

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**  
**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**ESTABILIDADE DE AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM (*Olea  
europaea*) EM DIFERENTES SISTEMAS DE EMBALAGEM**

**Simone Faria Silva**

Bacharel em Ciências dos Alimentos

**Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues Anjos**

Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de  
Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Campinas – SP  
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Si38e	<p>Silva, Simone Faria</p> <p>Estabilidade de azeite de oliva extra virgem (<i>Olea europaea</i>) em diferentes sistemas de embalagem / Simone Faria Silva. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.</p> <p>Orientador: Carlos Alberto Rodrigues Anjos Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.</p> <p>1. Azeite de oliva. 2. Estabilidade oxidativa. 3. Estocagem. 4. Embalagem. I. Anjos, Carlos Alberto Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.</p>
-------	--

Título em inglês: Virgin olive oil (*Olea europaea*) stability in different packaging systems

Palavras-chave em inglês (Keywords): Olive oil, Oxidative stability, Storage, Package

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Carlos Alberto Rodrigues Anjos

Denise Fabiana Silvestre Becker de Almeida

Renato Grimaldi

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

## BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues Anjos  
(Orientador)

---

Dra. Denise Fabiana Silvestre Becker de Almeida  
(Membro)

---

Dr. Renato Grimaldi  
(Membro)

---

Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria  
(Membro)

---

Profa. Dra. Thais Maria Ferreira de Souza Vieira  
(Membro)

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação ESTABILIDADE DE AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM (*Olea europaea*) EM DIFERENTES SISTEMAS DE EMBALAGEM defendida em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ por \_\_\_\_\_ aprovado pela comissão julgadora em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

Dedico,

Aos meus pais, Maria e Francisco, pelo imenso amor, confiança e apoio em todos os momentos e escolhas da minha vida.

Aos meus irmãos, Guilherme, Fernanda e Henrique, pelo incentivo, carinho e pela certeza de que sempre serão meu porto seguro, o que torna meu caminho mais ameno.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida e pela graça de vivê-la dignamente.

Aos meus pais, Francisco e Maria, pela primorosa criação e incansável esforço em assegurar uma educação de qualidade a mim e meus irmãos. Pela confiança e por nunca deixar de nos incentivar. Vocês são meu exemplo de vida e dignos de eterna admiração.

Aos meus irmãos, Guilherme, Fernanda e Henrique, e à minha cunhada Dani, pelo grande apoio, incentivo e pela mais confiável amizade.

Ao meu orientador professor Dr. Carlos A. R. Anjos, pela oportunidade concedida, atenção e apoio na realização deste trabalho.

À Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini, a principal responsável pela concretização deste projeto, pela orientação, apoio e dedicação. Você sempre terá o meu reconhecimento.

Aos amigos do laboratório de Embalagem e Estabilidade de Alimentos pelo companheirismo e pelos bons momentos de descontração. Agradeço especialmente ao meu amigo Wellington pela incansável disposição em ajudar e ouvir; à Tati Sakamoto pela grande ajuda nas intermináveis análises; à Clívia por me socorrer na lavagem das inesgotáveis vidrarias; e à Eliene pelas dicas de estatística.

À aluna de graduação Mônica Balzano pela grande ajuda durante os vários meses de muitas análises.

À professora Dra. Lireny A. G. Gonçalves por disponibilizar o Laboratório de Óleos e Gorduras para a realização do meu projeto; à Rosana Moreira pela atenção; à amiga Raquel, por me “socorrer” sempre; e, em especial, à técnica Tatiane Pareto pela boa vontade e ajuda nas análises de tocoferóis.

Ao meu amigo Diogo, pelo companheirismo, grande ajuda e muita paciência no convívio diário.

À Karol e Graciela, pela amizade e ajuda no envase e na análise de compostos fenólicos.

À amiga Cecília, pelo companheirismo e pelos bons momentos compartilhados. À Noelita, pela amizade e sua grande alegria que me deixava sempre de bom humor.

À amiga esalqueana Maisena (Lígia), pela grande amizade e pelos bons momentos de descontração dentro e fora da UNICAMP.

Às também esalqueanas Saory (Danielle) e Dacort (Priscila) pelos anos de amizade, muitos momentos de alegria e pelo apoio na realização do mestrado.

Aos professores, Dr. José de Assis F. Faria e Dra. Thais M. F. S. Vieira, pela disposição na correção desta dissertação e pelas sugestões dadas.

Aos membros da banca, Dra. Denise F. S. B. Almeida e Dr. Renato Grimaldi, por aceitarem o convite e contribuírem com os seus conhecimentos.

Às empresas, Emplas Ltda., Revipack e Bunge, por oferecerem as embalagens de PET, as tampas e os selos e o azeite de oliva, respectivamente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro no projeto de pesquisa.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	.xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
SUMMARY .....	xvii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1

### CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1 Origem e propagação do cultivo.....	5
2 Características de cultivo da oliveira .....	6
3 Variedades e características da azeitona.....	7
4 Processamento do azeite de oliva extra virgem .....	9
5 Composição química do azeite de oliva .....	11
5.1 Fração saponificável (glicerídica).....	11
5.2 Fração insaponificável (não glicerídica).....	12
5.2.1 Hidrocarbonetos.....	12
5.2.2 Tocoferóis .....	13
5.2.3 Pigmentos.....	14
5.2.4 Compostos fenólicos.....	14
6 Aspectos nutricionais do azeite de oliva.....	15

7	Legislação e características de identidade do azeite de oliva .....	17
8	Dados do mercado: produção, importação, exportação e consumo.....	18
8.1	Mercado brasileiro de azeite de oliva.....	19
9	Degradação do azeite de oliva .....	19
10	Estabilidade do azeite de oliva e formas de estocagem .....	22
10.1	Estocagem no escuro .....	23
10.2	Estocagem sob exposição à luz .....	24
10.3	Armazenamento a granel.....	24
10.4	Acondicionamento em embalagem.....	25
11	Sistemas de embalagens .....	26
11.1	Embalagens plásticas .....	27
11.2	Embalagens de vidro .....	27
11.3	Embalagens metálicas.....	28
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29

## CAPÍTULO 2

	ESTABILIDADE DE AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM EM EMBALAGENS DE PET E LATA DE FOLHA-DE-FLANDRES, SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM E SUBMETIDO À INERTIZAÇÃO.....	34
	RESUMO.....	35
1	INTRODUÇÃO .....	37
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	39
2.1	Amostras de azeite.....	39
2.2	Preparo das amostras .....	39

2.3 Estocagem .....	40
2.4 Métodos .....	43
2.4.1 Análises Físico-Químicas .....	43
2.4.2 Análises de Caracterização das Embalagens Plásticas: .....	45
2.4.3 Análise Estatística.....	46
2.5 Procedimento Experimental .....	46
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1 Caracterização das embalagens de PET .....	48
3.2 Caracterização do azeite extra virgem .....	53
3.3 Estabilidade do azeite extra virgem.....	55
4 CONCLUSÕES .....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	81

### CAPÍTULO 3

ESTABILIDADE DE AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM EM EMBALAGENS DE VIDRO E LATA DE FOLHA-DE-FLANDRES, SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM E SUBMETIDO À INERTIZAÇÃO.....	85
---	----

RESUMO.....	86
-------------	----

1 INTRODUÇÃO .....	88
--------------------	----

2 MATERIAL E MÉTODOS .....	90
----------------------------	----

2.1 Amostras de azeite.....	90
-----------------------------	----

2.2 Preparo das amostras .....	90
--------------------------------	----

2.3 Estocagem .....	91
---------------------	----

2.4 Métodos .....	93
-------------------	----

2.4.1 Análises Físico-Químicas .....	93
2.5 Análise Estatística .....	95
2.6 Procedimento Experimental .....	95
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	97
3.1 Caracterização do azeite extra virgem .....	97
3.2 Estabilidade do azeite extra virgem.....	100
4 CONCLUSÕES .....	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	120
CONCLUSÕES GERAIS .....	123

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Parâmetros de caracterização de embalagens PET nas cores âmbar e transparente (cristal)..... 50
- Tabela 2.** Resultados das análises de caracterização da amostra inicial de azeite de oliva extra virgem e limites dos parâmetros considerados pela legislação..... 54
- Tabela 3.** Análise do teor de ácidos graxos livres das amostras de azeite de oliva extra virgem em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.... 57
- Tabela 4.** Análise de umidade das amostras de azeite de oliva extra virgem em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem..... 59
- Tabela 5.** Índice de peróxido das amostras de azeite de oliva extra virgem em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem..... 61
- Tabela 6.** Análise de variância de K232 dos nove tratamentos de amostras de azeite de oliva extra virgem analisadas durante 6 meses de estocagem. .... 63
- Tabela 7.** Média da extinção específica a 232 nm em relação ao tempo de estocagem..... 64
- Tabela 8.** Extinção específica a 232 nm durante 6 meses de estocagem para cada tipo de tratamento..... 64
- Tabela 9.** Extinção específica a 270 nm das amostras de azeite de oliva extra virgem em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem. .... 67
- Tabela 10.** Análise de variância do teor de compostos fenólicos totais dos nove tratamentos de amostras de azeite de oliva extra virgem analisadas nos meses 0, 3 e 6 de experimento..... 69
- Tabela 11.** Média do teor de compostos fenólicos totais dos tratamentos em relação ao tempo de estocagem. .... 69
- Tabela 12.** Teor de  $\alpha$ -tocoferol de azeite de oliva extra virgem em nove diferentes tratamentos analisadas nos meses 0, 3 e 6 de experimento..... 71
- Tabela 13.** Teor de clorofila das amostras de azeite de oliva extra virgem em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem..... 74
- Tabela 14.** Cor L\*C\*h das amostras de azeite de oliva extra virgem em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem..... 77

<b>Tabela 15.</b> Cor Lovibond das amostras de azeite de oliva extra virgem em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.....	78
<b>Tabela 16.</b> Resultados das análises de caracterização da amostra inicial de azeite de oliva extra virgem e limites dos parâmetros considerados pela legislação.....	98
<b>Tabela 17.</b> Análise do teor de ácidos graxos livres das amostras de azeite de oliva extra virgem em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.	101
<b>Tabela 18.</b> Análise de umidade das amostras de azeite de oliva extra virgem em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.....	103
<b>Tabela 19.</b> Índice de peróxido das amostras de azeite de oliva extra virgem em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.....	104
<b>Tabela 20.</b> Análise de variância de K232 dos cinco tratamentos de amostras de azeite de oliva extra virgem analisadas durante 6 meses de estocagem.....	107
<b>Tabela 21.</b> Média da extinção específica a 232 nm em relação ao tempo de estocagem.....	107
<b>Tabela 22.</b> Extinção específica a 232 nm durante 6 meses de estocagem para cada tipo de tratamento.....	107
<b>Tabela 23.</b> Extinção específica a 270 nm das amostras de azeite de oliva extra virgem em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.....	109
<b>Tabela 24.</b> Análise de variância do teor de compostos fenólicos totais dos cinco tratamentos de amostras de azeite de oliva extra virgem analisadas nos meses 0, 3 e 6 de experimento.....	110
<b>Tabela 25.</b> Média do teor de compostos fenólicos totais dos tratamentos em relação ao tempo de estocagem.....	111
<b>Tabela 26.</b> Teor de $\alpha$ -tocoferol das amostras de azeite de oliva extra virgem em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.....	112
<b>Tabela 27.</b> Teor de clorofila das amostras de azeite de oliva extra virgem em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.....	114
<b>Tabela 28.</b> Cor L*C*h das amostras de azeite de oliva extra virgem em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.....	117
<b>Tabela 29.</b> Cor Lovibond das amostras de azeite de oliva extra virgem em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.....	118

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Embalagens usadas no experimento.....	39
<b>Figura 2.</b> Processo manual de selagem, injeção de nitrogênio, medida de oxigênio no headspace e fechamento com septo e tampa.....	40
<b>Figura 3.</b> Estocagem das amostras. ....	41
<b>Figura 4.</b> Tratamentos usados no processo.....	42
<b>Figura 5.</b> Fluxograma representativo do procedimento experimental. ....	47
<b>Figura 6.</b> Colapso das embalagens não inertizadas com nitrogênio (as duas garrafas à direita).....	48
<b>Figura 7.</b> Teste de integridade da selagem das embalagens de PET. ....	51
<b>Figura 8.</b> Transmitância de embalagens de PET nas cores âmbar e transparente (cristal).....	52
<b>Figura 9.</b> Comportamento das amostras de azeite de oliva extra virgem quanto ao teor de ácidos graxos livres em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.....	56
<b>Figura 10.</b> Comportamento das amostras de azeite de oliva extra virgem quanto ao índice de peróxido em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem. ....	60
<b>Figura 11.</b> Comportamento das amostras de azeite de oliva extra virgem quanto ao teor de $\alpha$ -tocoferol em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem. ....	72
<b>Figura 12.</b> Comportamento das amostras de azeite de oliva extra virgem quanto ao teor de clorofila em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.....	73
<b>Figura 13.</b> Embalagens usadas no experimento.....	90
<b>Figura 14.</b> Injeção de nitrogênio na embalagem.....	91
<b>Figura 15.</b> Estocagem das amostras nas câmara de luz e em caixas. ....	92
<b>Figura 16.</b> Tratamentos usados no processo.....	92

**Figura 17.** Fluxograma representativo do procedimento experimental. .... 96

**Figura 18.** Comportamento das amostras de azeite de oliva extra virgem quanto ao teor de ácidos graxos livres em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem. .... 102

**Figura 19.** Comportamento das amostras de azeite de oliva extra virgem quanto ao índice de peróxido em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem. .... 105

**Figura 20.** Comportamento das amostras de azeite de oliva extra virgem quanto ao teor de  $\alpha$ -tocoferol em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem. .... 112

**Figura 21.** Comportamento das amostras de azeite de oliva extra virgem quanto ao teor de clorofila em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem. 114

## RESUMO

O consumo de azeite de oliva no Brasil apresentou um crescimento de 70% na última década. As gôndolas dos supermercados foram tomadas por uma diversidade de azeites de oliva acondicionados em vários tipos de embalagens. Esses produtos são todos importados, sendo que uma parte é fracionada e envasada no Brasil, visto que não existe produção em escala comercial no país. O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade do azeite de oliva extra virgem em diferentes sistemas de embalagem. As amostras de azeite de oliva extra virgem foram fracionadas e acondicionadas em embalagens de polietileno tereftalato (PET) nas cores cristal (transparente) e âmbar; em latas de folha-de-flandres; e em garrafas de vidro transparente. Um lote destas embalagens foi inertizado com nitrogênio gasoso. O envase e o fechamento foram feitos de forma manual. As amostras foram estocadas à temperatura ambiente ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e em duas condições: mantidas em caixas de papelão ao abrigo da luz e expostas à luz (2900 lux) por 12 horas/dia por um período de seis meses. Para determinação da estabilidade do azeite foram realizadas análises físico-químicas de ácidos graxos livres, índice de peróxidos, extinção específica a 230 e 270 nm, teor de clorofila e cor  $L^*C^*h$ , no momento inicial e a cada 30 dias. Já as análises de umidade, compostos fenólicos totais, teor de tocoferóis e cor Lovibond foram feitas em intervalos de 90 dias. Observou-se que no período de 6 meses de estocagem, os resultados mais expressivos ocorreram devido à foto-oxidação, com degradação significativa nos compostos  $\alpha$ -tocoferol, clorofila e significativa alteração da cor. Os efeitos da auto-oxidação foram observados pelo ligeiro aumento do valor de K232 e do índice de peróxido. Quando armazenados no escuro durante 6 meses, os quatro tipos de embalagem foram eficazes em manter a estabilidade oxidativa do azeite. Quando exposto à luz, o azeite das embalagens de PET e vidro transparentes apresentou expressiva degradação. Na embalagem de PET âmbar a degradação foi mais lenta, porém significativa. A inertização com nitrogênio não teve efeito sobre a estabilidade do azeite nos diferentes tipos de embalagens. Assim, diante dos resultados obtidos no experimento e sabendo que o azeite de oliva é exposto à luz nos pontos de venda e durante o consumo doméstico,

o uso de embalagens transparentes não é recomendado para azeites de oliva extra virgem. Quanto à embalagem de PET âmbar, faz-se necessário melhorar seus parâmetros de barreira à luz, como a pigmentação e a espessura da parede.

