetais e Creme Vegetal. Brasília, 2005. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18829&word=/> Acesso em: 25 jul. 2007.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION (ADA). Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 104, n. 5, p. 814- 826, 2004.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS). **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. 5<sup>th</sup> ed. Champaign, Illinois: AOCS, 2004. Second printing.

ANGELIS, R. C. Novos conceitos em Nutrição. Reflexões a respeito do elo dieta e saúde. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 4, p. 269-271, 2001.

ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 353-380, 2001.

APARICIO, R et al., Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 4150-4155, 1999.

ARUMUGHAN, C. et al. Antioxidant efficiency of sesame cake extract in vegetable oil protection. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 393-400, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES, IMPORTADORES E COMERCIANTES DE AZEITE DE OLIVA (OLIVA), **2008a**. Tipos de análises para

controle de qualidade de azeite. Disponível em: <http://www.oliva.org.br/tipos.asp#>. Acesso em: 28 maio 2008.

\_\_\_\_\_, 2008b. Dados de mercado. Disponível em: <http://www.oliva.org.br/conhecendo.asp#>. Acesso em: 14 maio 2008.

AUED-PIMENTEL, S. et al. Azeite de oliva: incidência de adulterações entre os anos de 1993 a 2000. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n. 2, p. 69-75, 2002.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p.123-130, 1999.

BILANCIA, M. T. et al. Correlation of triacylglycerol oligopolymers and oxidized triacylglycerols to quality parameters in extra virgin olive oil during storage. **Food Research International**, v. 40, n. 7, p.855-861, 2007.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001. 143p.

BONILLA, F. et al. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. **Food Chemistry**, v. 66, n. 2, p. 209-215, 1999.

BORGES, M. F. M.; SILVA, F. A. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 20, n. 1, p. 94-103, 1999.

CALDERÓN, A. A. et al. Resveratrol production as a part of the hypersensitive-like response of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. **New Phytologist**, v. 124, n. 3, p. 455-463, 1993.

CAÑABATE-DÍAZ, B. et al. Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 593-598, 2007.

CAPONIO, F. et al. Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage. **European Food Research Technology**, v. 221, n. 1-2, p. 92-98, 2005.

CARDOSO, L. G. V. **Características físico-químicas e avaliação do perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras introduzidas em Minas**

**Gerais – Brasil.** 2006. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós- Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2006.

CHEN, R.S.; WU, P.L.; CHIOU, R. Y. Y. Peanut roots as a source of resveratrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1665-1667, 2002.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION – FAO/ WHO. **Codex standards for olive oils and olive pomace oils.** CODEX STAN 33 – 1981 (Rev. 2 – 2003). Roma, 2003. Disponível em: [http://www.codexalimentarius.net/web/satandard\\_list.do?lang=en/](http://www.codexalimentarius.net/web/satandard_list.do?lang=en/) Acesso em: 28 jul. 2008.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DEL-CARO et al. Influence of technology, storage and exposure on components of extra virgin olive oil (Bosana cv) from whole and de-stoned fruits. **Food Chemistry**, v. 98, n. 2, p. 311-316, 2006.

DE NINO, A. et al. Oleuropein expression in olive oils produced from drupes stoned in a spring pitting apparatus (SPIA). **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 677-684, 2008.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 9, p. 505-512, 2006.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

FILIP, V. et al. Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. **Food Chemistry**, v. 83, n. 4, p. 585-593, 2003.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, v. 66, n. 8, p. 663-673, 2000.

GAO, X. et al. Immunomodulatory activity of resveratrol: discrepant *in vitro* and *in vivo* effects. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 12, p. 2427-2435, 2003.

GARCÍA-MESA, J. A.; LUQUE DE CASTRO, M. D.; VALCÁRCEL, M. Factors affecting the gravimetric determination of the oxidative stability oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, n. 3, p. 245-247, 1993.

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**, v. 100, n. 1, p. 36-42, 2007.

GORDON, M. H.; MURSI, E. A comparison of oil stability based on the Metrohm Rancimat with storage at 20 °C. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 6, p. 649-651, 1994.

HALBAUT, L. et al. Oxidative stability of semi-solid excipient mixtures with corn oil and implication in the degradation of vitamin A. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 147, n. 1, p. 31-40, 1997.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, n. 6, p. 475- 476, 1973.

HASENHUETTL, G. L.; WAN, P. J. Temperature effects on determination of oxidative stability with the Metrohm Rancimat, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 6, p. 525-527, 1992.

INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL (IOOC). **Trade standard applying to olive oils and olive - pomace oils**. COI/ T.15/ NC, nº3, Spain, 2003.

\_\_\_\_\_. Disponível em: [http:// www.internationaloliveoil.org/](http://www.internationaloliveoil.org/). Acesso em: 1 mar. 2007.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 7<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1992.

JOUBERT, E.; VON GADOW, A.; HANSMANN, C.F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -tocopherol, BHT, and BHA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 632-638, 1997.

JUAN, M. E.; VINARDELL, M. P.; PLANAS, J.M. The daily oral administration of high doses of *trans*-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. **Journal of Nutrition**, v. 2, n. 132, p. 257-260, 2002.

MACÍAS, M. D. et al. Oxidation of resveratrol catalyzed by soybean lipoxygenase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1653-1657, 2003.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V.; TOTSEVA, I.R. Anti-oxidant activity and mechanism of action of *trans*-resveratrol in different systems. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 145-152, 2002.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N.; TONEVA, A. Synergetic activity of some natural antioxidants in triacylglycerols of sunflower oil. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, v. 5, n. 81, p. 290-294, 2004.

MASTEN, S.; HANEKE, K. E. **Review of Toxicological Literature. Toxicological Summary for *trans*-resveratrol** [501-36-0]. North Carolina: Integrated Laboratory Systems, Inc., p. 1-54, 2002.

MATOS, L. C. et al. Evaluation of a numerical method to predict the polyphenols content in monovarietal olive oils. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 976-983, 2007.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006. Disponível em: <http://scholar.google.com.br>. Acesso em: 22 abr. 2007.

MORETTO, E.; ALVES, R.F. **Óleos e gorduras vegetais. Processamento e análises**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1986.179p.

NISSIOTIS, M.; TASIOULA-MARGARI; M. Changes in antioxidant concentration of virgin olive oil during thermal oxidation. **Food Chemistry**, v. 77, n. 3, p. 371-376, 2002.

