



# Alegações de Saúde em Azeite de Montanha

Cecília Maria Marcelo da Silva Gouveia

## **Orientador**

Doutora Maria de Fátima Pratas Peres

Relatório de trabalho de fim de curso apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura em Biotecnologia Alimentar, realizado sob a orientação científica da Professora Adjunta Maria de Fátima Pratas Peres, do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Novembro de 2019



## Dedicatória

*À memória do Professor Luís Henriques.*



Trabalho financiado pelo CENTRO-01-0246-FEDER-000004/6756, no âmbito do Projeto Promoção e Valorização de Azeites de Montanha.





## Agradecimentos

Ao concluir este trabalho, e olhando para trás, vejo que esta aventura nem sempre foi fácil. A transposição das barreiras encontradas ao longo deste percurso foi em muito facilitada por ter contado com o apoio de pessoas a quem me cabe agora agradecer.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria de Fátima Pratas Peres, pela ajuda imprescindível na realização deste trabalho, por todos os ensinamentos e sugestões que me foram transmitidos, não apenas agora, mas em todo o meu percurso académico e profissional.

À Escola Superior Agrária e ao Instituto Politécnico de Castelo Branco por nos conceder todos os meios necessários para realização deste trabalho.

À minha amiga e colega Maria da Conceição Vitorino, pelo seu enorme e precioso apoio em todas as etapas deste processo.

Aos meus filhos Ricardo e Jéssica que, embora longe, conseguiram sempre dissipar as minhas inseguranças.

A todos os meus amigos e familiares que me ajudaram, encorajaram e acreditaram que eu seria capaz.

Por último, mas não em último, uma palavra para o António, que com o seu apoio incondicional, particularmente, nos momentos de algum desânimo, foi determinante para levar este projeto até ao fim.

Um obrigado muito especial aos meus pais, exemplo de vida, que em muito contribuíram para o que sou.

A todos muito brigada!



## Resumo

Os estudos mais atuais evidenciam diversos benefícios do azeite para a saúde, o que levou a União Europeia a aprovar alegações nutricionais e de saúde sobre vários dos seus componentes, nomeadamente, ácidos gordos monoinsaturados (ácido oleico), insaturados, vitamina E (tocoferóis), e uma alegação de saúde específica sobre os “polifenóis do azeite”, apenas para azeites que contenham no mínimo 5 mg de hidroxitirosol e tirosol por 20 g de azeite.

Atualmente não existe um método oficial para determinar o conteúdo destes compostos fenólicos em azeites e a maioria das metodologias propostas, envolvem a extração líquido-líquido quase sempre com solventes tóxicos ou poluentes. Por seu turno, os solventes eutéticos naturais (NADES) devido à sua alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, são considerados solventes ecológicos, promissores para vários tipos de aplicações, designadamente, na extração de compostos bioativos.

Neste trabalho determinaram-se os teores de ácidos gordos maioritários por metodologia NIR, os tocoferóis totais e o hidroxitirosol e tirosol por HPLC. Para a extração dos compostos fenólicos hidrofílicos utilizou-se um solvente natural eutético (NADES) composto por ácido láctico, glucose e água numa proporção molar de (3:1:3). O estudo foi realizado em azeites provenientes da Região da Comunidade Intermunicipal das Beiras e Serra da Estrela, para avaliar se sustentariam as referidas alegações, dado que, a sua presença na rotulagem, pode representar um poderoso instrumento de diferenciação de azeites de elevada qualidade.

Os resultados obtidos mostraram que em relação aos ácidos gordos e à vitamina E, todos os azeites suportam as alegações nutricionais e de saúde permitidas. Relativamente ao hidroxitirosol e tirosol verificou-se que o método de extração é adequado para este tipo de compostos e que apenas um dos azeites estudados, não contempla o valor mínimo legislado.

## Palavras chave

Alegação de saúde, hidroxitirosol, HPLC, solventes eutéticos naturais.



## Abstract

Recent studies show several benefits of olive oil for human health. In fact, this evidence led the European Union to approve nutritional and health claims on several olive oil compounds, namely, monounsaturated fatty acids (oleic acid), unsaturated acids and vitamin E (tocopherols), and a specific health claim on “olive oil polyphenols” exclusive for olive oils with a minimum of 5 mg of hydroxytyrosol and tyrosol per 20 g of oil.