**Palavras-chave:** azeite de oliva, estabilidade oxidativa, estocagem, embalagem.

## SUMMARY

Brazilian consumption of olive oil presented a growth about 70% in the last decade. Market shelves has been filled by a diversity of olive oil conditioned in a variety of packages. In the Brazilian marketing all of the olive oil are imported and part of them are parceled and packed in Brazil, since in the country there is no production in commercial scale. The objective of this work is to evaluate the stability of virgin olive oil in different packaging systems. The olive oil was fractioned and packed in transparent and amber polyethylene terephthalate (PET) bottles, transparent glass bottles and tins cans. Half of the package received a nitrogen flow. The filling and closing were done manually. The samples were stored during six months at room temperature ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and in two conditions: in cardboard boxes without exposition to light and with light exposition (2900 lux) for 12 hours/day. The quality parameters to determination of the oil stability were analyzed monthly: free fatty acid, peroxide value, specific extinction at 230 and 270 nm, chlorophyll content and color  $L^*C^*h$ . The moisture, total phenolics,  $\alpha$ -tocopherol content and Lovibond color were evaluated every ninety days. It was observed that within 6 months of storage, the most significant results were due to photo-oxidation, causing significant degradation on the contents of  $\alpha$ -tocopherol and chlorophyll and changes in the color. The effects of auto-oxidation were observed by the slight increase in K232 and peroxide value. It was realized that when stored in the dark for six months, the packages studied were effective in maintaining the oil stability. The most significant changes occur in the olive oil exposed to light in transparent PET and glass bottles. The inerting with nitrogen had no effect on the stability of olive oil. Thus, considering the results obtained in the experiment and knowing the fact that olive oil is exposed to light at points of sale and during the domestic consumption, the transparent packages are not recommended for extra virgin olive oil. Relating to the amber PET bottles exposed to light, the effect of the oxidation was slower, but significant. Therefore, it's necessary to improve its light barrier like the thickness and the pigmentation.

**Key-words:** olive oil, oxidative stability, storage, package.

## INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o terceiro importador mundial de azeite de oliva, com um consumo de 42,5 mil toneladas em 2010 (IOOC, 2010).

Dentre os óleos vegetais comestíveis comercializados mundialmente, o azeite de oliva (*Olea europaea*) é um dos mais importantes e antigos. O azeite de oliva é o produto obtido de azeitonas maduras, procedentes de oliveiras sadias, cujo processamento tenha sido realizado com frutos frescos evitando qualquer tratamento que altere a natureza química de seus componentes, tanto durante a extração como no seu armazenamento (GOODACRE; KEL; BIANCHI, 1993).

O azeite de oliva não é apreciado apenas por seus méritos gastronômicos. Desde os tempos antigos ele tem sido reconhecido pelas suas propriedades nutritivas e terapêuticas. Tal afirmação tem vindo de constatações de inúmeras pesquisas epidemiológicas, clínicas e experiências colaborativas conduzidas em escala internacional e que têm demonstrado que o azeite de oliva é eficaz na proteção da saúde humana (VIOLA, 1995).

A composição do azeite de oliva extra virgem é resultante de uma interação complexa entre as variedades de olivas, condições ambientais, grau de maturação do fruto e tecnologia de extração (SABA *et al.*, 2005).

O azeite de oliva é composto por duas frações: a fração saponificável (glicerídica) e a insaponificável (não glicerídica). Sua composição é formada primeiramente por triacilgliceróis (aproximadamente 99%), seguido de ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, e uma variedade de hidrocarbonetos, esteróis, alcoóis alifáticos, tocoferóis e pigmentos. Um grande número de compostos fenólicos e voláteis está igualmente presente. Alguns destes compostos contribuem para características únicas do azeite de oliva (BOSKOU, 2006).

A abundância em ácido oléico, um ácido graxo monoinsaturado, é a característica que destaca o azeite de oliva dos outros óleos vegetais. Em particular, o conteúdo de ácido oléico varia de 56% a 84% do total de ácidos graxos, enquanto o ácido linoléico, o principal ácido graxo essencial e o mais abundante ácido poli-insaturado em nossa dieta, está presente na concentração entre 3% a 21% (MURKOVIC *et al.*, 2004).

A fração insaponificável (não glicerídica) do azeite de oliva virgem representa de 1-2% do azeite em massa. Consiste em vários componentes, tais como: compostos orgânicos voláteis, compostos fenólicos, tocoferóis, pigmentos, esteróis, esqualeno, entre outros, que são responsáveis pelo sabor, estabilidade e propriedades nutricionais do azeite de oliva (SABA *et al.*, 2005).

A qualidade do azeite de oliva é afetada por vários fatores, tais como técnicas agrônômicas, estação do ano, estado sanitário das azeitonas, estágio de maturação, sistema de colheita e transporte, método e duração da estocagem e tecnologias de processamento. A preservação da qualidade depende das condições adotadas para estocar o produto e do tempo de estocagem (RANALLI *et al.*, 2000).

A oxidação lipídica representa uma série complexa de reações, em que há participação de oxigênio e radiações luminosas, entre outros fatores. Estas reações afetam a qualidade dos óleos, levando ao surgimento de uma alteração sensorial conhecida como rancidez oxidativa, que freqüentemente resulta em rejeição do produto (AZEREDO, 2001).

A embalagem tem importância no controle das interações entre o azeite e o ambiente, protegendo contra a oxidação e preservando sua qualidade. Sabendo-se que a concentração de oxigênio no espaço livre da embalagem acelera as reações de oxidação, as indústrias empregam o nitrogênio para preencher o espaço interno dos tanques de estocagem e das garrafas plásticas durante o envase, o que reduz o volume de oxigênio em contato com o óleo e diminui as reações de oxidação, conseqüentemente aumentando a vida útil do produto (ARRUDA *et al.*, 2006). Os tanques de aço inoxidável, as embalagens opacas e os recipientes de vidro colorido

protegem o óleo do oxigênio e da radiação. Os polímeros com características especiais tais como o PET (polietileno tereftalato) revestido com resina de alta barreira ou com resina de alta barreira incluindo absorvedor de oxigênio tem sido sugerido recentemente como uma promissora alternativa para o vidro tradicional (GAMBACORTA *et al.*, 2004).

Este projeto tem como objetivo avaliar a estabilidade do azeite de oliva extra virgem em diferentes sistemas de embalagem. Para isso, foram realizados dois estudos. No primeiro foram avaliadas garrafas de PET transparente, PET âmbar e latas de folha-de-flandres. No segundo, as embalagens avaliadas foram garrafas de vidro transparente e latas de folha-de-flandres. Em ambos os experimentos as amostras foram submetidas a duas condições de estocagem (com incidência de luz e no escuro) e foi avaliado o uso do nitrogênio como gás inerte com o intuito de inibir ou retardar a oxidação lipídica e as alterações de compostos de importância nutricional e organoléptica.

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1 Origem e propagação do cultivo

A oliveira é uma árvore característica da paisagem mediterrânea. Tem origem nos países do sul da Ásia, como Síria, Ásia Menor, Etiópia, Egito e Índia, chegando ao Mediterrâneo através do Oriente Médio. Desde os tempos antigos, a oliveira tem contribuído, em termos práticos e simbólicos, para a economia, saúde e gastronomia dos habitantes do Mediterrâneo. Em Creta, nas regiões costeiras da Grécia, nas ilhas do Egeu oriental e nas ilhas Jônicas se encontram olivais de forma abundante. Da mesma forma as oliveiras são amplamente encontradas no Chipre, na costa da Turquia, Síria, Líbano, Israel, no sul da Espanha, Itália e na costa do Norte de África. Imigrantes espanhóis espalharam a cultura da oliveira para o México, Argentina e Uruguai, na América Latina, e os italianos levaram a para a Austrália (POLYMEROU-KAMILAKIS, 2006).

Há relatos de indícios de frutos de oliveira datados do período Neolítico (8.000 aC). No entanto, o princípio da cultura da oliveira ocorreu algum tempo depois, em algum ponto no terceiro milênio aC, no início da Idade do Bronze. Mediante as trocas feitas pelos Fenícios com outros centros marítimos a oliveira propagou-se para lugares de terrenos acidentados. A partir do século XVI aC, as árvores chegaram às Ilhas Gregas e também à Líbia e Cártago. Os gregos difundiram a agricultura de oliveira pelas suas colônias e rotas tomadas por seus marinheiros. Mais tarde, os romanos descobriram as oliveiras através de contatos com as colônias gregas na Itália. Embora eles não fossem admiradores de azeitonas e de azeite, os romanos expandiram a árvore por todo o gigantesco império. Eles utilizavam o azeite nos seus banhos e como combustível, sendo que, para fins comestíveis, o azeite era considerado uma mercadoria inferior. Com a ascensão do Império Romano e a conquista da Grécia, Ásia Menor, Egito e o aumento dos canais de negociação em torno do Mar Mediterrâneo, o azeite se tornou importante, não só como alimento,

mas também como um produto farmacêutico e fonte de energia (POLYMEROU-KAMILAKIS, 2006).

Quando a América foi descoberta, missionários e colonizadores introduziram o vinho e oliveiras para o Novo Mundo. As oliveiras foram cultivadas no Chile, Argentina e na Califórnia. Atualmente, a oliveira é cultivada em muitos países, incluindo Espanha, Itália, Grécia, Tunísia, Turquia, Portugal, Marrocos, Síria, Argélia, Egito, Israel, Líbia, Jordânia, Líbano, Chipre, Croácia, Eslovênia, Argentina, Chile, México, Peru, Estados Unidos e Austrália (BOSKOU, 2009).

## **2 Características de cultivo da oliveira**

A oliveira é o nome comum para cerca de 35 espécies de arbustos e árvores perenes do gênero *Olea* da família *Oleaceae*, nativas das regiões tropicais e temperadas. Geralmente, quando mencionado a árvore oliveira, está se referindo à *Olea europaea*, a espécie mais conhecida pelo cultivo de frutos comestíveis.

Dependendo da subespécie e condições ambientais, sua altura pode variar de 3-20 metros. As formas baixas (4-5 metros de altura) estão se tornando comuns em muitos países produtores de azeite pela facilidade na colheita (BOSKOU, 2006).

Normalmente a oliveira é muito resistente às condições desfavoráveis e tem alguma tolerância à salinidade da água. Mas, para que possa produzir bem é necessário que haja um ambiente adequado e cuidados no cultivo (irrigação, controle de colheita, boas condições nutricionais, poda e controle de pragas) necessários para o pleno desenvolvimento das características agrônômicas da árvore (FOURATI; COSENTINI; KARRA, 2002).

A oliveira necessita de um inverno ameno e um verão quente e seco. Ela se desenvolve onde a precipitação excede 60 centímetros por ano, embora possa ser encontrada em áreas com apenas 40 centímetros de precipitação caso o solo retenha água. Embora a oliveira prefira solos profundos, ela pode ser cultivada com

êxito em vários tipos de solos, mesmo os mais áridos, pedregosos e inférteis. Nessas terras marginais, a cultura da oliveira pode ser a única alternativa viável à desertificação (BOSKOU, 2006).

### **3 Variedades e características da azeitona**

A oliveira tem muitas variedades que apresentam maiores ou menores diferenças fenotípicas e genéticas. Atualmente, as diferenças no tamanho, cor, teor de óleo, composição de ácidos graxos e outras propriedades são verificadas como características de origem dos principais países que cultivam oliveiras (FOURATI; COSENTINI; KARRA, 2002).

O fruto da *Olea europea* é uma drupa de forma oval que pesa de 2 a 12 g, embora algumas variedades podem pesar até 20g. O pericarpo tem duas partes: o epicarpo (pele) e o mesocarpo (polpa), que responde por cerca de 65-83% do peso total. O endocarpo (caroço) pode variar de 13% para 30%. O epicarpo é coberto com cera e se transforma de verde-claro ao preto a medida que o fruto amadurece. Os mesmos cultivares de oliveira podem ser usados para azeitona de mesa e produção de azeite, mas geralmente a azeitona para azeite tem uma menor proporção de polpa por quantidade de caroço (4:1-7:1) em relação à azeitona para a preparação de azeitonas de mesa (7:1-10:1). (FOURATI; COSENTINI; KARRA, 2002).

O fruto contém água (até 70%), que é chamado de água "vegetal". A composição química da azeitona é: 50% água, 1,6% proteína, 22% lípidios, 19% carboidratos, 5,8% celulose, 1,5% minerais (cinzas). Outros componentes importantes são as pectinas, ácidos orgânicos, pigmentos e compostos fenólicos. Alguns dos componentes e produtos de hidrólise são encontrados na água vegetal, que é espremida com o óleo durante o processamento e é separada por centrifugação (PERCUSSI, 2007).

Os frutos ganham peso em diversas fases. Logo depois, ele começa a diminuir, basicamente pela perda de umidade. Como resultado, ocorre um aumento no teor lipídico. No outono e inverno, a fruta fica preta e o teor de óleo atinge o seu máximo. O óleo está concentrado principalmente no pericarpo (96-98%). A formação e concentração de óleo no fruto, um rico reservatório de diversas classes de lipídios, é possivelmente a razão pela qual o óleo tem sabor e aroma únicos (FIRESTONE, 2005).

O amadurecimento da azeitona é um processo lento e longo, que dura vários meses e varia de acordo com a latitude da área de cultivo, variedade, disponibilidade de água, temperatura e práticas de cultivo. A fim de obter um azeite aromático e com delicado sabor, é importante que sejam devidamente extraídos frutos maduros e sem danos. Portanto, o grau de maturação é um importante fator de qualidade. Do ponto de vista científico, é difícil medir e expressar em termos matemáticos, a contribuição de cada fator para a qualidade global do azeite extraído. De acordo com Montedoro e seus colaboradores (1986), o estágio de maturação tem uma contribuição de 30%. Outros fatores contribuem de acordo com os seguintes percentuais: a variedade (20%), colheita (5%), transporte e armazenamento na pré-moagem (15%); sistema de extração (30%) (FIRESTONE, 2005).

A primeira fase da maturação é conhecida como a fase "verde". Isso corresponde aos frutos verdes maduros que tenham atingido as suas dimensões finais. Após esta fase, a clorofila da pele é gradualmente substituída por antocianinas. Esta fase corresponde à transição para as fases "manchada", "roxa" e "preta" (MONTEDORO *et al.*, 1986).

Na fase entre a pele verde-amarelada e roxa, as azeitonas têm maior teor de compostos fenólicos. Por conseguinte, a decisão de obter um fruto mais maduro e com maior teor de óleo ou um fruto que originará um azeite com mais adstringência, é altamente dependente da época de colheita, que é o fator mais significativo para as variações na composição e qualidade sensorial. A decisão de produzir um azeite

altamente picante ou pungente, ou então, um azeite adocicado e brando é baseada no tempo de colheita (MONTEDORO *et al.*, 1986).