NOBRE, S. M.; PEIXOTO, J.A.S.; MONTEIRO, A.L. Síntese de *trans*-estilbenos substituídos via reação de Suzuki de brometos de vinila. In: 29ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2006, São Paulo, **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2006. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=135/> Acesso em: 19 jun. 2007.

OLIVEIRA, H. P. M. et al. Dispositivos poliméricos eletroluminescentes. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 277-286, 2006.

NOGUERA-ORTÍ, J. F.; VILLANUEVA-CAMAÑAS, R.M.; RAMIS-RAMOS, G. Determination of phenolic antioxidants in vegetal and animal fats without previous extraction by dilution with *n*-propanol and micellar liquid chromatography. **Clinica Chimica Acta**, v. 402, n. 1-2, p. 81-86, 1999.

PACE-ASCIAK, C. R. et al. Wines and grapes juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subject. **Clinica Chimica Acta**, v. 246, n. 1-2, p. 163-182, 1996.

PAN, Y. et al. Antioxidant potential of ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* and application in peanut oil. **Food Chemistry**, v. 105, n. 4, p. 1518-1524, 2007.

PEIXOTO, E. R. M.; SANTANA, D. M. N.; ABRANTES, S. Avaliação dos índices de identidade e qualidade do azeite de oliva – proposta para atualização da Legislação brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 444-452, 1998.

PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. R. Vinho e saúde: uma revisão. **Infarma**, v. 16, n. 1-2, p. 64-67, 2004.

PEREIRA, M. C. A.; BARCELOS, M. F. P. Aspectos tecnológicos e nutricionais do azeite de oliva. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 106, p. 22-29, 2003.

PSOMIADOU, E.; TSIMIDOU, M. Stability of virgin olive oil. 1. Autoxidation studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 26, p. 716-721, 2002.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Atividade antioxidante do  $\alpha$ -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 1, p. 15-20, 2006 a.

\_\_\_\_\_. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p.755-760, 2006 b.

REGITANO-D'ARCE, A. B.; ALMEIDA-DORIA, R. F. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 197-203, 2000.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. et al. *Trans* – resveratrol in red wines from Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 76, n. 3, p. 371-375, 2002.

ROSALLES, G. Determinación de la estabilidad oxidativa de aceites de oliva vírgenes: Comparación entre el método del Oxígeno Activo (A.O.M.) y el método Rancimat. **Grasas y aceites**, v. 40, n. 1, p. 1-5, 1989.

RUDOLF, J. L. et al. Development of a reverse-phase high-performance liquid chromatography method for analyzing trans-resveratrol in peanut kernels. **Food Chemistry**, v. 89, n. 4, p.623-638, 2005.

RUNCIO, A. et al. Volatile compounds of virgin olive oil obtained from Italian cultivars grown in Calabria. Effect of processing methods, cultivar, stone removal, and antracnose attack. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 735-740, 2008.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.

SANTOS, A. R. et al. Antropoisomerismo: o efeito da quiralidade axial em substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 125-135, 2007.

SAUTTER, C. K. et al. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 437-442, 2005.

ŞENER, G. et al. Protective effects of resveratrol against acetaminophen-induced toxicity in mice. **Hepatology Research**, v. 35, n. 1, p. 62-68, 2006.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 1077-1080, 2003.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? **Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 91-113, 1997.

SOONG, Y.; BARLOW, P.J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 411-417, 2004.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUTO, A. A. et al. Determination of *trans*-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 4, p. 441-445, 2001.

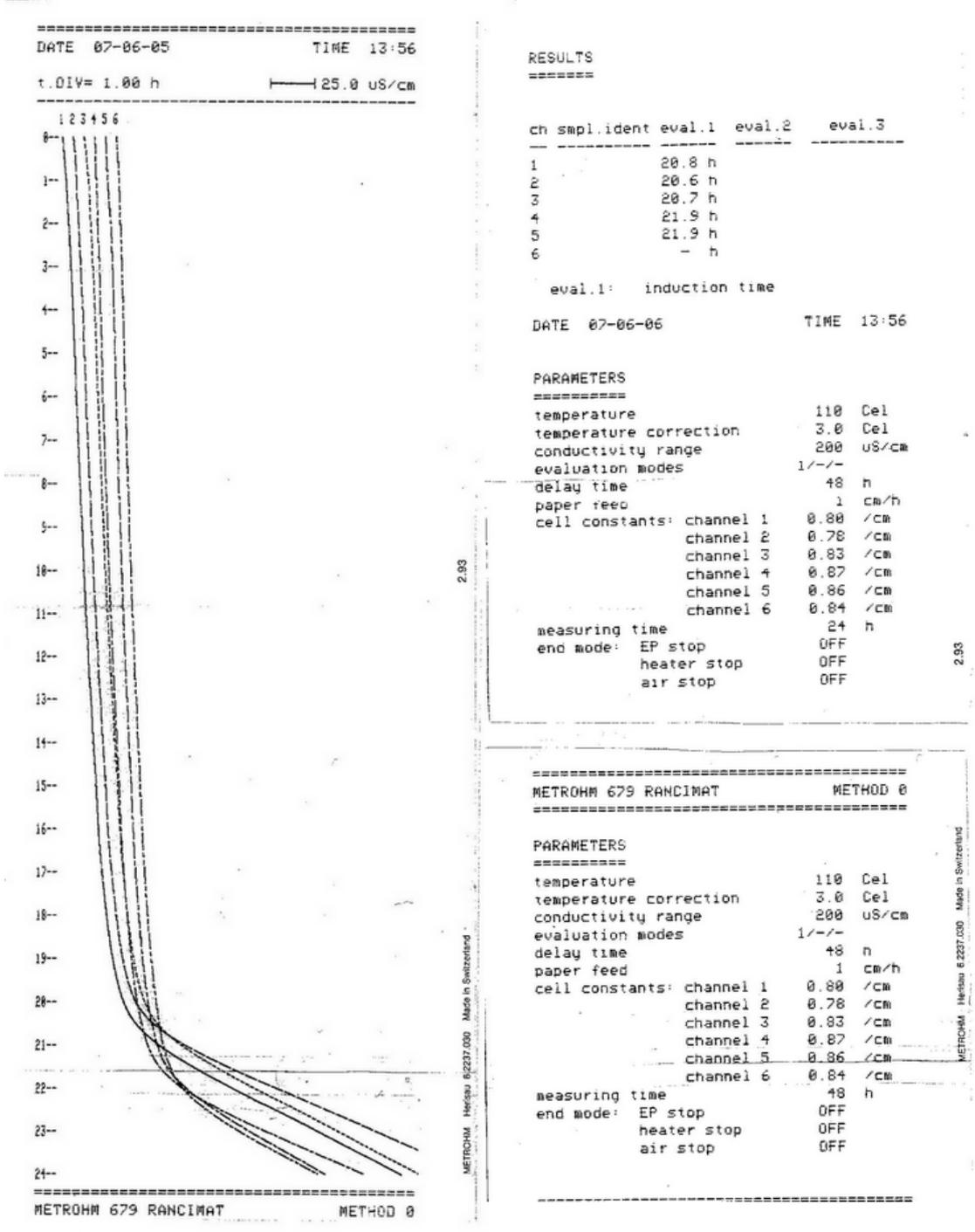
TAKEMOTO, E. et al. Determinação da diferença entre o valor real e o teórico do triglicerídeo ECN 42 para detecção de adulteração em azeites de oliva comercializados no Brasil. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 31-34, 2008.