There is still no official method to evaluate the content of these phenolic compounds and most of the proposed methods imply a liquid-liquid extraction, almost recurring to toxic or pollutant solvents. However, Natural Deep Eutetic Solvents (NADES), considered ecologic solvents, due to their high biocompatibility and biodegradability, are very promising for several applications, namely for the extraction of bioactive compounds.

In the present work, the most important fatty acids were evaluated by NIR methodology and total tocopherols, hydroxytyrosol and tyrosol by HPLC. NADES solvent composed by lactic acid, glucose and water in a molar ratio of (3:1:3 M) was used for the extraction of hydrophilic phenolic compounds in virgin olive oils from “Beiras and Serra da Estrela” Region.

The aim of this study was to confirm whether or not the data supports the nutritional and health claims referred previously, since the presence of such claims in olive oils' labeling may represent a strong differentiation factor for premium oils. The results show that all olive oils fulfill the requirements regarding fatty acids and vitamin E to display the nutritional and health claims allowed and also that for the extraction of hydroxytyrosol and tyrosol the methodology used is adequate, with one single oil failing to fall within the legal limits for the health claim.

## Key words

Health claims, hydroxytyrosol, HPLC, natural deep eutethic solvents.



# Índice geral

	<b>Pag.</b>
Resumo.....	IX
Abstract.....	XI
Índice geral.....	XIII
Índice de figuras.....	XV
Lista de tabelas.....	XVII
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos.....	XIX
1. Introdução.....	1
2. Composição química do azeite virgem.....	2
2.1. Ácidos gordos.....	2
2.2. Fenóis hidrofílicos.....	4
2.3. Fenóis lipofílicos.....	6
3. Efeito do azeite virgem na saúde.....	7
3.1. Ácidos gordos.....	7
3.2. Fenóis hidrofílicos.....	8
3.3. Fenóis lipofílicos.....	11
4. Alegações nutricionais e de saúde aplicáveis ao azeite virgem.....	12
4.1. Alegações nutricionais.....	12
4.2. Alegações de saúde.....	13
4.3. Pontos fracos da legislação.....	14
5. Material e métodos.....	15
5.1. Material.....	15
5.1.1. Amostras.....	15
5.1.2. Reagentes.....	16
5.2. Métodos.....	16
5.2.1. Ácidos gordos.....	16
5.2.2. Tocoferóis.....	16
5.2.3. Fenóis totais.....	16
5.2.4. Hidroxitirosol e tirosol.....	18
6. Resultados e discussão.....	19
6.1. Ácidos gordos.....	19
6.2. Fenóis hidrofílicos.....	20
6.2.1. Fenóis totais.....	20
6.2.2. Hidroxitirosol e tirosol.....	22
6.3. Fenóis lipofílicos.....	26
7. Conclusões.....	27
Referências bibliográficas.....	28



## Índice de figuras

	<b>Pag.</b>
<b>Figura 1</b> - Representação esquemática da composição química do azeite virgem.....	2
<b>Figura 2</b> - Estruturas químicas de secoiridoides encontrados na azeitona.....	4
<b>Figura 3</b> - Estruturas químicas de álcoois fenólicos e secoiridoides encontrados no azeite virgem.....	4
<b>Figura 4</b> - Mecanismo de hidrólise dos secoiridoides por ação das $\beta$ -glucosidases endógenas.....	5
<b>Figura 5</b> - Estruturas químicas dos tocoferóis e tocotrienóis.....	6
<b>Figura 6</b> - Representação esquemática da regulação fisiológica modulada pelo estado redox intracelular.....	9
<b>Figura 7</b> - Representação esquemática das micro extrações metanólica e NADES.....	17
<b>Figura 8</b> - Curva de calibração de ácido gálico para quantificação de fenóis totais em espectroscopia VIS.....	18
<b>Figura 9</b> - Representação esquemática do procedimento para a hidrólise ácida do extrato fenólico e respetivo controlo.....	18
<b>Figura 10</b> - Curvas de calibração de hidroxitirosol (A) e tirosol (B) em HPLC.....	19
<b>Figura 11</b> - Fenóis totais (mg EAG kg <sup>-1</sup> ) dos azeites provenientes dos produtores da CIMBSE extraídos por solvente metanol-água e solvente NADES.....	21
<b>Figura 12</b> - Fenóis totais (mg EAG kg <sup>-1</sup> ) dos azeites estudados (extração por solvente NADES)...	21
<b>Figura 13</b> - Teores de hidroxitirosol (A) e tirosol (B) (mg kg <sup>-1</sup> ) nos azeites monovarietais da região CIMBSE.....	23
<b>Figura 14</b> - Teores de hidroxitirosol (A) e tirosol (B) (mg kg <sup>-1</sup> ) nos azeites provenientes dos produtores da CIMBSE.....	23
<b>Figura 15</b> - Cromatogramas de um azeite monovarietal sem hidrólise (A) e com hidrólise (B).....	24
<b>Figura 16</b> - Hidroxitirosol (mg 20 g <sup>-1</sup> ) para a alegação de saúde dos azeites monovarietais da região CIMBSE.....	25
<b>Figura 17</b> - Hidroxitirosol (mg 20 g <sup>-1</sup> ) com e sem hidrolise ácida, dos azeites dos produtores da região CIMBSE.....	25
<b>Figura 18</b> - Tocoferóis totais (mg kg <sup>-1</sup> ) das amostras estudadas.....	26