#### **4 Processamento do azeite de oliva extra virgem**

Quando devidamente extraído da azeitona *in natura*, madura e de boa qualidade, o azeite tem um perfil de características sensoriais. Sua composição em ácidos graxos é caracterizada por um bom equilíbrio entre ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. Pode ser consumido na forma bruta, conservando assim o conteúdo de vitaminas e compostos fenólicos de importância nutricional (PETRAKIS, 2006).

De acordo com as normas do Codex Alimentarius, International Oil Olive Council e Comunidade Européia, o azeite de oliva virgem é o óleo do fruto da oliveira obtido unicamente a partir de processos mecânicos ou outros meios físicos, em condições que não alterem o azeite, e que não tenham sofrido qualquer tratamento além da lavagem, decantação, centrifugação e filtração, excluindo os azeites obtidos com solventes, com adjuvantes de ação química ou bioquímica (BOSKOU, 2006).

A extração do azeite de oliva começa na oliveira e termina com o armazenamento do produto. Existem limitações em uma série de fatores antes do processo de extração que influenciam a quantidade e qualidade dos azeites. Os principais fatores são: as variedades de azeitona, as condições microclimáticas, a variabilidade dos solos, os sistemas de cultivo que regulam a capacidade de absorção de água do terreno e a retenção da água da chuva ou irrigação, e o monitoramento e controle de pragas (GUTIERREZ; ARNAUD; ALBI, 1999).

Ao tratar a azeitona como a matéria-prima, deve-se considerar: a fração dos componentes sólidos da pele, da polpa e do caroço, e as fases líquidas compostas pelo óleo e pela água vegetal. A processamento do azeite de oliva tem a finalidade

de separar uma das fases líquidas, a fase oleosa, dos outros componentes do fruto (AMIRANTE; CINE; MONTEL, 2001).

O objetivo de qualquer método de extração é extrair a maior quantidade possível do azeite sem alterar a sua qualidade original, sendo essencial usar somente métodos mecânicos ou físicos para a extração do óleo, evitando reações químicas e enzimáticas que podem mudar sua composição natural (PETRAKIS, 2006).

Nas plantas de extração de azeite há quatro operações principais:

- Limpeza dos frutos (retirada das folhas, lavagem dos frutos).
- Preparação da massa (esmagamento, malaxagem).
- Separação das fases sólida (bagaço) e líquida (oleosa e aquosa).
- A separação das fases líquidas (óleo / água vegetal).

O processo de extração se inicia pela limpeza dos frutos colhidos no momento ótimo de maturação, seguindo pela quebra da sua estrutura vegetal para liberar o óleo das células e, finalmente, obter as fases líquida e sólida. Por meio de pressão ou centrifugação, as fases sólida e líquida são separadas. Finalmente, as fases líquidas são separadas em água vegetal e óleo por decantação e / ou centrifugação. Como sub-produto, obtém-se uma massa de sólidos com diferentes percentuais de umidade e teor de óleo que é chamada de bagaço da azeitona (pomace) e um líquido oleoso com percentuais variados de partículas sólidas (AMIRANTE; CINE; MONTEL, 2001).

Após da limpeza, as azeitonas vão para a etapa de quebra que se destina a romper as células do fruto para liberar as gotículas de óleo. Nem todo o óleo pode ser liberado porque é praticamente impossível romper todas as células. Além disso, as gotas são cercadas por uma pseudo-membrana anfotérica, que tende a manter o óleo em estado de emulsão, cuja estabilidade depende do tamanho das gotas: quanto menor a gota, mais estável. Além disso, uma pequena quantidade de óleo permanece presa no sistema coloidal formado com a pectina. A malaxagem (também

referida como batimento) é fundamental para aumentar o rendimento da extração uma vez que este processo aumenta o efeito do esmagamento e uniformiza a massa. O objetivo principal é quebrar a emulsão óleo/água, de modo que as gotículas de óleo se juntem para formar gotas maiores. Para a separação da fase sólida e líquida pode ser empregado a prensagem, a centrifugação ou a percolação (filtragem seletiva). A última etapa do processo de extração é a decantação (ou clarificação) para a separação da fase oleosa dos sólidos em suspensão e da água residual (PETRAKIS, 2006).

## **5 Composição química do azeite de oliva**

A composição do azeite de oliva é constituída principalmente por triacilgliceróis (~99%). Os ácidos graxos livres, mono- e diacilgliceróis também compõem a fração glicerídica. A fração não glicerídica é composta por mais de 230 compostos, entre os quais os esteróis, esqualeno, alcoóis alifáticos, tocoferóis, pigmentos e compostos fenólicos. (LUH *et al.*, 2005).

### **5.1 Fração saponificável (glicerídica)**

Os principais ácidos graxos presentes no azeite de oliva são o palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1), linoléico (C18:2) e linolênico (C18:3). São encontrados traços dos ácidos mirístico (C14:0), heptadecanóico e eicosanóico (CODEX ALIMENTARIUS, 2003).

A composição em ácidos graxos poderá se diferenciar entre amostras, uma vez que esta depende da zona de produção, da latitude, do clima, da variedade e estágio de maturação do fruto. As diferentes características do ambiente de cultivo e da variedade da planta resultam em discrepantes concentrações dos quatro principais ácidos graxos (% ésteres metílicos): 7,8-18,8% (16:0); 58,5-83,2% (18:1); 2,8-21,1% (18:2); 0,42-1,91% (18:3) (BOSKOU; BLEKAS; TSIMIDOU, 2006).

Como outros óleos vegetais, o azeite de oliva tem alta concentração de ácido oléico e baixa concentração dos ácidos palmítico ( $\leq 2\%$ ) e esteárico na posição -2 das moléculas de triacilglicerol. Os triacilgliceróis encontrados em proporções significativas no azeite de oliva são OOO (40-59%), POO (12-20%), OOL (12,5-20%), POL (5,5-7%) e SOO (3-7%). Pequenas quantidades de POP, POS, OLnL, LOL, OLnO, PLL, PLnO e LLL são também encontradas (BOSKOU; BLEKAS; TSIMIDOU, 2006).

A presença de acilgliceróis parciais no azeite de oliva é devido à biossíntese incompleta do triacilglicerol e às reações de hidrólise. No azeite de oliva virgem, a concentração de diacilglicerol alcança de 1 a 2,8%. Monoacilgliceróis estão presentes em pequenas quantidades (menos que 0,25%). As condições de estocagem afetam a distribuição dos ácidos graxos. A molécula de 1,2-diacilglicerol presente nos azeites frescos tende a isomerizar na forma mais estável 1,3-diacilglicerol. Este rearranjo nos fornece informações sobre a idade do óleo e as condições de estocagem. A proporção de 1,3-/1,2-diacilglicerol é considerada um critério de monitoramento da qualidade do azeite (PEREZ-CAMINO & CERT, 1999).

## **5.2 Fração insaponificável (não glicerídica)**

A fração insaponificável (não glicerídica) do azeite de oliva virgem representa de 1-2% do azeite em massa. Esta fração consiste de vários componentes, tais como: compostos orgânicos voláteis, compostos fenólicos, tocoferóis, pigmentos, esteróis, esqualeno, entre outros, que são responsáveis pelo sabor, estabilidade e propriedades nutricionais do azeite de oliva (SABA *et al.*, 2005).

### **5.2.1 Hidrocarbonetos**

Os principais hidrocarbonetos presentes em quantidades consideráveis no azeite de oliva são o esqualeno e o  $\beta$ -caroteno (sendo este último um pigmento).

O esqualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) é proveniente da síntese do esterol. Parte dos efeitos benéficos do azeite de oliva para

a saúde é considerada proveniente da presença de esqualeno. O esqualeno é o principal constituinte da matéria isaponificável e faz parte de mais de 90% da fração dos hidrocarbonetos. Sua concentração vai de 200 a 7500 mg/kg de azeite. Níveis acima de 12.000mg/kg foram citados por Lanzon e colaboradores (1994). A concentração de esqualeno depende do cultivar da oliveira, das técnicas de extração e é reduzido drasticamente no processo de refino (BOSKOU; BLEKAS; TSIMIDOU, 2006).

Outro importante hidrocarboneto, presente em quantidades muito pequenas no azeite é o  $\beta$ -caroteno, precursor da vitamina A, que atua como seqüestrador de oxigênio, inibindo a oxidação lipídica desencadeada por este precursor. O  $\beta$ -caroteno e a luteína compõem as principais frações de carotenóides do azeite de oliva. A fração de hidrocarbonetos do azeite de oliva também é composta por hidrocarbonetos diterpenos e triterpenos, poliolefinas e parafinas (LANZON *et al.*, 1994).

### **5.2.2 Tocoferóis**

Os tocoferóis têm grande importância devido a sua atividade vitamínica (vitamina E) e por serem antioxidantes naturais. A forma predominante é o  $\alpha$ -tocoferol (90% do conteúdo total), cuja faixa de concentração é de 150 a 200 mg/kg de azeite, teor bem inferior se comparado ao óleo de soja (AUED-PIMENTEL, 1991).

A origem do azeite de oliva virgem tem um grande impacto no seu nível de tocoferóis. Os azeites Gregos estão entre os que contêm as mais altas concentrações de  $\alpha$ -tocoferol (127-370 mg/kg nos anos de colheita 1994-1995; 98-333 mg/kg em 1995-1996 e 100-365 mg/kg em 1996-1997) (PSOMIADOU *et al.*, 2000).

São encontradas baixas concentrações de  $\beta$ -tocoferol (~10 mg/kg),  $\delta$ -tocoferol (~10 mg/kg) e  $\gamma$ -tocoferol (~20 mg/kg). A concentração de tocoferóis é menor em frutos maduros. O sistema de extração também influencia na quantidade de

tocoferóis do azeite, sendo que o refino e a hidrogenação provocam a perda deste componente (BOSKOU; BLEKAS; TSIMIDOU, 2006).

### **5.2.3 Pigmentos**

A cor do azeite de oliva virgem tem tonalidades em verde e amarelo resultantes da presença de clorofila e carotenóides. A cor é influenciada pelo cultivar do azeite, grau de maturação, zona de produção, sistema de extração e condições de estocagem. Por esta razão, a cor é considerada como um índice de qualidade (BOSKOU; BLEKAS; TSIMIDOU, 2006).

A clorofila é encontrada como feofitina, sendo a forma predominante a feofitina *a*. As feofitinas são formadas como consequência da substituição dos íons de magnésio nas moléculas de clorofila por dois hidrogênios. Como resultado desta mudança, a feofitina *a* apresenta uma cor cinza-amarronzada, enquanto a feofitina *b* é verde oliva (MOYANO *et al.*, 2010). A presença de feofitina está relacionada com as condições de processamento e atividade enzimática. O manejo e o tempo de estocagem promovem mudanças no conteúdo de clorofila. Sob exposição à luz, a degradação dos pigmentos verdes causa a descoloração do azeite (PSOMIADOU & TSIMIDOU, 2002).

Os principais carotenóides presentes no azeite de oliva são a luteína e o  $\beta$ -caroteno. As xantofilas também compõem a fração de carotenóides (BOSKOU; BLEKAS; TSIMIDOU, 2006).

### **5.2.4 Compostos fenólicos**

A fração fenólica polar do azeite de oliva, conhecida por muitos anos como "polifenóis" (um termo obsoleto em publicações recentes) é na verdade uma mistura complexa de compostos com estruturas químicas diferentes obtidas do azeite por extração com metanol e água. Os trabalhos publicados sobre estes compostos têm aumentado exponencialmente uma vez que os compostos fenólicos estão

relacionados com a estabilidade do azeite e com suas propriedades funcionais (BOSKOU; BLEKAS; TSIMIDOU, 2006).

O azeite de oliva contém quantidades variáveis de substâncias fenólicas, que apresentam importante papel na estabilidade oxidativa dos azeites. Os principais compostos fenólicos no azeite de oliva são a oleuropeína, o hidroxitirosol e tirosol. Os compostos fenólicos presentes no azeite de oliva são potentes antioxidantes e seqüestradores de radicais livres. Normalmente, o hidroxitirosol é o antioxidante principal e a oleuropeína e tirosol são seqüestradores de radicais livres (MURKOVIC *et al.*, 2004).

Muitos compostos fenólicos do azeite, principalmente o hidroxitirosol e seus derivados, estão sendo cuidadosamente pesquisados com o objetivo de estabelecer uma relação entre sua ingestão e a prevenção de doenças cardiovasculares ou câncer (BOSKOU; BLEKAS; TSIMIDOU, 2006).

Os azeites diferem quanto ao teor de compostos fenólicos totais. Teores discrepantes têm sido relatados (de 5 a 1000 mg/kg) mas, os valores são geralmente entre 100 e 300 mg/kg. O cultivar, o sistema de extração e as condições de processamento, embalagem, distribuição e armazenamento são fatores críticos que afetam o conteúdo final de compostos fenólicos totais no azeite (TSIMIDOU, 1998).

É difícil estabelecer um nível para cada tipo de composto fenólico devido à variabilidade natural e à forte dependência da idade e do histórico do azeite após a produção. Os compostos fenólicos livres são encontrados principalmente em azeites armazenados, enquanto que os azeites frescos contêm formas mais complexas de agliconas (TSIMIDOU, 1998).

## **6 Aspectos nutricionais do azeite de oliva**

O azeite de oliva não é apreciado apenas por seus méritos gastronômicos. Desde os tempos antigos ele tem sido reconhecido pelas suas propriedades

nutritivas e terapêuticas. Tal afirmação tem vindo de constatações de inúmeras pesquisas epidemiológicas, clínicas e experiências colaborativas conduzidas em escala internacional e que têm demonstrado que o azeite de oliva é eficaz na proteção da saúde humana (VIOLA, 1995).

O azeite de oliva extra virgem é produzido de azeitonas de alta qualidade e é consumido *in natura*, ou seja, sem passar pelo processo de refino, o que mantém os compostos fenólicos (PERCUSSI, 2007). Seus micronutrientes protegem o organismo contra agentes externos e do desenvolvimento de doenças. Dentre os compostos da fração insaponificável (não glicéridica), o esqualeno tem sido apontado como um fator para a menor incidência de câncer nas populações mediterrânicas. O esqualeno é um intermediário fundamental na biossíntese não só do colesterol, mas também de todos os hormônios esteróides. O  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e os carotenóides contribuem para a reserva de antioxidantes no organismo humano, enquanto os esteróis sequestram os ácidos biliares e abaixam os níveis do colesterol LDL plasmático. O  $\beta$ -caroteno e a luteína compõem as principais frações de carotenóides do azeite de oliva. A luteína apresenta efeitos ligados à regeneração macular (KOH *et al.*, 2004). Os triterpenos, como o eritrodiol, apresentam propriedades anti-inflamatórias e os compostos fenólicos, ação antioxidante.

Conforme apresentado por Owen e colaboradores (2000), as propriedades promotoras de saúde do azeite de oliva extra virgem são resultado do perfil da fração fenólica, juntamente com as altas concentrações de esqualeno e de ácido graxo monoinsaturado, o ácido oléico. Um consumo habitual de azeite de oliva extra virgem fornecerá uma fonte contínua de antioxidantes, que podem reduzir o estresse oxidativo através da inibição da peroxidação lipídica, um fator diretamente ligado às doenças como câncer, doenças cardíacas e o envelhecimento. Os compostos fenólicos e o esqualeno têm efeitos quimiopreventivos ao câncer de mama e câncer colorretal. O azeite de oliva contém quantidades significativas de esqualeno que é transferido em grande parte à pele (o sebo pode conter 12%), apresentando um efeito protetor relacionado ao câncer de pele por realizar um mecanismo de sequestro do oxigênio singlete gerado pela ação da radiação ultravioleta.