THAIPONG, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n.6-7, p. 669-675, 2006.

TORRES DE PINEDO, A.; PEÑALVER, P.; MORALES, J.C. Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure-activity relationship. **Food Chemistry**, v. 103, n. 1, p. 55-61, 2007.

VIÑAS, P. et al. Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 871, n. 1-2, p. 85-93, 2000.

ANEXO I: Curva de condutividade elétrica ( $\mu\text{s}$ ) versus tempo e cálculos dos períodos de indução (h) gerados pelo equipamento Rancimat 679 (Metrohm Co, Switzerland), a 110 °C, para os azeites P1 (canais: 4, 5 e 6) e P2 (1, 2 e 3), submetidos ao método de *Schaal*.



RESULTS

ch	smpl.ident	eval.1	eval.2	eval.3
1		20.8 h		
2		20.6 h		
3		20.7 h		
4		21.9 h		
5		21.9 h		
6		- h		

eval.1: induction time

DATE 07-06-06 TIME 13:56

PARAMETERS

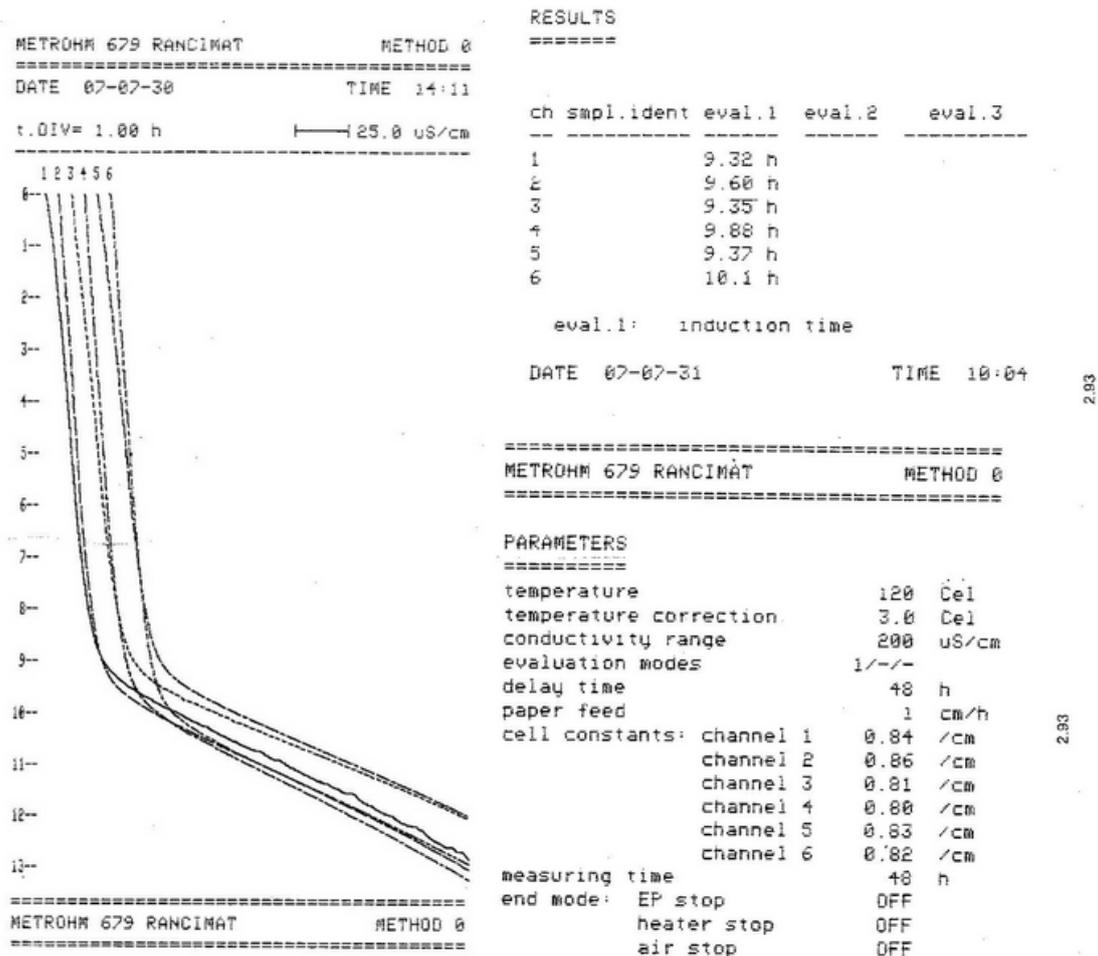
temperature	110	Cel
temperature correction	3.0	Cel
conductivity range	200	µS/cm
evaluation modes	1/-/-	
delay time	48	h
paper feed	1	cm/h
cell constants:		
channel 1	0.80	/cm
channel 2	0.78	/cm
channel 3	0.83	/cm
channel 4	0.87	/cm
channel 5	0.86	/cm
channel 6	0.84	/cm
measuring time	24	h
end mode:		
EP stop	OFF	
heater stop	OFF	
air stop	OFF	

