



Instituto Politécnico de Castelo Branco  
Escola Superior Agrária

**Relatório de Estágio**

**Polifenóis Totais em Azeites Virgens - Estudo de  
metodologias de extracção e quantificação**

**Helena Isabel Veríssimo Viegas  
Engenharia Biológica e Alimentar**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Maria de Fátima Pratas Peres**

**Castelo Branco, Outubro de 2010**

***“As doutrinas expressas neste trabalho  
são da inteira responsabilidade do seu autor”***

O presente Estágio foi realizado na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Maria de Fátima Pratas Peres.

## Agradecimentos

No percurso deste estudo e trabalho que agora termina participaram, directa ou indirectamente, várias pessoas e uma instituição que merecem o meu sincero agradecimento, que de modo particular gostaria de agradecer:

À Escola Superior Agrária de Castelo Branco, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho de estágio, assim como, os meios que cedeu para a sua elaboração.

À minha orientadora de estágio Eng.<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Fátima Peres, pela sua dedicada orientação e atenção, pelo constante apoio, pela disponibilidade e compreensão, pelas sábias correcções e pelos conhecimentos transmitidos ao longo da minha formação académica.

Às Engenheiras Cecília Gouveia e Conceição Vitorino, pelo acolhimento, simpatia, disponibilidade e pela contribuição na realização da parte experimental deste trabalho.

Às minhas colegas, Marisa Serrano, Sónia Ribeiro e Ana Cardoso, pela amizade partilhada ao longo da nossa vida académica, pelo apoio nos momentos de maior desânimo, pelo companheirismo e pelas nossas longas conversas.

O maior agradecimento é dirigido à minha família, pelo amor e apoio que sempre me deram, pela paciência e pela presença, carinho e sorriso nos bons e maus momentos.

A todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, aqui fica o meu agradecimento.

MUITO OBRIGADA!

# Índice Geral

Agradecimentos

Índice de figuras

Índice de tabelas

Resumo

Abstract

Lista de abreviaturas

1. Introdução.....	1
2. Polifenóis Totais .....	2
2.1. Importância da presença de polifenóis totais nos azeites virgens .....	5
2.1.1. Interesse sensorial .....	5
2.1.2. Protecção contra a oxidação no azeite virgem .....	6
2.1.3. Benefícios para a saúde.....	8
3. Metodologias de extracção e quantificação de polifenóis totais e orto-difenóis .....	9
3.1. Extracção de polifenóis totais.....	9
3.2. Quantificação de polifenóis totais e orto-difenóis por espectroscopia UV/VIS .....	12
4. Material e métodos .....	14
4.1. Caracterização das amostras em estudo .....	14
4.2. Metodologia de extracção de azeite em equipamento Abencor .....	15
4.3. Extracção de polifenóis .....	17
4.3.1. Extracção Líquido/Líquido (LLE).....	17
4.3.2. Extracção em fase sólida (SPE).....	18
4.4. Quantificação de polifenóis totais.....	18
4.4.1. Preparação da curva de calibração (em ácido cafeico) .....	18
4.4.2. Método Clássico (Método Folin-Ciocalteu) .....	19
4.4.3. Preparação da curva de calibração (em ácido gálico) .....	20
4.4.4. Micrométodo (Waterhouse, 2001) .....	20
4.5. Extracção de orto-difenóis.....	21
4.5.1. Preparação da curva de calibração (em ácido cafeico) .....	21
4.5.2. Quantificação de orto-difenóis.....	22
5. Resultados.....	23

5.1. Caracterização química dos azeites virgens em estudo.....	23
5.2. Comparação entre a extracção de polifenóis totais por SPE e por LLE.....	24
5.3. Polifenóis totais e orto-difenóis dos ensaios de extracção.....	25
5.4. Relação entre o método clássico e o micrométodo .....	27
6. Conclusões.....	28
Referências bibliográficas.....	29
Anexo	