## **7 Legislação e características de identidade do azeite de oliva**

A ANVISA (resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005) define o azeite de oliva como o produto obtido dos frutos da oliveira (*Olea europaea L.*), excluídos os óleos obtidos através de solventes ou processos de re-esterificação e ou qualquer mistura de outros óleos (BRASIL, 2005).

A legislação brasileira classifica os azeites de oliva quanto ao processo de obtenção nas seguintes categorias: azeite de oliva virgem, azeite de oliva refinado, azeite de oliva e óleo de bagaço de oliva refinado (BRASIL, 2000). Quanto à acidez, o azeite de oliva virgem é classificado como: extra virgem e virgem (BRASIL, 2005).

O azeite de oliva virgem ou extra virgem é aquele obtido do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros meios físicos, particularmente em condições térmicas que não levem à deterioração do azeite, e que não tenha sido submetido a outro tratamento que não a lavagem, a decantação, a centrifugação e a filtração. A acidez, expressa em ácido oléico, deve ser menor que 0,8%. Para ter essa característica, somente pode ser extraído a frio, sem passar por qualquer processo térmico ou químico que altere sua composição natural (PERCUSSI, 2007).

Os azeites são classificados por diferentes organizações internacionais de acordo com sua qualidade, a qual é estabelecida com base em determinados parâmetros. Estes parâmetros conferem processos hidrolíticos e oxidativos que ocorrem nos frutos ou durante os procedimentos de extração e refino, e também durante o armazenamento do azeite (TSIMIDOU, 2006).

Entre os parâmetros comuns a todas as organizações internacionais estão a determinação de ácidos graxos livres, peróxidos, absorvâncias espectrofotométrica na região UV, características organolépticas e solventes halogenados. Além disso, o Codex *Alimentarius* e a CEE incluem impurezas insolúveis, alguns metais e determinação de matéria insaponificável (TSIMIDOU, 2006).

## **8 Dados do mercado: produção, importação, exportação e consumo**

Durante os últimos 20 anos, a produção mundial aumentou quase 100% (1,4-2,9 milhões de toneladas). A Espanha é a líder na produção mundial (1,2 milhões de toneladas), seguida pela Itália (540 mil toneladas), Grécia (348 mil toneladas) e Portugal (50 mil toneladas). Conjuntamente estes países representam 79% da produção mundial. O grupo dos demais países do Mediterrâneo (Tunísia, Turquia, Síria, Marrocos) tem uma quota de 16%, deixando um pouco menos de 5% para o resto do mundo (IOOC, 2010).

A Espanha é a líder indiscutível na produção mundial (> 40%) e na UE (~50%) (IOOC, 2010). As exportações a granel para a Itália representam o principal destino das exportações espanholas (250 mil toneladas), sendo Portugal também um tradicional mercado (45.000 toneladas). No entanto, a produção espanhola está focada nos mercados de alto valor agregado. As exportações em pequenas embalagens para o consumo direto vem ganhando espaço e chegando a 180 mil toneladas, destinadas aos países Estados Unidos, Austrália, Japão, Canadá, Brasil e para a União Européia (França, Reino Unido, etc.) (ZAMPOUNIS, 2006).

Os principais países produtores de azeite são tradicionalmente os maiores consumidores do mundo. A Grécia tem o maior consumo per capita, 25 kg per capita, já a Itália e a Espanha consomem 12,3 e 12,6 kg, respectivamente (ZAMPOUNIS, 2006).

Os países importadores são divididos em dois grupos: o dos cinco países novos consumidores de azeite que corresponde aos Estados Unidos, Austrália, Canadá, Japão e Brasil e o grupo dos países da União Européia não produtores de azeite de oliva, o qual, inclui o Norte Europeu e a França (ZAMPOUNIS, 2006). O mercado dos Estados Unidos se tornou o maior fora do Mediterrâneo. As importações e o consumo estão superando 260 mil toneladas (IOOC, 2010).

## **8.1 Mercado brasileiro de azeite de oliva**

No Brasil, os tipos de óleo mais comumente comercializados são os de soja, canola, milho, girassol e o azeite de oliva. O azeite de oliva tem elevado sua participação no mercado principalmente em razão da intensa divulgação de seus efeitos benéficos à saúde, devido ao alto conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados presente em sua composição. Os atributos de sabor e aroma, peculiares ao azeite de oliva, o diferencia no mercado alimentício (OLIVEIRA, 2009).

O consumo de azeite de oliva no Brasil aumentou 70% em relação à década anterior (IOOC, 2010). O Brasil é o terceiro maior importador mundial de azeite de oliva, importando 42,5 mil toneladas entre 2009/2010 (IOOC, 2010).

Tornando-se dependente da importação para abastecimento interno, sem uma produção própria de azeitonas e azeite de oliva, o Brasil apostou no desenvolvimento de trabalhos de pesquisa e cultivo das oliveiras. A Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) iniciou um trabalho de cultivo e propagação de oliveiras na Fazenda Experimental de Maria da Fé no sul de Minas Gerais (EPAMIG, 2009). No entanto, ainda não existe no país produção em escala comercial. As principais atividades agroindustriais associadas ao processamento dos azeites de oliva no Brasil são fracionamento e embalagem do produto e acondicionamento (OLIVEIRA, 2009).

## **9 Degradação do azeite de oliva**

A reação de oxidação lipídica é representada pelas seguintes etapas: (i) formação de radicais livres lipídicos, iniciando o processo de oxidação, (ii) formação de hidroperóxidos como produtos de reação primária, (iii) formação de produtos secundários de oxidação e (iv) formação de produtos terciários de oxidação (POKORNY; SCHMIDT; PARKÁNYIOVÁ, 2005).

A oxidação lipídica é iniciada pela formação de radicais livres, mesmo no caso da oxidação lipídica catalisada por enzimas. A energia de ativação, necessária para a formação dos primeiros radicais livres, pode ser fornecida por uma fonte de energia térmica, radiação, oxigênio singlete ou outras fontes. Os ácidos graxos insaturados, principalmente os di- e tri-insaturados, são mais facilmente convertidos em radicais livres que ácidos graxos saturados uma vez que um átomo de hidrogênio é mais facilmente removido da molécula se uma ligação dupla está localizado no átomo de carbono adjacente. Uma carga de energia substancialmente menor é necessária para produzir radicais livres a partir de produtos de oxidação lipídica, especialmente na presença de metais de valência transitória, tais como cobre, ferro ou manganês (KAMAL-ELDIN & POKORNY, 2005).

O oxigênio reage com um carbono livre da molécula lipídica formando um radical peróxido. Os radicais peróxidos possuem alta energia e retiram um átomo de hidrogênio da molécula do lipídio. Assim, o radical peroxil se converte em uma molécula de hidroperóxido, e então, outro radical lipídico é produzido. Este processo pode ser repetido muitas vezes. Quando presentes em abundância, os radicais livres são muito reativos e reagem facilmente com outros radicais livres formando dímeros e polímeros. Os hidroperóxidos, especialmente os de ácidos graxos poli-insaturados, são muito instáveis. Os produtos secundários da oxidação lipídica também são instáveis; os aldeídos, em particular, são muito reativos. Eles são facilmente oxidados em peroxiácidos, que são instáveis e se decompõem em outros produtos. Os aldeídos, álcoois e cetonas são oxidados em hidroperóxidos, e moléculas com cadeias menores são formadas pela dissociação estes compostos (KAMAL-ELDIN & POKORNY, 2005).

Os produtos secundários de oxidação de lipídios são principalmente produtos de baixo peso molecular, como aldeídos, cetonas, álcoois e hidrocarbonetos de cadeia curta. O tempo para formação destes produtos derivados dos hidroperóxido é diferente para cada tipo de óleo. No azeite de oliva estes produtos formam imediatamente após a formação dos hidroperóxidos (VELASCO; ANDERSEN; SKIBSTED, 2003).

A taxa de oxidação lipídica depende de vários fatores. Como mencionado, lipídios poli-insaturados são mais rapidamente oxidados que lipídios monoinsaturados e lipídios saturados são praticamente estáveis. A oxidação aumenta com o aumento da temperatura, pressão de oxigênio e radiação. A oxidação é catalisada por metais pesados e inibida por antioxidantes. A água e os vários componentes não-lipídicos também podem afetar significativamente o processo. A oxidação lenta pode ocorrer no caso do armazenamento refrigerado e sob pressão de oxigênio reduzida ou em atmosfera com gás inerte. Os antioxidantes podem apenas reduzir a taxa de oxidação e não pará-la completamente (KAMAL-ELDIN & POKORNY, 2005).

A auto-oxidação e a foto-oxidação são os principais mecanismos de oxidação de óleos comestíveis durante o processamento e armazenamento. Dois tipos de oxigênio atuam nestes mecanismos de oxidação, um é chamado de oxigênio triplete e o outro é o oxigênio singlete. A auto-oxidação é uma reação de radicais livres que ocorre em cadeia, em que o oxigênio triplete atmosférico ( $^3\text{O}_2$ ) reage com um radical lipídico. A foto-oxidação de óleos comestíveis ocorre na presença de luz, sensibilizadores e oxigênio atmosférico, em que o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) é produzido (CHOE; LEE; MIN, 2005).

A oxidação lipídica ocorre quando o óleo, o oxigênio e catalisadores estão em contato. Tanto a concentração, quanto o tipo de oxigênio, são importantes na oxidação. A concentração de oxigênio dissolvido no óleo depende da pressão parcial de oxigênio no *headspace*. Quanto maior a concentração de oxigênio no *headspace*, maior será sua concentração dissolvido no óleo, e assim, maior será a oxidação do produto (DI GIOVACCHINO *et al.*, 2002).

A solubilidade do oxigênio é maior em óleo do que em água, e em óleos brutos do que em óleos refinados. O efeito da concentração de oxigênio na oxidação do óleo é maior sob temperatura elevada e na presença de luz e de metais. O oxigênio penetra no óleo por difusão, como durante o armazenamento a baixa temperatura, quando este não é agitado. A convecção é outra importante via de

penetração de oxigênio da superfície no óleo quando o mesmo é agitado, por exemplo, durante o processamento em alta temperatura (CHOE; LEE; MIN, 2005).

Os ácidos graxos livres atuam como pró-oxidantes, pois são mais suscetíveis à auto-oxidação que os ácidos graxos esterificados. As moléculas de mono e diacilgliceróis atuam como pró-oxidantes mesmo no armazenamento no escuro. Estas moléculas também diminuem a tensão superficial do óleo e aumentam a taxa de difusão do oxigênio do espaço livre (SALVADOR *et al.*, 2001).

As clorofilas e seus produtos de degradação, como as feofitinas e feoforbidas, na presença de luz e oxigênio atmosférico agem na síntese de  $^1O_2$  e aceleram a oxidação do óleo. As feofitinas têm maior atividade sintetizadora que a clorofila, mas menor atividade que as feoforbidas. Apesar de as clorofilas serem pró-oxidantes sob a luz, elas agem como antioxidantes no escuro, possivelmente pela doação de hidrogênio para os radicais livres (GUTIERREZ-ROSALES *et al.*, 1992).

Componentes minoritários naturais dos óleos e gorduras, tais como esteróis, tocoferóis ou outros derivados fenólicos, reagem facilmente com os radicais livres de cadeia lipídica ou com hidroperóxidos. Polifenóis, como os flavonóides e antocianinas, são frequentemente encontrados em alimentos de origem vegetal. Eles reagem com os radicais livres ou com hidroperóxidos de forma semelhante aos antioxidantes (KAMAL-ELDIN & POKORNY, 2005).

## **10 Estabilidade do azeite de oliva e formas de estocagem**

O azeite de oliva virgem é um óleo estável e sua vida útil é maior se comparada a de outros óleos comestíveis. A sua característica composição em ácidos graxos e a presença de antioxidantes (principalmente compostos fenólicos polares e  $\alpha$ -tocoferol) são considerados os fatores-chave da resistência do azeite de oliva à auto-oxidação. Uma série de outros componentes, como ácidos graxos livres, pigmentos, hidrocarbonetos insaturados, enzimas e traços de metais podem afetar

positiva ou negativamente a estabilidade oxidativa do azeite, embora em menor medida (BOSKOU, 2006).

Basicamente a vida útil do azeite de oliva não excede 18 meses. O tempo de consumo do azeite virgem é definido como o período sob temperatura ambiente dentro do qual não há desenvolvimento de “off-flavours” e os parâmetros de qualidade, tais como os valores de peróxidos e extinção específica são mantidos dentro dos limites aceitos para uma determinada categoria comercial (BOSKOU, 2006).

A vida útil do azeite de oliva depende do tipo de embalagem ou recipiente em que este está contido. Tanques de aço inoxidável, latas de folha-de-flandres e recipientes de vidro podem proteger o azeite do oxigênio e da luz. Polímeros com características especiais, tais como polietileno tereftalato revestido com resina de alta barreira e com absorvedor de oxigênio está sendo sugerido como uma alternativa promissora para o vidro tradicional (GAMBACORTA *et al.*, 2004).

O armazenamento de óleos sob atmosfera de nitrogênio pode prolongar sua vida útil, como mostrado por Di Giovacchino e colaboradores (2002). A importância da introdução de nitrogênio a uma linha de produção de azeite tem sido salientado (GARCÍA *et al.*, 2001).

### **10.1 Estocagem no escuro**

Em geral, o azeite de oliva virgem resiste mais à auto-oxidação que os outros óleos ricos em ácidos graxos monoinsaturados. A auto-oxidação do azeite virgem durante o armazenamento é um processo extremamente lento se o produto apresentar baixos valores iniciais peróxido/K232 e altos teores de compostos fenólicos e  $\alpha$ -tocoferol. A retirada do ar do azeite de oliva envasado é um pré-requisito para o controle da auto-oxidação (TSIMIDOU, 2006).

As alterações nos compostos fenólicos durante o armazenamento ocorrem devido aos processos hidrolíticos e oxidativos. A redução no teor de compostos

fenólicos totais acompanha as mudanças no substrato lipídico (PSOMIADOU & TSIMIDOU, 2002). O hidroxitirosol é um composto fenólico instável que é oxidado rapidamente, em contraste com tirosol. Assim, a perda de hidroxitirosol no armazenamento é maior que a dos derivados de tirosol. Os níveis de lignanas são menos afetados pelas condições de armazenamento. Os tipos e níveis de cada um dos compostos fenólicos influenciam na capacidade antioxidante do azeite distintamente (SERVILLI & MONTEDORO, 2002).

### **10.2 Estocagem sob exposição à luz**

O azeite de oliva virgem deve ser armazenado em condições livres da incidência de luz. Maior atenção deve ser dada quando expostos nos supermercados e também durante o uso doméstico.

A luz acelera a oxidação do óleo, especialmente na presença de sensibilizadores. As clorofilas são sensibilizadores comuns em óleos vegetais comestíveis. Os sensibilizadores absorvem a energia luminosa muito rapidamente para entrar em um estado singlete excitado e, em seguida, retornar ao estado fundamental através da emissão de luz, conversão interna ou cruzamento entre sistemas (POKORNY; SCHMIDT; PARKÁNYIOVÁ, 2005).