METROHM 679 RANCIMAT METHOD 0

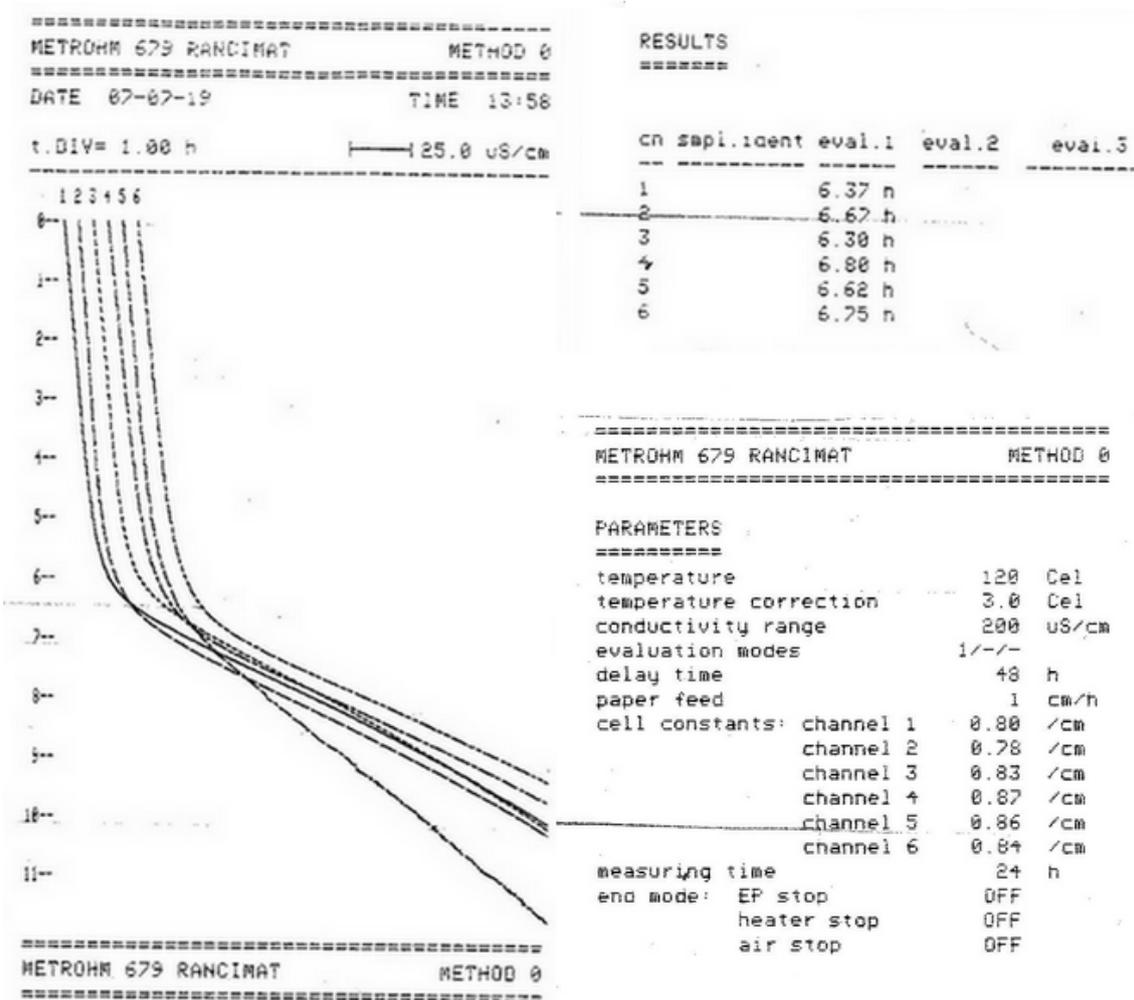
PARAMETERS

temperature	110	Cel
temperature correction	3.0	Cel
conductivity range	200	µS/cm
evaluation modes	1/-/-	
delay time	48	h
paper feed	1	cm/h
cell constants:		
channel 1	0.80	/cm
channel 2	0.78	/cm
channel 3	0.83	/cm
channel 4	0.87	/cm
channel 5	0.86	/cm
channel 6	0.84	/cm
measuring time	48	h
end mode:		
EP stop	OFF	
heater stop	OFF	
air stop	OFF	

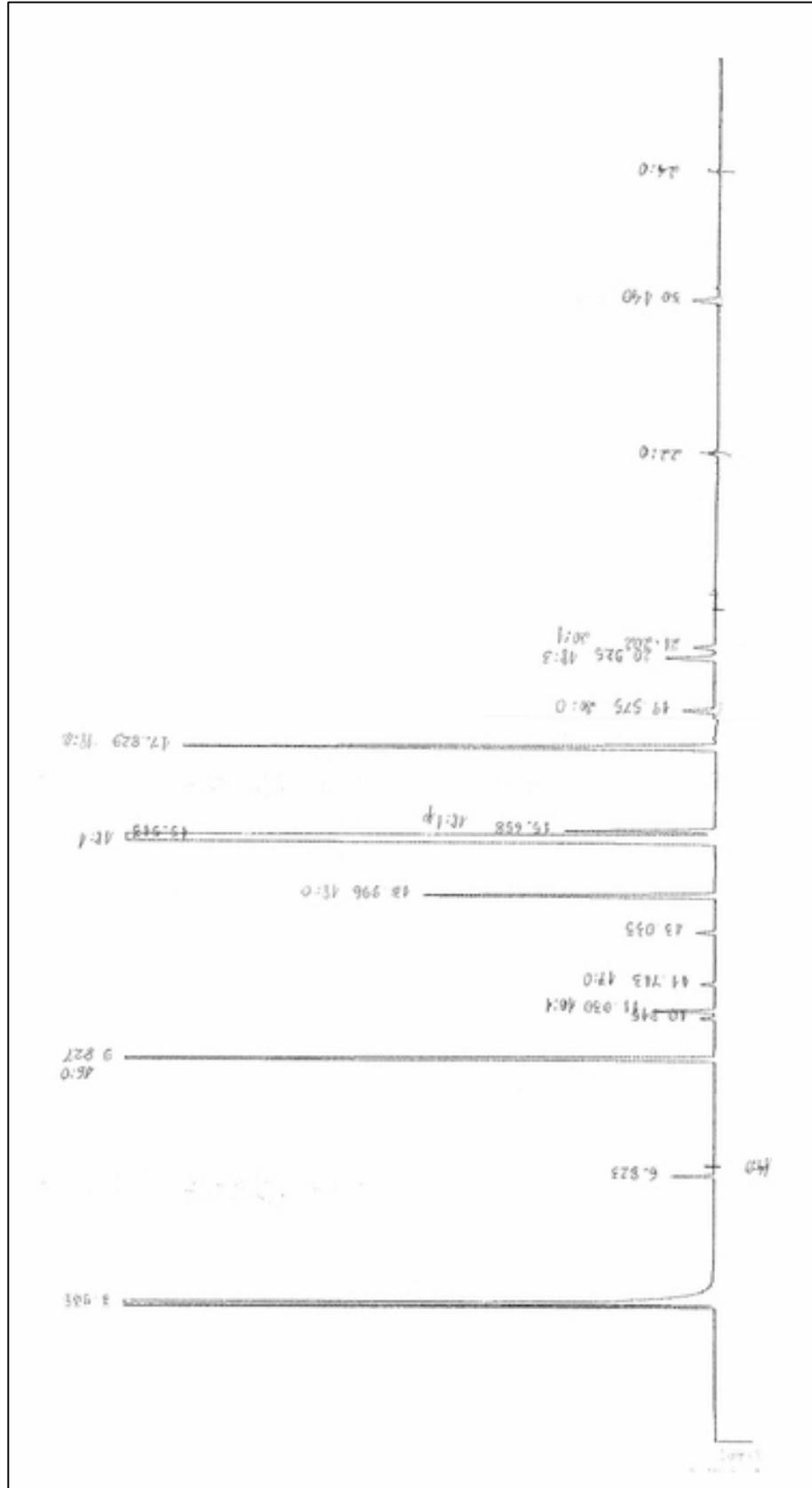
ANEXO II: Curva de condutividade elétrica ( $\mu\text{s}$ ) *versus* tempo e cálculos dos períodos de indução (h) gerados pelo equipamento Rancimat 679 (Metrohm Co, Switzerland), a 120 °C, para os azeites P1 (canais: 2, 4 e 6) e P2 (canais: 1, 3 e 5), submetidos ao método de *Schaal*.