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estrutura química básica dos compostos fenólicos. ....	2
<b>Figura 2.</b> Esquema simplificado da auto-oxidação .....	6
<b>Figura 3.</b> Mecanismo da acção dos antioxidantes fenólicos .....	7
<b>Figura 4.</b> Foto ilustrativa da extracção LLE, na etapa de separação das duas fases imiscíveis. ....	10
<b>Figura 5.</b> Etapas em SPE para isolamento de um composto.....	12
<b>Figura 6.</b> Azeitona da cultivar Galega Vulgar utilizada para a extracção dos azeites em estudo.....	14
<b>Figura 7.</b> Curva de calibração para polifenóis totais (mg de ácido cafeico/L). ....	19
<b>Figura 8.</b> Curva de calibração para polifenóis totais (mg de ácido gálico/L). ....	20
<b>Figura 9.</b> Curva de calibração para orto-difenóis (mg de ácido cafeico/L). ....	22
<b>Figura 10.</b> Relação entre a extracção de polifenóis totais por LLE e por SPE, quantificados pelo método clássico (mg ác. cafeico/kg azeite). ....	24
<b>Figura 11.</b> Resultados da concentração de polifenóis totais, de diferentes ensaios em equipamento Abencor, extraídos por LLE e quantificados pelo micrométodo (mg ác. gálico/kg azeite).....	25
<b>Figura 12.</b> Resultados da concentração de orto-difenóis (mg ác. cafeico/kg de azeite), nos diferentes ensaios estudados, extraídos por LLE.....	26
<b>Figura 13.</b> Relação entre a concentração de polifenóis totais e a concentração de orto-difenóis (mg ác. cafeico/kg de azeite). ....	27
<b>Figura 14.</b> Relação entre a quantificação de polifenóis totais pelo método clássico (mg ác. cafeico/kg azeite) e pelo micrométodo (mg ác. gálico/kg azeite). ....	27

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Polifenóis totais encontrados no azeite e respectivas estruturas químicas. ....	3
<b>Tabela 2.</b> Teores de polifenóis totais e $K_{225}$ de diferentes cultivares.....	5
<b>Tabela 3.</b> Correlação ( $R^2$ ) entre a estabilidade oxidativa e algumas características químicas. ....	7
<b>Tabela 4.</b> Acções benéficas dos polifenóis totais no organismo Humano.....	8
<b>Tabela 5.</b> Ensaio realizado em equipamento Abencor. ....	16
<b>Tabela 6.</b> Descrição de amostras complementares. ....	17
<b>Tabela 7.</b> Resultados (média $\pm$ desvio padrão) da determinação dos ácidos gordos livres e da análise por espectrofotometria no ultravioleta. ....	23

# Polifenóis Totais em Azeites Virgens - Estudo de metodologias de extracção e quantificação

Helena Isabel Veríssimo Viegas

## Resumo

O presente estudo incidiu sobre azeite monovarietal da variedade Galega Vulgar (*Olea europaea L. subsp. europaea*), colhida no olival da Quinta da Senhora de Mércules, Escola Superior Agrária de Castelo Branco, durante a campanha de 2009/2010.

A extracção do azeite foi efectuada laboratorialmente em equipamento Abencor. Ensaaiaram-se diferentes tempos de termobatedura e adição de adjuvante. Caracterizou-se o estado oxidativo e hidrolítico das amostras obtidas e avaliou-se os seus teores em polifenóis e orto-difenóis.

Nas amostras obtidas estudaram-se duas técnicas de extracção de polifenóis: extracção líquido-líquido (LLE) e extracção em fase sólida (SPE). A preparação de amostras por SPE deu resultados sistematicamente mais baixos, o que pressupõe que a LLE foi mais eficiente na extracção de polifenóis do azeite virgem. Paralelamente comparou-se a quantificação de polifenóis totais por espectroscopia UV/VIS pelo método clássico com uma nova metodologia. Esta apresentou bons resultados, maior rapidez e vantagens económicas e ambientais.

**Palavras-chave:** LLE, SPE, polifenóis totais, espectroscopia UV/VIS.

# Total Polyphenols in Virgin Olive oil – Extraction and quantification methodologies

Helena Isabel Veríssimo Viegas

## **Abstract**

This study focused on monovarietal olive oil Galega Vulgar (*Olea europaea* L. subsp. *Europaea*), harvested in 2009/2010, in the olive grove Quinta da Senhora de Mércules, Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

Olive oil extraction was performed by Abencor equipment. Different times of malaxation and adjuvant were studied. Hydrolytic and oxidative rancidity of the samples were evaluated as well as and the content of total polyphenols and ortho-diphenols.

Two methods of extraction of polyphenols were studied: liquid-liquid extraction (LLE) and solid phase extraction (SPE). The sample preparation by SPE gave lower polyphenol contents, which shows that LLE was more efficient in the extraction of these compounds from olive oil. Simultaneously we compared the quantification of total polyphenols by UV / VIS spectroscopy by the classic method with a nother methodology. This one is faster and showed lower costs and waste production.

**Keywords:** LLE, SPE, total polyphenols, UV/VIS spectroscopy.