O azeite de oliva virgem contém fotossensibilizadores endógenos em níveis significativos (5-40mg de feofitina *a* / kg). A feoftina *a* possui maior efeito fotossensibilizante se comparado à clorofila. Este efeito é dependente da sua concentração e reforçado pela disponibilidade de oxigênio (ENDO *et al.*, 1984).

A perda de  $\alpha$ -tocoferol é maior do que a de compostos fenólicos em garrafas transparentes fechadas e expostas à luz (PSOMIADOU & TSIMIDOU, 2002).

### **10.3 Armazenamento a granel**

O azeite de oliva pode ser armazenado por muitos meses se forem tomadas precauções específicas contra a deterioração. Quando armazenado a granel, o azeite deverá estar contido em tanques ou tambores construídos de material

impermeável ao óleo. O seu interior deve ser inerte de modo que não haja absorção de odores ou outras substâncias (por exemplo, traços de metais), que aceleram a oxidação. O azeite deve ser protegido do ar, luz e oscilações de temperatura acima de 15°C. Recipientes de aço inoxidável são considerados ideais para o armazenamento. Eles têm um fundo em forma de cone para que os sedimentos possam ser removidos periodicamente. O gás nitrogênio pode ser adicionado ao espaço livre dos tanques. Os tambores metálicos devem ser revestidos de resina epóxi para evitar efeitos negativos sobre o sabor e a deterioração do azeite (BOSKOU, 2006).

#### **10.4 Acondicionamento em embalagem**

A embalagem deve ser projetada com o objetivo de obter melhor estabilidade à oxidação e assegurar uma vida útil adequada. Três fatores são importantes para a escolha de materiais de embalagem: impermeabilidade ao óleo, impermeabilidade aos gases e proteção contra luz (PIERGIOVANNI & LIMBO, 2010).

Os materiais utilizados nas embalagens de azeite são plástico, vidro e latas de aço. As latas, como as de folha-de-flandres, não são transparentes e são impermeáveis. Estes recipientes são também resistentes aos danos mecânicos e são adequadas para a litografia. O vidro é um material inerte e impermeável aos gases, mas o seu efeito protetor contra a luz pode variar. Os consumidores geralmente preferem vidro transparente, porque permite a visualização do azeite, o que, no entanto, não é recomendado uma vez que a foto-oxidação ocorre facilmente em vidro transparente ((BOSKOU, 2006).

Quanto menor a capacidade da embalagem, normalmente maior é a relação área/volume, o que exige que as embalagens de menores porções sejam melhor barreira ao oxigênio que as de grandes volumes (OLIVEIRA, 2006).

Quanto maior a concentração de oxigênio no *headspace*, maior será sua concentração dissolvida no óleo, e assim, maior será a oxidação do produto (DI GIOVACCHINO *et al.*, 2002). O volume ocupado pelo azeite envasado, em caso

algum dever ser inferior a 90% da capacidade do recipiente, exceto no caso de latas com capacidade igual ou inferior a 1 litro, na qual o volume ocupado, em caso algum, deve ser inferior a 80% da capacidade do recipiente (BOSKOU, 2006).

## **11. Sistemas de embalagens**

A embalagem pode influenciar diretamente a qualidade do azeite, protegendo o produto do oxigênio e luz. Os materiais utilizados para o acondicionamento de azeite incluem o vidro, metais e mais recentemente, plásticos e cartonados. Entre os plásticos, o PET conquistou uma grande parcela do mercado de azeite no varejo devido às suas inúmeras vantagens incluindo a transparência, inércia química e excelentes propriedades mecânicas. A incorporação de pigmentos e/ou agentes bloqueadores de radiação UV ou absorvedores de oxigênio pode melhorar as propriedades dos plásticos no que diz respeito à manutenção da qualidade do azeite (PRISTOURI; BADEKA; KONTOMINAS, 2010).

Os produtos susceptíveis à ação do oxigênio exigem embalagens que apresentem barreira ao oxigênio, sendo utilizados processos de envase a vácuo, atmosfera modificada e inertização (SARANTÓPOULOS *et al.*, 2001).

A embalagem para óleo vegetal comestível deverá, fundamentalmente, atuar no controle dos parâmetros que afetam a oxidação, ou seja, deverá apresentar boa barreira ao oxigênio, à umidade e à radiação, especialmente na faixa do ultravioleta. Também é essencial que a tampa da embalagem impeça o vazamento do produto e garanta ao sistema de embalagem pelo menos a mesma barreira ao oxigênio oferecida pelo corpo da embalagem. Outras propriedades desejadas são a resistência à carga vertical e a resistência ao colapso, que pode ocorrer devido ao consumo do oxigênio residual no interior da embalagem (OLIVEIRA, 2006).

### **11.1 Embalagens plásticas**

O polietileno tereftalato (PET) é um polímero obtido pela reação do ácido tereftálico a um etilenoglicol. Essa resina é popular como material de embalagem, especialmente no segmento de embalagens rígidas como garrafas, frascos e filmes biorientados (GARCIA, 1997).

A embalagem de polietileno tereftalato (PET) apresenta vantagens em relação aos custos para o fabricante do produto final e o apelo de compra dado pela transparência e brilho, que permite a visualização do produto. Os alimentos acondicionados em materiais plásticos estão sujeitos a diversos tipos de interação com o meio ambiente, dada a permeabilidade aos gases, vapor de água e vapores orgânicos através da embalagem (OLIVEIRA, 2006).

O PET tem sido destacado em comparação a outros materiais plásticos pelas suas propriedades mecânicas, como alta resistência à ruptura, perfuração, rasgamento e impacto; pelas propriedades de transparência e brilho similares ao vidro; e apresentar versatilidade em parâmetros de apresentação da embalagem (BROOKS & GILES, 2002).

Na especificação da embalagem plástica para alimentos sensíveis ao oxigênio, a escolha do polímero a ser utilizado, o processo de fabricação da embalagem e a distribuição da espessura do polímero na embalagem irão definir a quantidade de oxigênio que difundirá através do material. A temperatura de estocagem também influencia a permeabilidade desse gás. Quanto menor o volume da embalagem, normalmente maior é a relação área/volume, o que exige que a embalagem de menores volumes seja melhor barreira ao oxigênio quando comparado com as de grandes volumes (OLIVEIRA, 2006).

### **11.2 Embalagens de vidro**

O vidro confere certa proteção mecânica ao seu conteúdo, possui inércia química e física, é um material totalmente reciclável, além de ser esteticamente

superior e possuir grande apelo comercial. Porém, assim como os demais tipos de embalagens, o vidro apresenta inconvenientes: o peso, a fragilidade e a ocorrência de fraturas (HANLON; KELSEY; FORCINIO, 1998).

O vidro, como embalagem, apresenta características que o distingue perante os demais materiais: impermeabilidade aos gases, vapor d'água e aromas, relativamente inerte aos produtos e o fato de ser totalmente reciclável, o que permite sua reutilização. Outras vantagens que encontramos ao acondicionar determinado produto em vidro são: versatilidade de formatos e cores à embalagem final e a destacável apresentação visual que confere ao produto. No entanto, vidros transparentes e translúcidos apresentam limitações quanto à barreira à luz e proteção do alimento contra a foto-oxidação (HANLON; KELSEY; FORCINIO, 1998).

### **11.3 Embalagens metálicas**

As latas de folha-de-flandres foram usadas por um longo tempo para o acondicionamento de óleo e ainda são muito apreciadas por causa de suas muitas vantagens. Elas oferecem proteção total contra a luz, ao oxigênio, ao vapor de água e microorganismos, e são resistentes a diversos tipos de danos mecânicos. O interior da lata é protegido com resinas que protegem o metal da corrosividade do produto. Na conservação dos alimentos a opacidade da embalagem metálica é uma característica de grande importância, por prevenir alterações induzidas pela luz e radiação ultravioleta (OLIVEIRA, 2006).

A vida de prateleira da maioria dos produtos enlatados é determinada principalmente pela taxa de corrosão da embalagem. Nos alimentos os quais apresentam menor corrosividade, o fim de sua vida de prateleira ocorre devido a deteriorações das características sensoriais e perdas do valor nutritivo (PIERGIOVANNI & LIMBO, 2010).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIRANTE R.; CINI E.; MONTEL G. L.; PASQUALONE A. Influence of Mixing and Extraction Parameters on Virgin Olive Oil Quality. **Grasasy Aceites**. 52, p. 198-201, 2001.

ARRUDA, C. S.; GARCEZ, W. S.; BARRERA-ARELLANO, D; BLOCK, J. M. Industrial Trial to Evaluate the Effect of Oxygen Concentration on Overall Quality of Refined, Bleached, and Deodorized Soybean Oil in PET Bottles. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. n. 9, vol. 83, p.797-802, 2006.

AUED-PIMENTEL, S. **Avaliação do grau discriminatório de parâmetros analíticos do azeite de oliva: 1. Aplicação da espectrofotometria derivada**. 1991. 223f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

AZEREDO, H. M. C. **Maximização da estabilidade oxidativa de óleo de soja acondicionado em garrafas plásticas**. 2001. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

BOSKOU, D. Culinary Applications of Olive Oil - Minor Constituents and Cooking. In Boskou, D. (Ed). **Olive Oil: Minor Constituents & Health**. CRC Press: United States of America, ed.1, chap. 1, p 1-13. 2009.

BOSKOU, D. Characteristics of the Olive Tree and Olive Fruit. In: Boskou, D. (Ed). **Olive Oil: Chemistry and Technology**. AOCS Press: Champaign. 2 ed., chap. 2, p 14-19. 2006.

BOSKOU, D.; BLEKAS, G.; TSIMIDOU, M. Olive Oil Composition. In Boskou, D. (Ed). **Olive Oil: Chemistry and Technology**. AOCS Press: Champaign, ed. 2, chap. 4, p 41-72. 2006.

BOSKOU, D. Treatments and Modifications. In: Boskou, D. (Ed). **Olive Oil: Chemistry and Technology**. AOCS Press: Champaign. 2 ed., cap. 10, p 225-232. 2006.

BOSKOU, D. Storage and Packaging. In: Boskou, D. (Ed). **Olive Oil: Chemistry and Technology**. AOCS Press: Champaign. 2 ed., cap. 11, p 233-241. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais. **Diário Oficial da União**, Brasília, publicada em 20 de junho de 2000, p. 3029.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução n. 270, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal**. Diário Oficial da União, Brasília, 23 de setembro de 2005, p. 2134.

BROOKS, D. W. & GILES, G. A. PET Packaging Technology. **Sheffield Academic Press, 2002**. 375p.

CHOE, E.; LEE, J.; MIN, D. B. Chemistry for Oxidative Stability of Edible Oils. In: Akoh, C.C., Lai, O.M. **Healthful Lipids**. AOCS Press, Champaign, IL, USA, p. 99–126, 2005.

CODEX *Alimentarius Commission*. **CODEX Standards for olive oils, and olive pomace oils**, CODEX STAN 33, 1981. CODEX *Alimentarius*, Rome: FAO/WHO, rev.2, 2003.

DI GIOVACCHINO, L.; MUCCIARELLA, N.; CONSTANTINI, N.; FERRANTE, M. L.; SURRICCHIO, G. Use of nitrogen to improve stability of virgin olive oil during storage. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 79, 339–344. 2002.

ENDO, Y.; USUKI, R.; KANEDA, T. Prooxidant activities of chlorophylls and their decomposition products on the photooxidation of methyl linoleate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 61, 781-784. 1984.

EPAMIG. **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais**. Pesquisa da EPAMIG garante produção de azeitonas. 2007. Disponível em: <[http://www.epamig.br/informativos/cultivo\\_azeitona.htm](http://www.epamig.br/informativos/cultivo_azeitona.htm)>. Acesso em 23 setembro 2009.

FIRESTONE, D. Olive Oil. In: Shahidi, F. (Ed.). **Bailey's industrial oil and fat products**. 6. ed. New York: Wiley, v.2, p.303-301. 2005.

FOURATI, H.; COSENTINI, M.; KARRA, B. Classification of Olive Trees According to Fruit and Oil Characterisation. **Acta Horticulturae**. (ISHS) 586:141-145, 2002.

GAMBACORTA, G.; DEL NOBILE, M. A.; TAMAGNONE, P.; LEONARDI, M.; FACCIA, M.; LA NOTTE, E. Shelf-life of extra virgin olive oil stored in packages with different oxygen barrier properties. **Italian Journal of Food Science**.16: 417–428. 2004.

GARCÍA, A.; BRENES, M; MARTÍNEZ, F; ALBA, J; GARCÍA, P; GARRIDO, A. High-Performance Liquid Chromatography Evaluation of Phenols in Virgin Olive Oil During Extraction at Laboratory and Industrial Scale. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 78, p.625-629, 2001.

GARCIA, E.E.C. Você conhece o lado químico do PET?. **Informativo CETEA**, v. 9, n. 4, p.9-11, 1997.

GOODACRE, R.; KEL, D. B.; BIANCHI, G. Rapid assessment of the adulteration of virgin olive oils by other seed oils using pyrolysis mass spectrometry and artificial neural networks. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 63, p. 297 – 307, 1993.

GUTIERREZ-ROSALES, F.; GARRIDO-FEMANDEZ, J.; GALLARDO-GUERRERO, L.; GANDUL-ROJAS, B.; MINGUEZ-MOSQUERA M.I. Action of Chlorophylls and the Stability of Virgin Olive Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 69: 866–871. 1992.

GUTIERREZ, F.; ARNAUD, T.; ALBI, M. A. Influence of Ecological Cultivation on Virgin Olive Oil Quality. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 76, 617-621,1999.

HANLON, J. F.; KELSEY, R. J.; FORCINIO, H. E . **Handbook of package engineering**. 3 ed., RC Press. 1998, p. 698. Disponível em: <http://books.google.com/books>. Acesso em: Junho, 2009.

INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL – IOOC. **Working paper of the Directorate**. General for Agriculture. The olive oil and table olives sector. Disponível em: [http://europa.eu.int/comm/agriculture/markets/olive/index\\_pt.htm](http://europa.eu.int/comm/agriculture/markets/olive/index_pt.htm)>. Acesso em: 18 set. 2010.

KAMAL-ELDIN, A; POKORNY, J. Lipid Oxidation Products and Methods Used for their Analysis. In: Kamal-Eldin A., Pokorny J. **Analysis of Lipid Oxidation**. AOCS Press: Champaign. USA. cap. 1. p. 17-39. 2005.

KOH, H. H.; MURRAY, I. J.; NOLAN, D.; CARDEN, D.; FEATHER J.; BEATTY, S. Plasma and macular responses to lutein supplement in subjects with and without age-related maculopathy: a pilot study. **Experimental Eye Research**. 79, p.21–27, 2004.

LANZON A.; ALBI, T.; CERT, A. The Hydrocarbon Fraction of Virgin Olive Oil and Changes Resulting From Refining. **Journal of the America Oil Chemistry Society**; 71: 285-291.1994.

LUH, B. S.; GARCIA, E. L.; MARTIN, M. H. Olives. In: Barret, D. M.; Somogyi, L. P.; Ramaswamy, H. S. **Processing Fruits: Science and Technology**. ed.2. CRC Press, 2005.

MOYANO, J. M.; HEREDIA, F.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, J. The Color of Olive Oil: The Pigments and Their Likely Health Benefits and Visual and Instrumental Methods of Analysis. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 9, p. 278-291, 2010.