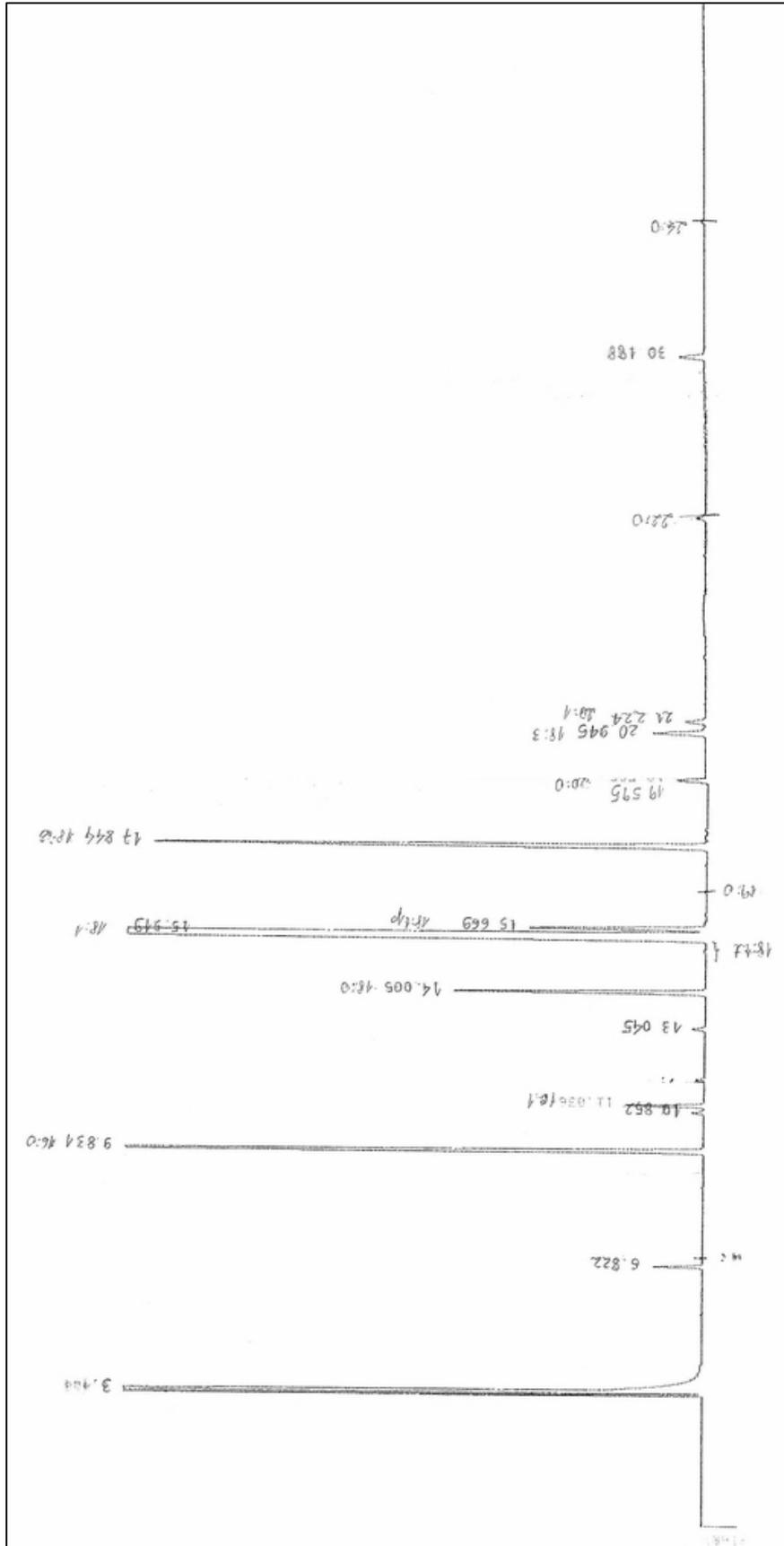
ANEXO III: Curva de condutividade elétrica ( $\mu\text{s}$ ) *versus* tempo e cálculos dos períodos de indução (h) gerados pelo equipamento Rancimat 679 (Metrohm Co, Switzerland), a 120 °C, para os azeites: controle (canais: 1, 3 e 5) e com adição de 100 ppm de *trans-resveratrol* (canais: 2, 4 e 6).