## Lista de tabelas

	<b>Pag.</b>
<b>Tabela 1</b> - Ácidos gordos do azeite virgem, grau de insaturação e respetivos limites Reg. (UE) n.º 1348/2013.....	3
<b>Tabela 2</b> - Ácidos gordos principais (%) de azeites de várias cultivares portuguesas.....	3
<b>Tabela 3</b> - Hidroxitirosol e tirosol (mg 20 g <sup>-1</sup> ) com e sem hidrolise de azeites italianos.....	5
<b>Tabela 4</b> - Valores médios de tocoferóis (mg kg <sup>-1</sup> ) provenientes de olivais de sequeiro (S) e de regadio (R) em duas épocas de colheita (outubro e novembro).....	6
<b>Tabela 5</b> - Atividade biológica e benefícios dos compostos fenólicos do azeite para a saúde.....	12
<b>Tabela 6</b> - Lista de alegações nutricionais permitidas para o azeite virgem (Reg. n.º 1924/2006).....	13
<b>Tabela 7</b> - Lista de alegações de saúde permitidas para o azeite virgem (Reg. (UE) n.º 432/2012).....	14
<b>Tabela 8</b> - Ácidos gordos maioritários (%) dos azeites monovarietais estudados.....	19
<b>Tabela 9</b> - Ácidos gordos maioritários (%) dos azeites provenientes dos produtores da região CIMBSE.....	20



## Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

ADN – Ácido desoxirribonucleico  
AGMI- ácido gordo monoinsaturado  
AGPI- ácido gordo polinsaturado  
AGS- ácido gordo saturado  
AL - ácido lipóico  
AU - ácido úrico  
AV – azeite virgem  
Bcl-2 - B-cell lymphoma 2  
CAT – catalase  
CIMBSE – Comunidade Intermunicipal das Beiras e Serra da Estrela  
COI - Conselho Oleícola Internacional  
CoQ10 - coenzima Q10  
COX-1 – cicloxigenase-1  
COX-2 - cicloxigenase-2  
CT - colesterol total  
DCV - doenças cardiovasculares  
EAG – equivalente de ácido gálico  
EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar  
ERN - espécies reativas de azoto  
ERO - espécies reativas de oxigénio  
GSH – glutathione  
GSHPX - glutathione peroxidase  
H<sub>2</sub>O - água  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – ácido sulfúrico  
HDL - lipoproteínas de alta densidade  
HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência  
HTyr – hidroxitirosol (3,4-DHPEA)  
IL-6 - interleucina-6  
LDL - lipoproteínas de baixa densidade  
M – molaridade  
MCF-7 - linha celular de cancro de mama humano isolada pelo Michigan Cancer Foundation-7  
MELL – micro extração líquido/líquido  
MeOH-H<sub>2</sub>O – metanol-água  
MM - massa molecular  
NADES – natural deep eutetic solvente  
NIR- Espectroscopia de Infravermelho Próximo  
OH -grupo hidróxido  
PCR - proteína C reativa  
*p*-HPEA-EDA – oleocantal  
PRX - peroxirredoxinas  
RL – radical (ais) livre (s)  
SkBr3 - linha celular de cancro de mama humano isolada pelo Memorial Sloan – Kettering Cancer  
TG - triacilgliceróis  
Trx - tioredoxinas  
Tyr – tirosol (*p*-HPEA)  
UV- ultravioleta  
3,4-DHPEA-EA - oleuropeína aglicona  
3,4-DHPEA-EDA – oleaceína