MONTEDORO, G. F.; GAROFOLO, L.; BERTUCCIOLI, M.. Factors Shaping the Quality Characteristics of an Olive Oil. **Industrie Alimentari**, 25, 549-555,1986.

MURKOVIC, M; LECHNERA, S; PIETZKAA, A; BRATACOS, B; KATZOGIANNOS, E. Analysis of minor components in olive oil. **Journal of Biochemical Biophysical Methods**. 61, p.155–160, 2004.

OLIVEIRA, A. F. Por que pesquisar a oliveira? **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG)**. Ano VII, nº 137, outubro de 2006. Disponível em: <<http://www.epamig.br>>. Acesso em nov. 2009.

OLIVEIRA, L. M. **Requisitos de proteção de produtos em embalagens plásticas rígidas**. Centro de Tecnologia de Alimentos – ITAL. Campinas, 2006. 328p.

OWEN, R. W; GIACOSA, A; HULL, W. E; HAUBNER, R; WURTELE, G; SPIEGELHALDER, B; BARTCH, H. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. **Lancet Oncology**. v.1, p.107-112, 2000.

PEREZ-CAMINO C., CERT A. Quantitative Determination of Hydroxy Pentacyclic Triterpene Acids in Vegetable Oils. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 47: 1558-1562, 1999.

PERCUSSI, L. **Azeite: história, produtores, receitas**. 2ª ed., São Paulo: Editora Senac São Paulo, 2007, 281p.

PETRAKIS, C. Olive Oil Extraction. In: Boskou, D. (Ed). **Olive Oil: Chemistry and Technology**. AOCS Press: Champaign, cap. 9, ed. 2. 2006, p 192.

PIERGIOVANNI, L.; LIMBO, S. Packaging and the Shelf Life of Vegetable Oils In: Robertson, G. L. **Food Packaging and Shelf Life: A Practical Guide**, CRC Press, Boca Raton, p. 318, 2010.

POKORNY, J.; SCHMIDT, S., PARKÁNYIOVÁ, J. Ultraviolet-Visible Spectrophotometry in the Analysis of Lipid. In: Kamal-Eldin, A.; Pokorny J. **Analysis of Lipid Oxidation**. AOCS Press: Champaign. USA. cap. 3. p. 17-39. 2005.

POLYMEROU-KAMILAKIS, A. The culture of the olive tree. In: Boskou, D. (Ed). **Olive Oil: Chemistry and Technology**. AOCS Press: Champaign, 2 ed.; cap. 1, p 1-12, 2006.

PRISTOURI, T. G.; BADEKA, A.; KONTOMINAS, M. G. Effect of packaging material headspace, oxygen and light transmission, temperature and storage time on quality characteristics of extra virgin olive oil. **Food Control**, 21 (4), pp. 412-418. 2010.

PSOMIADOU, E.; TSIMIDOU, M.; BOSKOU D.  $\alpha$ -Tocopherol content of Greek virgin olive oils. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 48:1770–1775. 2000.

PSOMIADOU, E.; TSIMIDOU, M. Stability of Virgin Olive Oil. 2. Photo-oxidation Studies. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 50: 722-727, 2002.

PSOMIADOU, E.; TSIMIDOU, M. Stability of Virgin Olive Oil. 1. Autoxidation Studies. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 50: 716-721, 2002.

RANALLI, A.; MODESTI, G.; PATUMI, M.; FONTANAZZA, G. The compositional quality and sensory properties of virgin olive oil from a new olive cultivar – 177. **Food Chemistry**. Oxford, v. 69, p. 37 – 46, 2000.

SABA, A.; MAZZINI, F.; RAFFAELLI, A.; MATTEI, A.; SALVADORI, P. Identification of 9(E), 11(E)-18:2 fatty acid methyl ester at trace level in thermal stressed olive oils by GC coupled to acetonitrile CI-MS and CI-MS/MS, a possible marker for adulteration by addition of deodorized olive oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Easton, v. 53, n. 12, p. 4867 - 4872, 2005.

SALVADOR, M. D., F. ARANDA, S. GOMEZ-ALONSO, AND G. FREGAPANE, CORNICABRA. Virgin Olive Oil: A Study of Five Crop Seasons. Composition, Quality and Oxidative Stability, **Food Chem**. 74: 267–274. 2001.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis. Campinas: **CETEA**, 2001. 213 p.

SERVILLI, M.; MONTEDORO, G. Contribution of Phenolic Compounds to Virgin Olive Oil Quality. **European Journal Lipid Science Technology**. 104: 602-613, 2002.

TSIMIDOU, M. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. **Italian Journal of Food Science**. 10, 99–116. 1998

TSIMIDOU, M. Z. Olive Oil Quality. In. Boskou, D. (Ed). **Olive Oil: Chemistry and Technology**. AOCS Press: Champaign, ed. 2, cap. 4, p 93-111. 2006.

VELASCO, J.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. Evaluation of Oxidative Stability of Vegetable Oils by Monitoring the Tendency to Radical Formation. A Comparison of Electron Spin Resonance Spectroscopy with the Rancimat Method and Differential Scanning Calorimetry, **Food Chemistry**. 77: 623–632. 2003.

VIOLA, P. **Azeite de Oliva e a Saúde**. Conselho Oleícola Internacional. Madrid, 1995, p.64.

ZAMPOUNIS, V. Olive Oil in World Market. In. Boskou, D. (Ed.). **Olive Oil: Chemistry and Technology**. AOCS Press: Champaign, ed. 2, cap. 4, p 41-72. 2006.

## **CAPÍTULO 2**

**ESTABILIDADE DE AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM EM EMBALAGENS DE PET E LATA DE FOLHA-DE-FLANDRES, SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM E SUBMETIDO À INERTIZAÇÃO**

# **ESTABILIDADE DE AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM EM EMBALAGENS DE PET E LATA DE FOLHA-DE-FLANDRES, SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM E SUBMETIDO À INERTIZAÇÃO**

## **RESUMO**

A oxidação lipídica, que representa um importante fator de degradação do azeite de oliva, é desencadeada por fatores como a disponibilidade de oxigênio, presença de luz e temperatura. Neste trabalho foi avaliada a estabilidade de azeite de oliva extra virgem nas embalagens de polietileno tereftalato (PET) âmbar e cristal (transparente), e em latas de folha-de-flandres. Um lote destas embalagens foi inertizado com nitrogênio gasoso. O envase e o fechamento foram feitos de forma manual. As amostras foram estocadas à temperatura ambiente ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e em duas condições: mantidas em caixas de papelão ao abrigo da luz e expostas à luz (2900 lux) por 12 horas/dia por um período de seis meses. Para determinação da estabilidade oxidativa do azeite as análises físico-químicas de ácidos graxos livres, índice de peróxidos, extinção específica a 230 e 270 nm, clorofila e cor  $L^*C^*h$  do azeite foram realizadas no momento inicial e a cada 30 dias. Já as análises de umidade, compostos fenólicos totais, tocoferóis e cor Lovibond foram realizadas em intervalos de 90 dias. Observou-se que no período de 6 meses de estocagem, os resultados mais expressivos ocorreram devido à foto-oxidação, com redução significativa nos compostos  $\alpha$ -tocoferol, clorofila e alteração da cor. Os efeitos da auto-oxidação foram observados pelo ligeiro aumento do valor de K232 e do índice de peróxido. Quando armazenados no escuro durante 6 meses todos os tratamentos foram eficazes em manter a estabilidade oxidativa do azeite. No entanto, quando exposto à luz, o azeite acondicionado em embalagem de PET transparente apresentou expressiva degradação. Na embalagem de PET âmbar a degradação foi

mais lenta, porém significativa. Considerando que o azeite é um produto exposto à luz, seja durante a venda ou no consumo doméstico, pelos resultados apresentados, não é recomendado uso da embalagem de PET transparente para este produto por comprometer sua estabilidade e sua característica nutricional. Quanto à embalagem de PET âmbar, faz-se necessário melhorar seus parâmetros de barreira à luz, como a pigmentação e a espessura da parede.

**Palavras-chave:** azeite de oliva, estabilidade oxidativa, estocagem, embalagem.

## 1 INTRODUÇÃO

A participação do azeite de oliva extra virgem vem aumentando no mercado, principalmente, em razão da intensa divulgação de seus efeitos benéficos à saúde, associado ao elevado conteúdo de ácidos graxos insaturados e aos micronutrientes presentes em sua composição. Estes compostos estão sujeitos a alterações oxidativas durante a estocagem provocando mudanças significativas em seu valor nutricional, bem como em suas características sensoriais (PERCUSSI, 2007).

A oxidação lipídica consiste de uma série complexa de reações, em que há participação de oxigênio e radiações luminosas, entre outros fatores. Estas reações afetam a qualidade dos óleos, levando ao surgimento de uma alteração sensorial conhecida como rancidez oxidativa, que frequentemente resulta em rejeição do produto (AZEREDO, 2001).

A excelente qualidade do azeite de oliva extra virgem depende de todo um processo que se inicia nas árvores e termina nas embalagens. A embalagem para óleo vegetal comestível deverá, fundamentalmente, atuar no controle dos parâmetros que afetam a oxidação, ou seja, deverá apresentar boa barreira ao oxigênio, à umidade e à radiação, especialmente na faixa do ultravioleta. Também é essencial que a tampa da embalagem impeça o vazamento do produto e garanta ao sistema de embalagem pelo menos a mesma barreira ao oxigênio oferecida pelo corpo da embalagem. Outras propriedades desejadas são a resistência à carga vertical e a resistência ao colapso, que pode ocorrer devido ao consumo do oxigênio residual na embalagem (OLIVEIRA, 2006).

O armazenamento dos óleos com injeção de nitrogênio pode estender sua vida útil conforme estudado por Di Giovacchino e colaboradores (2002) ao estudarem a estabilidade de azeite de oliva envasado em garrafas de vidro. A importância da introdução de nitrogênio a uma linha de produção de azeite de oliva tem sido

reforçada. As alterações oxidativas em óleos são muito lentas quando o recipiente é completamente cheio ou quando é feita injeção de nitrogênio (GARCÍA *et al.*, 2001).

A embalagem de PET tem sido uma constante no mercado de óleos comestíveis e apresenta vantagens em relação aos custos para o fabricante do produto final e o apelo de compra dado pela transparência da embalagem, que permite a visualização do produto. Os alimentos acondicionados em materiais plásticos estão sujeitos aos diversos tipos de interação com o meio ambiente, dada à permeação de gases, vapor de água e vapores orgânicos através da embalagem (OLIVEIRA, 2006).

Na conservação dos alimentos a opacidade da embalagem metálica é uma característica de grande importância, por prevenir alterações induzidas pela luz e radiação ultravioleta (OLIVEIRA, 2006). As embalagens metálicas apresentam resistência térmica e mecânica, versatilidade de formatos e tamanhos, baixa permeabilidade a gases, pode ser reciclada e tem ampla variedade de aplicações. Porém, as latas não permitem a visualização do produto e envolvem maiores custos e quantidade de materiais em relação às embalagens plásticas (FARIA, 2004).

Diante disso, este projeto tem como objetivo avaliar a estabilidade do azeite de oliva extra virgem em embalagens de PET transparente, PET âmbar e lata de folha-de-flandres submetidas a duas condições de estocagem (com incidência de luz e no escuro). Também foi avaliado o uso do nitrogênio como gás inerte com o intuito de inibir ou retardar a oxidação lipídica e as alterações de compostos de importância nutricional e organoléptica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras de azeite

Os ensaios experimentais foram conduzidos com azeite de oliva extra virgem português de mesmo lote e fabricação datada em 04/2009, originalmente envasado em garrafas de vidro verde escuro de 500mL com tampa de rosca de alumínio.

### 2.2 Preparo das amostras

O azeite foi fracionado manualmente nas seguintes embalagens (Figura 1):

- PET (polietileno tereftalato) na cor âmbar com volume total de 275 mL;
- PET (polietileno tereftalato) transparente (cristal) com volume total de 275 mL;
- Lata de folha-de-flandres cilíndrica de 3 peças com volume total de 350 mL.

As embalagens de PET foram envasadas até o volume de 250 mL, deixando 10% de espaço livre. As embalagens de PET foram fechadas por indução com selo laminado com folha de alumínio e tampa de rosca de polipropileno (PP).



**Figura 1.** Embalagens usadas no experimento.

Um lote de embalagens de PET âmbar e PET cristal foi inertizado com a injeção de gás nitrogênio de alta pureza. A inertização foi feita manualmente, através de uma agulha que perfurava o selo laminado e injetava o gás até o fundo da embalagem. Um segundo furo no selo foi feito para a saída do oxigênio presente no interior da embalagem, posteriormente arrastado pelo gás inerte. O nitrogênio foi injetado até que a concentração de oxigênio do espaço livre (headspace) da embalagem fosse inferior a 5%, medida por meio do analisador de gás PacCheck™ 650 Dual Head Space Analyser (Modern Company Inc. – MOCON), conforme observado na Figura 2.



**Figura 2.** Processo manual de selagem, injeção de nitrogênio, medida de oxigênio no headspace e fechamento com septo e tampa.

Os furos no selo laminado foram fechados com um septo adesivo, de maneira que a embalagem permanecesse vedada durante o período de estocagem (Figura 2).

### 2.3 Estocagem

As amostras de azeite acondicionadas nas embalagens de PET foram divididas em dois grupos e estocadas nos diferentes ambientes:

- Em caixas de papelão sob abrigo de luz ( $52\pm 8$  %UR /  $25\pm 2$  °C).
- Na presença de luz por 12 horas/dia ( $47\pm 10$  %UR /  $26\pm 2$  °C).

As amostras avaliadas no ensaio de foto-oxidação foram armazenadas em uma câmara de luz de 200x100x100 cm adaptada com 2 lâmpadas fluorescentes (Osram FO 840 Lumilux Cool/White) com potência de 32 W, cuja intensidade luminosa foi de  $2900\pm 495$  lux, a uma distância de 70 cm, conforme mostra a Figura 3. Estas amostras foram rearranjadas semanalmente para garantir a uniformidade da exposição à luz.

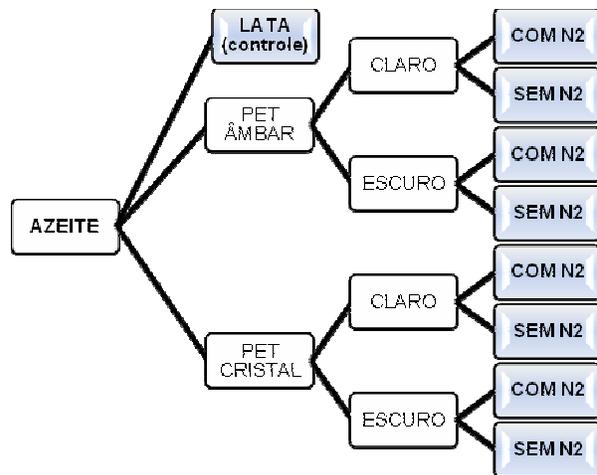


**Figura 3.** Estocagem das amostras.

O azeite envasado nas latas foi estocado apenas no escuro.

As amostras foram armazenadas durante 6 meses. A temperatura ambiente e a umidade relativa foram monitoradas durante todo o período por um termo-higrômetro.

Assim, foram criados 9 diferentes tratamentos, como pode ser mostrado na Figura 4.