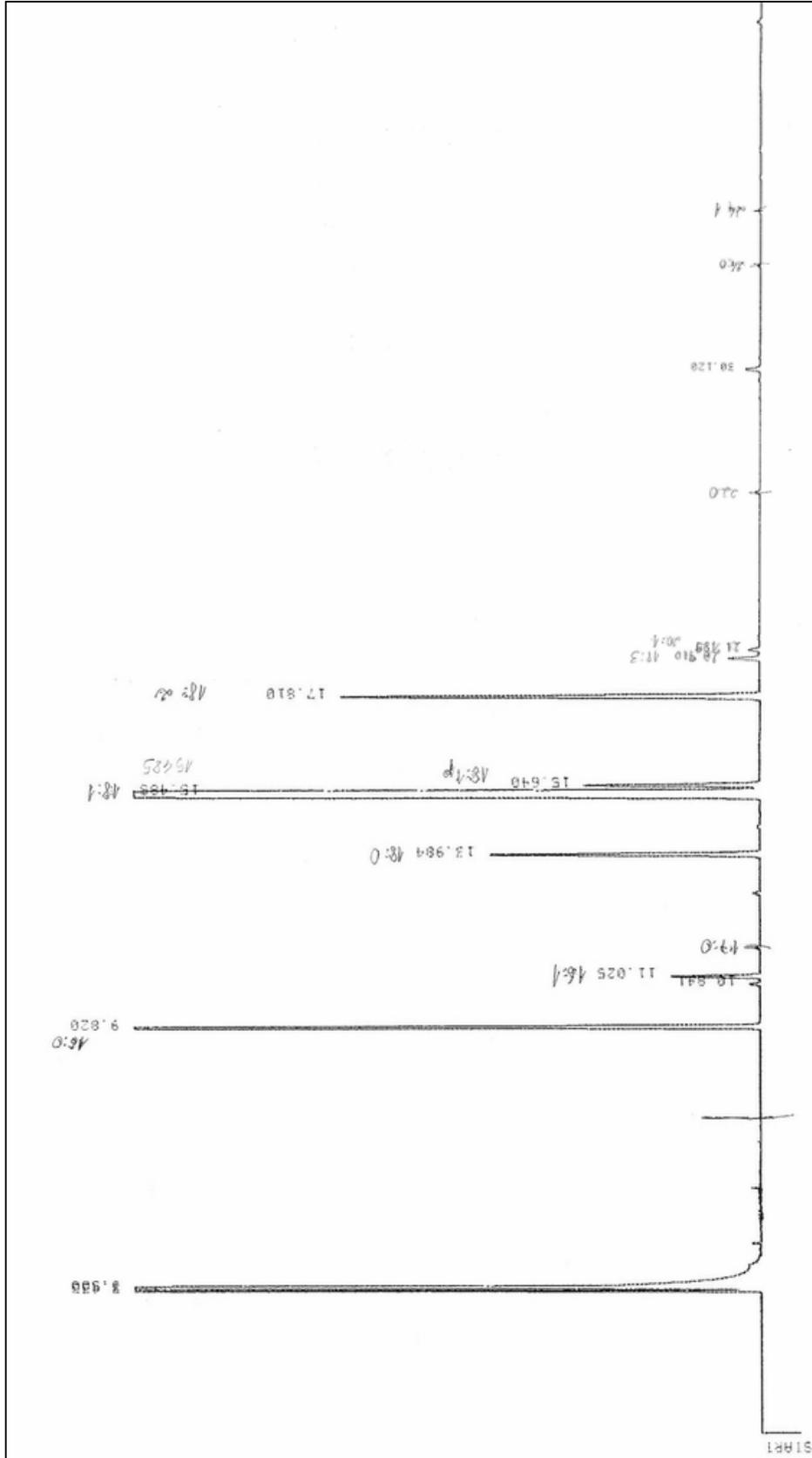
ANEXO IV: Perfil cromatográfico dos ácidos graxos do azeite de oliva extra virgem português (P1).



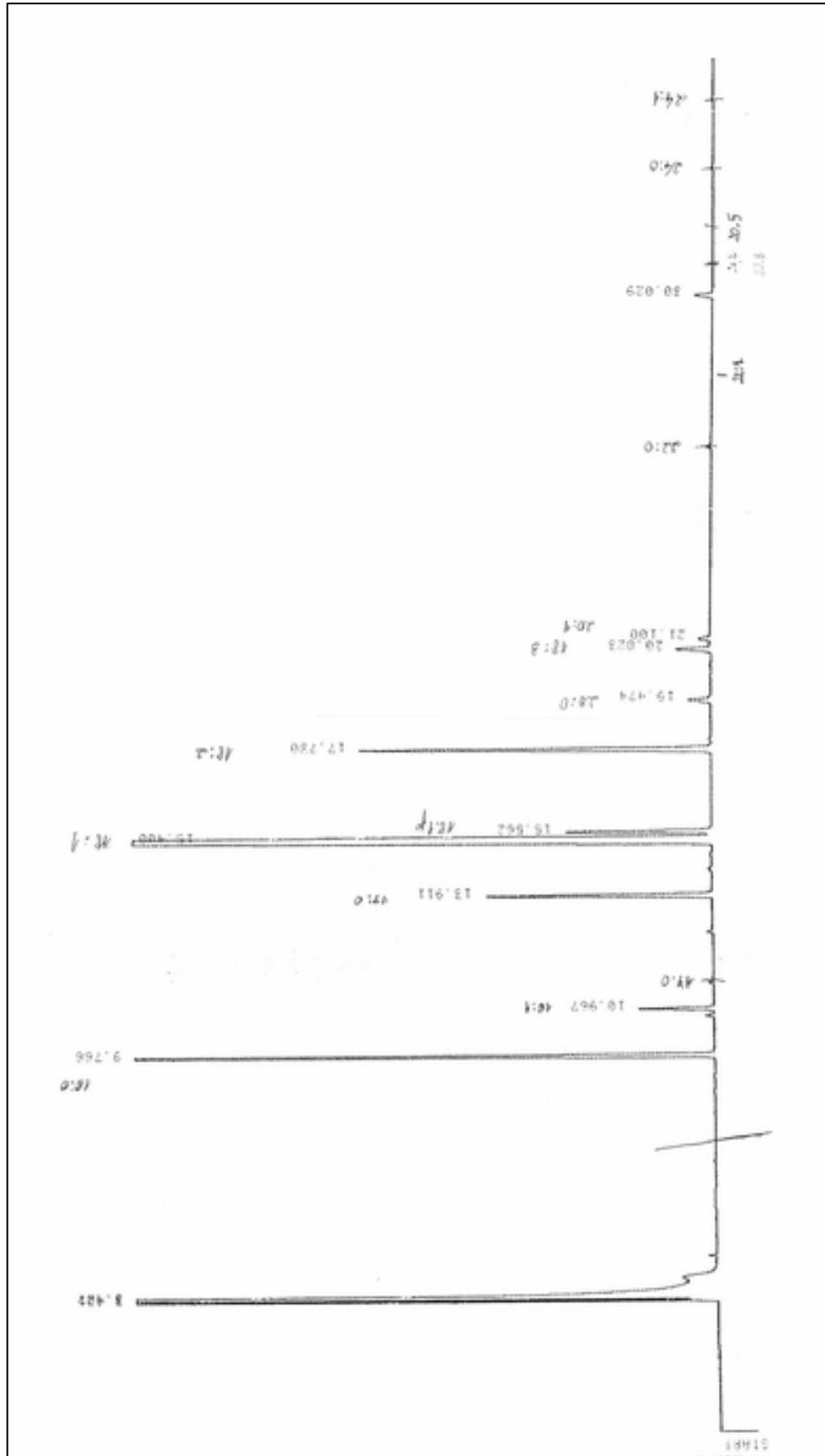
ANEXO V: Perfil cromatográfico dos ácidos graxos do azeite de oliva extra virgem português (P2).



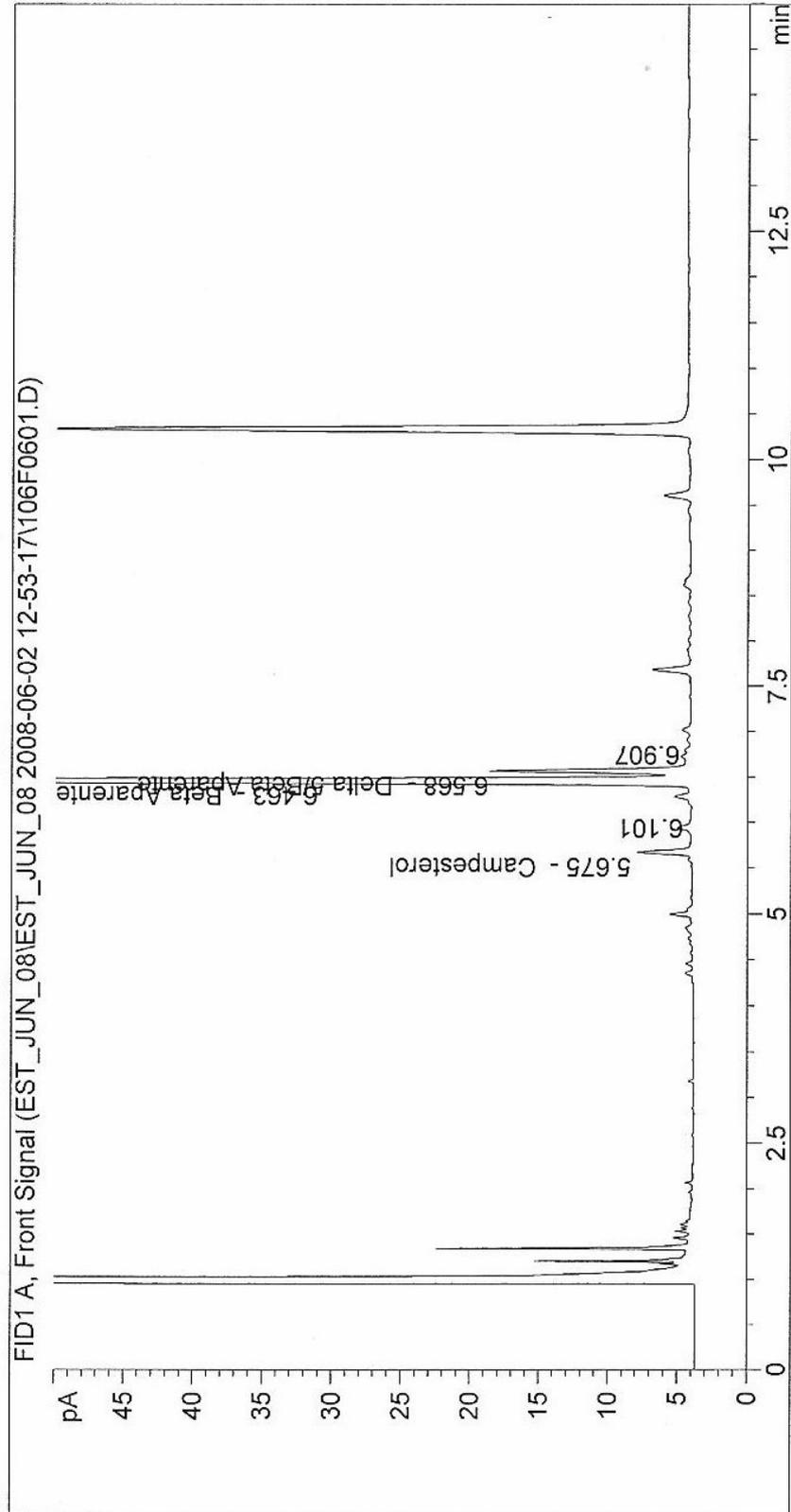
ANEXO VI: Perfil cromatográfico dos ácidos graxos do azeite de oliva extra virgem controle (espanhol, E1).