**Figura 4.** Tratamentos usados no processo.

## 2.4 Métodos

### 2.4.1 Análises Físico-Químicas

As seguintes análises físico-químicas foram realizadas seguindo as metodologias descritas a seguir:

- **Composição em ácidos graxos:** realizada em cromatógrafo a gás com coluna capilar – CGC AGILENT 6850 SERIES GC SYSTEM, após esterificação preparada de acordo com o método proposto por Hartman & Lago (1973). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados de acordo com as normas da *American Oil Chemists' Society* (AOCS, 2004), o método Ce 2-66 em coluna capilar DB – 23 AGILENT (50% cyanopropyl-methylpolysiloxano), dimensões 60m,  $\phi$  int: 0,25 mm, 0,25  $\mu$ m filme. Temperatura do forno de 110°C-5min, 110°C-215°C (5°C/min), 215°C- 24min; temperatura do detector: 280°C; temperatura do injetor 250°C; gás de arrastre: Hélio; Razão Split 1:50; volume injetado: 1,0 $\mu$ L. A composição qualitativa foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os dos respectivos padrões de ácidos graxos.
- **Ácidos graxos livres:** realizada de acordo com o método Ca 5a-40 (AOCS, 2004). Os resultados do teor de ácidos graxos livres foram expressos em porcentagem de ácido oléico.
- **Índice de peróxido:** realizada de acordo com o método Cd 8b-90 (AOCS, 2004). Os resultados do índice de peróxido foram expressos em miliequivalentes de oxigênio ativo por quilograma de azeite (mEq O<sub>2</sub>/ kg).
- **Índice de iodo:** calculado a partir da composição em ácidos graxos segundo o método Cd 1c-85 (AOCS, 2004).
- **Índice de saponificação:** calculado a partir da composição em ácidos graxos segundo o método Cd 3a-94 (AOCS, 2004).
- **Matéria insaponificável:** realizada pelo método Ca 6a-40 (AOCS, 2004).

- **Coeficiente de Extinção Específica:** realizada de acordo com o método Ch 5-91 (AOCS, 2004), em espectrofotômetro UV/Visível Beckman, modelo DU-70, com leituras de absorvância conduzidas em comprimentos de onda de 232 e 270nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de espessura e tendo-se o isooctano como referência.
- **Umidade:** realizada segundo o método Ca 2e-84 (AOCS, 2004) por titulação com reagente Karl Fischer por meio do equipamento automático marca Metrohm, modelo 701 KF Titrino.
- **Clorofila:** realizada segundo o método Ch 4-91 (AOCS, 2004), em espectrofotômetro PerkinElmer UV/Visível (Lambda 20) e estimado pela equação:  $C$  (mg de Pheo a/kg de óleo) =  $345,3 (A_{670} - 0,5A_{630} - 0,5A_{710}) / L$ , onde  $A_{\lambda}$  é a absorvância do óleo no respectivo comprimento de onda e  $L$  é a espessura da cubeta em mm.
- **$\alpha$ -tocoferol:** realizada de acordo com o método Ce 8-89 (AOCS, 2004) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando cromatógrafo Perkin Elmer SERIES 200, com sistema gradiente em fase móvel n-hexano/ 2-propanol (99:1 v/v), em coluna analítica Hibar RT 250 x 4 mm Li Chrosorb Si 60,5 mm, fluxo médio de 1,0 mL/min, com detector UV/Visível PerkinElmer Series 200a de comprimento de onda de 292 nm.
- **Análise colorimétrica de compostos fenólicos totais:** adaptada do método proposto por GUTFINGER (1981). Os compostos fenólicos foram medidos na fração polar obtida de 10 g de azeite dissolvido em hexano e extraída com 3 lavagens usando uma solução de metanol:água (60:40 v/v). O procedimento consistiu na reação de uma alíquota de 0,5 mL do extrato com 0,5mL do reagente de Folin-Ciocalteu adicionado de 1,0 mL da solução saturada de  $Na_2CO_3$  durante 1 hora no escuro. Posteriormente, foi feita a leitura em espectrofotômetro de absorção ultravioleta na região do visível (760nm). O resultado foi expresso em equivalente de ácido gálico e a curva padrão foi calculada usando concentrações de 10-100 $\mu$ g/mL.
- **Análise instrumental de cor:** realizada através do espectrofotômetro de cor Hunterlab modelo Colorquest II, ângulo de visão 10°, iluminante D65, usando o

sistema de cor CIE L\*C\*h para transmitância total de cada amostra em cubeta de vidro opticamente limpo com 10 mm de caminho óptico.

- **Cor Lovibond:** determinada pelo equipamento automático Lovibond PFX 995 Tintometer, usando cubeta de vidro óptico de 5<sup>1/4</sup>" , segundo o método Cc 13j-97 (AOCS, 2004).

#### 2.4.2 Análises de Caracterização das Embalagens Plásticas:

Determinadas de acordo com as normas da *American Society for Testing and Materials* e *International Standard Organization* (ASTM).

- **Peso e capacidade volumétrica:** metodologia ASTM D2911-10.
- **Espessura:** medida com micrômetro Mitutoyo Absolute 12,7-0,001 mm, seguindo a metodologia ASTM D4166-99.
- **Transmitância:** determinada através do espectrofotômetro Agilent 8453 UV/Visível com espectro de transmitância na faixa de varredura de 190 a 1100nm, através da metodologia ASTM D1003-07.
- **Taxa de permeabilidade ao oxigênio:** através do método coulométrico com uso do aparelho de transmissão de oxigênio do tipo OX-TRAN Oxygen Permeability modelo 2/61 MJ (Modern Company Inc. – MOCON), através da metodologia ASTM F1307-02.
- **Taxa de permeabilidade ao vapor de água:** determinada através do método gravimétrico, através da metodologia ASTM D895-94.
- **Hermeticidade (integridade da selagem):** realizada pelo método ASTM F97-72 com uso da substância colorida rodamina B e pelo método ASTM E515-05 de imersão em água.
- **Concentração de oxigênio no espaço livre:** com o uso do analisador de gás PacCheck™ 650 Dual Head Space Analyser (Modern Company Inc. – MOCON).

### **2.4.3 Análise Estatística**

Para a análise estatística foi usado o Delineamento em Blocos Casualizados (DBC) com no mínimo 3 repetições. Os dados foram analisados pela Análise de Variância com teste F a 5% de probabilidade, sendo as médias comparadas com teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os cálculos foram realizados através do programa estatístico Assistat 7.5 beta.

## **2.5 Procedimento Experimental**

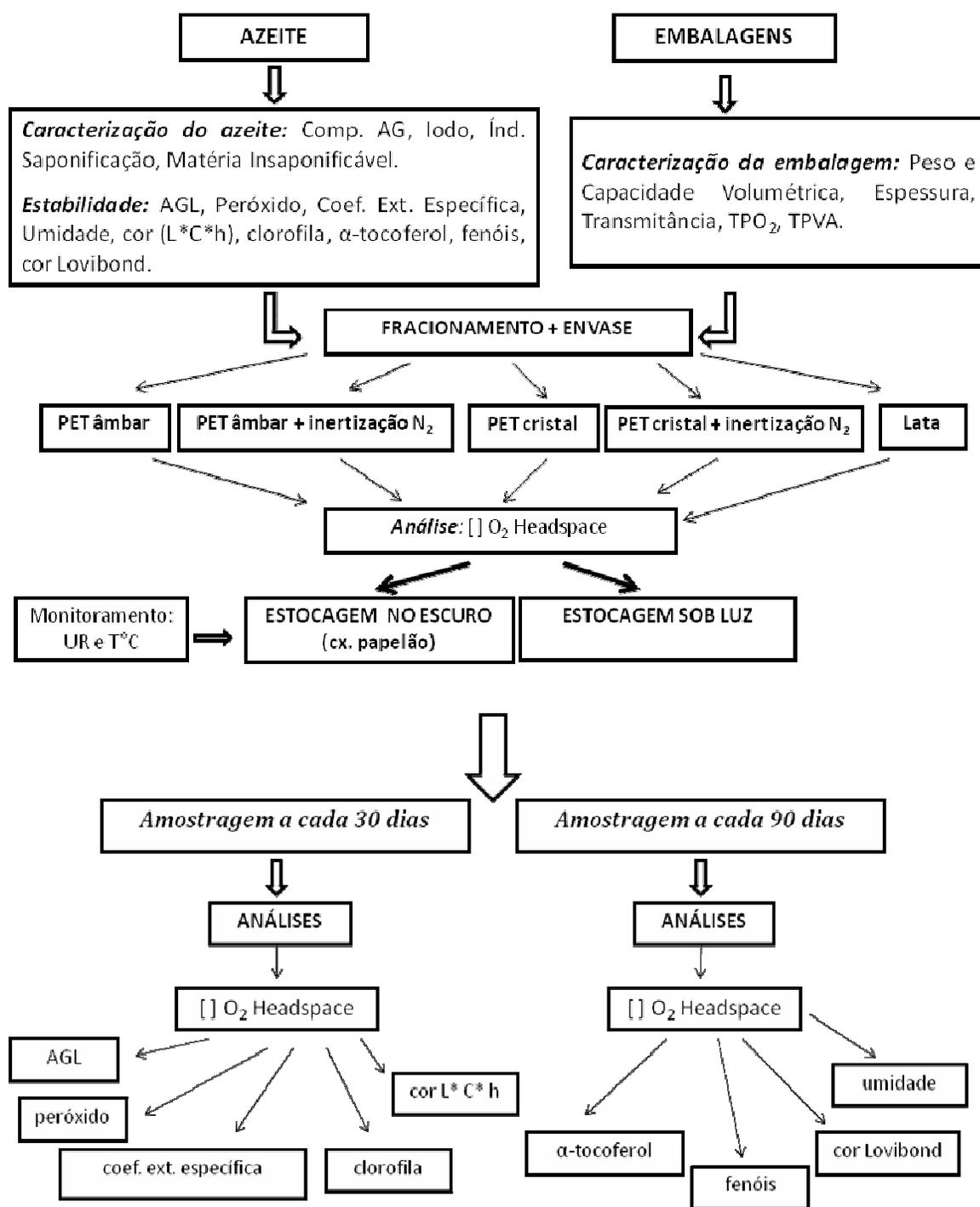
A amostra inicial de azeite foi caracterizada de acordo com os parâmetros recomendados para azeite extra virgem pela legislação brasileira vigente (resoluções 482/2000 e 270/2005 da ANVISA). Para a caracterização foram feitas todas as análises físico-químicas em triplicata.

Após o fracionamento e envase nos diferentes sistemas de embalagem e estocagem, a qualidade do azeite foi avaliada mensalmente quanto às análises de índice de peróxido, ácidos graxos livres, coeficiente de extinção específica, clorofila e cor ( $L^*C^*h$ ); e trimensalmente pelas análises de  $\alpha$ -tocoferol, compostos fenólicos totais, cor Lovibond e umidade Karl Fischer.

A cada mês foram analisadas 3 embalagens por tratamento, sendo que as análises de cada embalagem foram realizadas em duplicata, somando 6 resultados de análise por tratamento.

A cada abertura das embalagens para as análises, primeiramente foi feita a medida de concentração de oxigênio no espaço livre.

O fluxograma do procedimento experimental encontra-se na Figura 5.



**Figura 5.** Fluxograma representativo do procedimento experimental.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização das embalagens de PET

A determinação da espessura permite avaliar a resistência mecânica e as propriedades de barreira a gases e ao vapor d'água. A variação da espessura pode comprometer a capacidade da embalagem em proteger os alimentos (SARANTÓPOULOS *et al.*, 2002).

Diante disso, observa-se que as embalagens de PET usadas no experimento (Tabela 1) apresentaram grandes diferenças de espessura, tanto entre uma garrafa e outra, como na mesma garrafa, o que pode ser percebido pelo alto coeficiente de variação das medidas. No que diz respeito à embalagem de óleos vegetais é importante que a distribuição da espessura da parede seja uniforme, pois esta característica irá determinar a resistência da embalagem ao colapso pelo consumo de oxigênio residual, além de influenciar nas propriedades de barreira. Na Figura 6, pode-se perceber que algumas embalagens não inertizadas com o gás nitrogênio colapsaram a partir do terceiro mês de estocagem, enquanto que aquelas que receberam a injeção do gás inerte permaneceram íntegras até o sexto mês.



**Figura 6.** Colapso das embalagens não inertizadas com nitrogênio (as duas garrafas à direita).

A taxa de permeabilidade é inversamente proporcional à espessura do material de embalagem. A permeabilidade é influenciada pela difusão do permeante através de espaços vazios que se formam no polímero devido à ação de um gradiente de pressão ou concentração (GARCIA *et al.*, 1989).

Ao observar a Tabela 1, verifica-se que a TPVA das embalagens apresentou valores baixos próximos a 0,006 g água/(embalagem.dia) nas condições 25°C/60%UR. Este valor é comparável a TPVA de 0,002 a 0,006g água/embalagem/dia a 30°C/80%UR de embalagens de vidro de 410mL estudadas por Alves (1999), nas quais o sistema de fechamento é composto por selo de alumínio colado e tampa plástica de PP rosqueada. Em um trabalho realizado por Alvez e colaboradores (2000), foram analisados potes de PET de 280-290ml (19,5-20,5g) na condição 30°C/80%UR, os quais apresentaram valores de TPVA de 0,017 a 0,020 (g água/embalagem/dia).

A Tabela 1 apresenta os resultados das análises de TPO<sub>2</sub> das embalagens de PET que foram próximos a 0,03 cm<sup>3</sup>/(embalagem.dia). Estes valores estão abaixo dos obtidos por Pristouri e colaboradores (2010) que analisaram as taxas de TPO<sub>2</sub> de embalagens de PET de 500mL e obtiveram resultados próximos de 0,9 mL/embalagem/dia.

**Tabela 1.** Parâmetros de caracterização de embalagens PET nas cores âmbar e transparente (cristal).

Parâmetros	PET Âmbar			PET cristal		
	Média	DESV. PAD.	*CV%	Média	DESV. PAD.	*CV%
Peso frasco (g)	<b>22,22</b>	0,13	0,60	<b>24,19</b>	0,01	0,03
Peso frasco + tampa + selo (g)	<b>26,23</b>	0,10	0,38	<b>28,17</b>	0,05	0,18
Capacidade volumétrica (mL)	<b>275,80</b>	0,30	0,11	<b>275,88</b>	0,76	0,28
Espessura (mm)						
Parede	<b>0,34</b>	0,06	18,12	<b>0,40</b>	0,09	22,76
Base	<b>0,50</b>	0,18	35,91	<b>0,61</b>	0,12	18,90
Fundo	<b>1,33</b>	0,39	29,59	<b>2,63</b>	0,45	17,07
Gargalo	<b>0,87</b>	0,40	45,64	<b>1,11</b>	0,43	39,14
<sup>1</sup> TPVA (g água/(embalagem.dia))	<b>0,0064</b>	0,00038	5,95	<b>0,0058</b>	0,00006	1,00
<sup>2</sup> TPO <sub>2</sub> (cm <sup>3</sup> /(embalagem.dia))	<b>0,0344</b>	0,00114	3,31	<b>0,0347</b>	0,00017	0,49

<sup>1</sup> TPVA: Taxa de permeabilidade ao vapor de água a 25°C/60%UR.

<sup>2</sup> TPO<sub>2</sub>: Taxa de permeabilidade ao oxigênio a 25°C/50%UR.