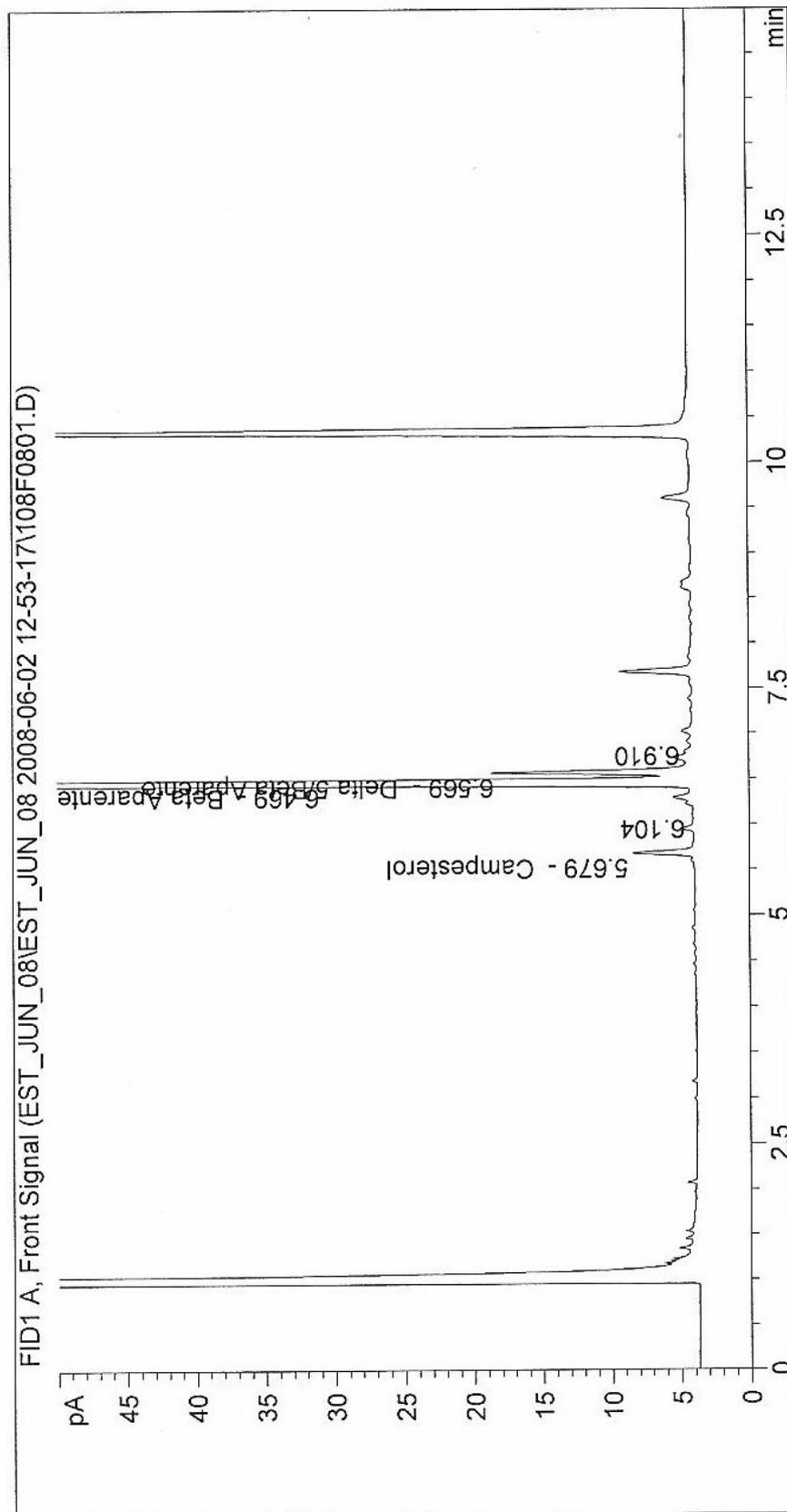
ANEXO VII: Perfil cromatográfico dos ácidos graxos do azeite de oliva extra virgem espanhol adicionado de 100 ppm de *trans*-resveratrol.



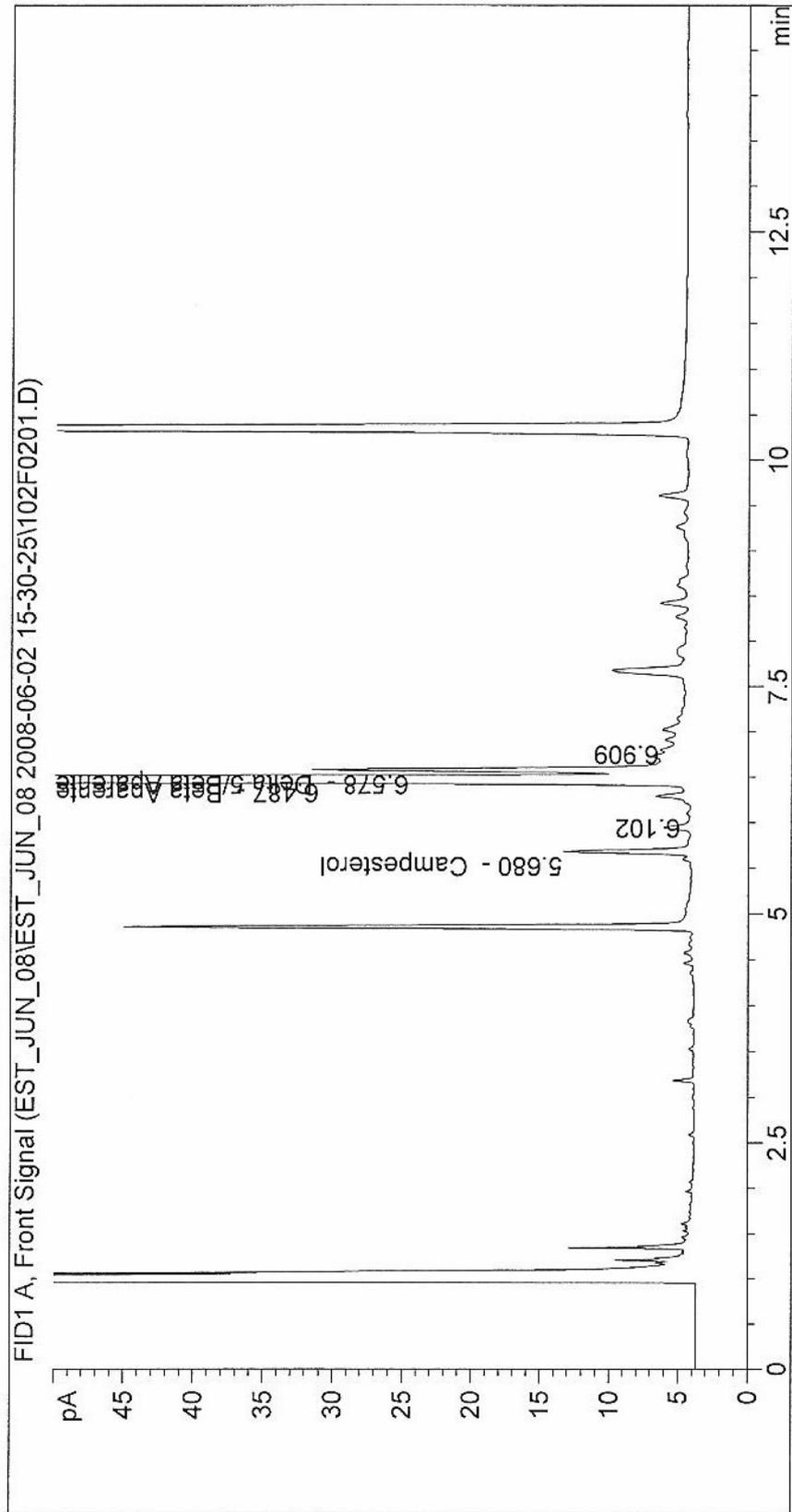
ANEXO VIII: Perfil cromatográfico dos esteróis do azeite de oliva extra virgem português (P1).



ANEXO IX: Perfil cromatográfico dos esteróis do azeite de oliva extra virgem português (P2).



ANEXO X: Perfil cromatográfico dos esteróis do azeite de oliva extra virgem controle (espanhol, E1).



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)