\*CV: Coeficiente de Variação

A integridade da termossoldagem pode influenciar na vida útil do alimento, pois falhas no fechamento da embalagem constituem pontos de entrada para umidade, micro-organismos e oxigênio (SARANTÓPOULOS *et al.*, 2002). O fechamento também deve oferecer ao produto pelo menos o mesmo nível de proteção que é conferido pelo material de embalagem, requisito esse indispensável para um desempenho final que atenda aos objetivos pré-determinados (OLIVEIRA, 1996).

A integridade do fechamento de embalagens plásticas flexíveis baseia-se na capacidade de uma solução colorida com baixa tensão superficial em penetrar em pequenos poros. A penetração da solução colorida permite a detecção de falhas com diâmetro de até 20 µm (SARANTÓPOULOS *et al.*, 2002). Foi realizado o teste de hermeticidade aplicando na parte interna da embalagem o pigmento rodamina B (cor avermelhada), de forma que toda a região selada fosse atingida pela solução. A Figura 7 apresenta os testes realizados com solução colorida, o qual não apresentou vazamento em nenhuma das embalagens testadas. Um segundo teste foi feito pela

imersão da garrafa selada em água, que depois de pressionada, não formou bolhas de ar. Assim, assegura-se que a selagem por indução foi eficiente para garantir a hermeticidade dos sistemas de embalagem.

Durante o experimento 23% das amostras (n=16) apresentaram concentração de oxigênio no espaço livre da embalagem maior que 5%. Como a selagem se mostrou eficaz, este fato pode ter ocorrido devido à falta de um equipamento adequado para a injeção do gás inerte, que evitaria violação do selo e o uso do septo. Ou ainda, como as amostras foram envasadas manualmente, o nível de oxigênio dissolvido no azeite foi maior e a quantidade de nitrogênio injetado não foi suficiente para substituir o oxigênio residual.

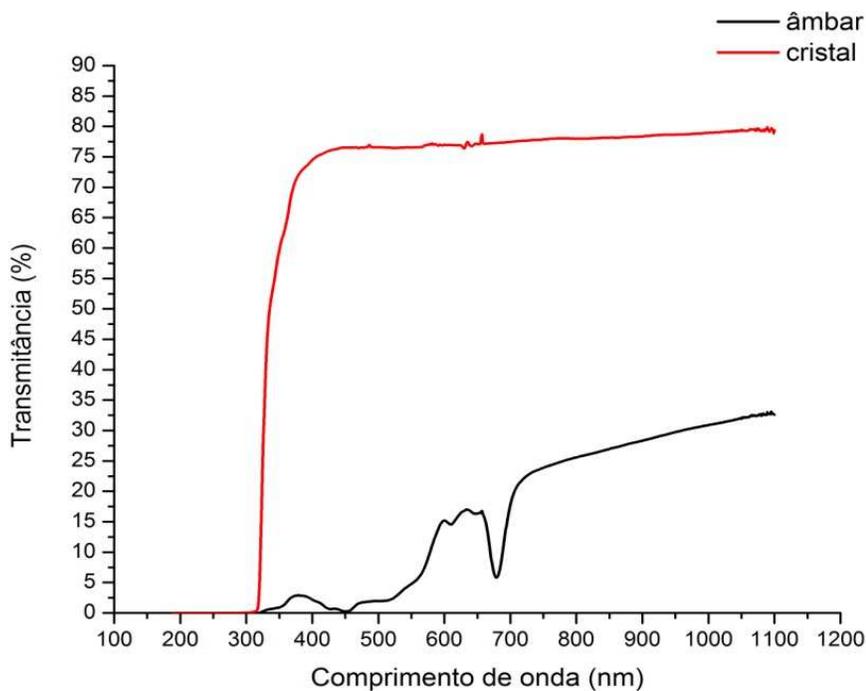


**Figura 7.** Teste de integridade da selagem das embalagens de PET.

Uma embalagem plástica com elevado brilho e transparência constitui uma opção de marketing, que busca apresentar uma boa aparência comercial do produto. Segundo Coltro e colaboradores (2003), os materiais plásticos diferem quanto à propriedade de barreira à luz: polietileno e polipropileno proporcionam transmissão de luz em toda extensão de luz visível (200-800nm); polietileno tereftalato (PET) absorve radiação UV no comprimento de onda abaixo de 300nm. Este comportamento pode ser observado nas embalagens PET âmbar e cristal analisadas na Figura 8. Como a pigmentação escura da embalagem âmbar representa barreira à luz, a transmitância desta embalagem foi consideravelmente menor que da embalagem cristal, apresentando maior aumento (~20%) na região do espectro

acima de 600 nm (luz visível). Já a embalagem cristal, desprovida de pigmentação, apresentou alta porcentagem de transmitância (>75%) na região UV (~300nm) e em toda região da luz visível.

De acordo com Sarantópoulos e colaboradores (2002), as reações de oxidação de lipídios são altamente sensíveis à luz, especialmente às radiações de comprimento de onda na região do ultravioleta (200 a 380 nm). Podem ser citadas também como reações de deterioração catalisadas pela luz a oxidação de vitaminas e a fotodegradação de pigmentos que alteram o valor nutritivo e cor dos alimento



**Figura 8.** Transmitância de embalagens de PET nas cores âmbar e transparente (cristal).

A luz visível abrange comprimentos de onda de 380 a 780 nm e a radiação ultravioleta (UV) abrange a faixa de 200 a 380 nm (GUGUMUS, 2001). Os espectros de emissão das diferentes lâmpadas fluorescentes comerciais existentes no mercado, às quais os produtos podem ser expostos, variam nesta faixa de comprimento de onda, dependendo do tipo de lâmpada. A lâmpada fluorescente

amarela é a que tem menor emissão na região abaixo de 450 nm. Por outro lado, as lâmpadas brancas e a luz do dia são as que apresentam maior emissão nessa região (BOSSET & GALLMANN, 1994).

### **3.2 Caracterização do azeite extra virgem**

Na caracterização da amostra inicial de azeite os resultados teor de ácidos graxos livres, índice de peróxidos, umidade, índice de saponificação, índice de iodo, extinção específica a 230 e 270 nm, matéria insaponificável e composição em ácidos graxos, apresentados na Tabela 2, estão de acordo com os critérios de classificação de azeite de oliva extra virgem das resoluções 482/2000 e 270/2005 da ANVISA, com o Regulamento da Comunidade Européia 702/2007 e com o CODEX *Alimentarius* 33/1981 (revisado em 2003).

Segundo Tsimidou (1998), uma ampla faixa de teor de compostos fenólicos totais tem sido relatada (50-1000 mg/kg), mas os valores são geralmente entre 100 e 300 mg/kg cultivar. O sistema de extração e as condições de processamento, embalagem, distribuição e armazenamento são fatores críticos que afetam o conteúdo final de compostos fenólicos totais no azeite. Os fenóis na forma livre são encontrados principalmente em azeites armazenados, enquanto que os os azeites frescos contêm formas mais complexas de agliconas.

Conforme apresentado na Tabela 2, o resultado da análise de compostos fenólicos totais, indicou um valor abaixo do que é comumente encontrado na literatura. Isso pode estar relacionado desde à origem e processo de extração do azeite, até devido ao tempo de armazenamento desde a fabricação até o início das análises. Também deve-se levar em consideração a eficiência do método de análise, que por ter sido adaptado e apresentar várias etapas, pode ter originado desvios nos resultados.

**Tabela 2.** Resultados das análises de caracterização da amostra inicial de azeite de oliva extra virgem e limites dos parâmetros considerados pela legislação.

<b>Parâmetro/unidade</b>	<b>Resultados</b>	<b>Limites*</b>
Ácidos graxos livres (% ác. oléico)	0,18	máximo 0,8
Umidade (%)	0,09	máximo 0,2
Índice de peróxido (mequiv O <sub>2</sub> /kg)	7,27	≤20
Índice de saponificação (mg KOH/g)	192,23	184 - 196
Índice de iodo (g de I <sub>2</sub> /100g)	84,35	75-94
Cor L*C*h	79,44 / 108,94 / 86,18	-
Cor Lovibond (cell 51/4 ") R/Y/B/N <sup>1</sup>	2,85 / 71,95 / 1,95 / 0,00	-
Extinção específica 232nm	1,85	≤2,50
Extinção específica 270nm	0,17	≤0,20
Matéria insaponificável (%)	0,64	1,5
Clorofila (mg feofitina a/kg)	19,14	-
A-tocoferol (mg/kg)	252,77	-
Compostos fenólicos totais (mg ác.gálico/kg)	27,61	-
Composição ácidos graxos (%)		
Palmítico (C16:0)	12,26	7,5 - 20,0
Palmitoléico (C16:1)	1,02	0,3 - 3,5
Esteárico (C18:0)	2,87	0,5 - 5,0
Oléico (C18:1)	73,46	55,0 - 83,0
Linoléico (C18:2)	8,37	3,5 - 21,0
Linolênico (C18:3)	0,71	máximo 0,9
Araquídico (C20:0)	0,44	máximo 0,6
Outros	0,88	-

<sup>1</sup>R/Y/B/N: vermelho/amarelo/azul/neutro, respectivamente.

\* FONTE: resoluções 482/2000 e 270/2005 da ANVISA.

Em estudo realizado por Gimeno e colaboradores (2002) de 60 amostras de azeites de oliva extra virgem obtidos por dois diferentes tipos de extração, a menor

concentração de compostos fenólicos totais encontrada foi de  $42,07 \pm 7,30$  mg/kg em uma das amostras.

De acordo com Boskou, Blekas e Tsimidou (2006), a forma  $\alpha$ -tocoferol corresponde a 90% do total de tocoferóis presentes no azeite de oliva. O teor de  $\alpha$ -tocoferol encontrado na amostra inicial deste experimento está de acordo com a faixa de 98 a 370 mg/kg obtida de 90 amostras de azeites analisadas por Psomiadou e colaboradores (2000).

Resultados semelhantes também foram apresentados por Gimeno e colaboradores (2002) que analisaram amostras de azeites de oliva extra virgem obtidos por dois diferentes métodos de extração e encontraram valores de 185 a 212 mg/kg de  $\alpha$ -tocoferol.

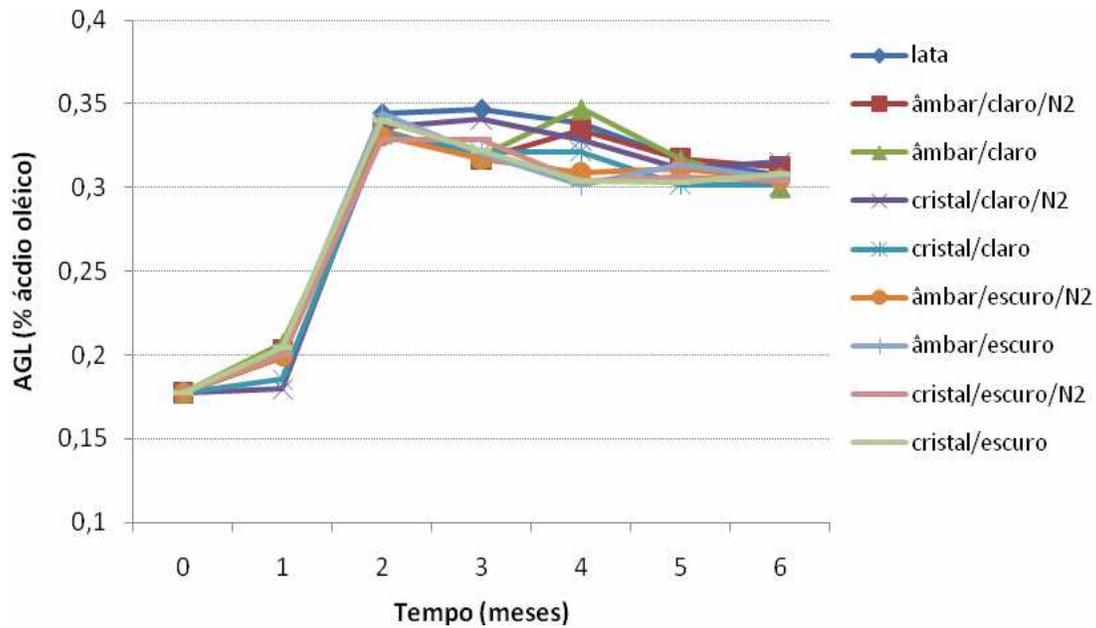
Quanto ao teor de clorofila, segundo Psomiadou e Tsimidou (2001), o azeite de oliva virgem contém até 40 mg/kg, expresso em feofitina *a*. Os mesmos autores, ao analisarem quatro diferentes amostras de azeite extra virgem gregos, encontraram valores que variaram de 9,1 a 23 mg feofitina *a*/kg. O valor de 19,14mg de feofitina *a*/kg encontrado no azeite usado neste experimento está de acordo com o obtido pelos autores citados.

### **3.3 Estabilidade do azeite extra virgem**

De acordo com as resoluções 482/2000 e 270/2005 da ANVISA, com o Regulamento da Comunidade Européia 702/2007 e com o CODEX *Alimentarius* 33/1981(revisado em 2003) o azeite classificado como extra virgem não deve ultrapassar 0,8 g/100 g de ácidos graxos livres (expresso em ácidos oléico).

Na Tabela 3, observa-se que o teor de ácidos graxos livres em todos os tratamentos está de acordo com o valor considerado característico para azeite de oliva extra virgem. Apesar dos resultados diferirem estatisticamente, esta diferença não representa grandes alterações em relação à qualidade e estabilidade do azeite extra virgem. Pode-se considerar que o teor de ácidos graxos livres apresentou um

ligeiro aumento em relação ao tempo. Porém, não foram observadas alterações no teor de ácidos graxos livres devido à diferença do tipo de estocagem, tipo de embalagem e inertização com nitrogênio. O comportamento dos tratamentos em relação ao teor de ácidos graxos livres pode ser melhor observado na Figura 9.



**Figura 9.** Comportamento das amostras de azeite de oliva extra virgem quanto ao teor de ácidos graxos livres em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

**Tabela 3.** Análise do teor de ácidos graxos livres das amostras de azeite de oliva extra virgem em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

AGL (% ác. oléico)	PET								Lata	¹Média
	Estocagem sob luz				Estocagem no escuro					
	Âmbar		Cristal		Âmbar		Cristal			
Tempo (meses)	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>		
0	0,18 d A	0,18 f A	0,18 d A	0,18 c A	0,18 d A	0,18 e A	0,18 d A	0,18e A	0,18 d A	0,18 e
1	0,20 c A	0,20 e A	0,18 d C	0,19 c BC	0,20 c AB	0,20 d A	0,20 c AB	0,20 d A	0,20 c AB	0,20 d
2	0,33 a A	0,33 ab A	0,34 a A	0,34 a A	0,33 a A	0,34 a A	0,33 a A	0,34 a A	0,34 a A	0,34 a
3	0,32 b C	0,32 bc C	0,34 a AB	0,33 a C	0,32 ab C	0,32 b C	0,33 a BC	0,32 b C	0,35 a A	0,33 b
4	0,33 a ABC	0,35 a A	0,33 ab BC	0,33 a CD	0,31 b DE	0,30 c E	0,30 b E	0,30 c E	0,34 a AB	0,32 b
5	0,32 b A	0,32 c A	0,31 c A	0,31 b A	0,31 b A	0,31 bc A	0,31 b A	0,30 c A	0,32 b A	0,31 c
6	0,31 b A	0,30 d A	0,32 bc A	0,30 b A	0,30 b A	0,31 bc A	0,30 b A	0,31 bc A	0,31 b A	0,31 c
¹Média	0,29 AB	0,29 AB	0,28 ABC	0,28D	0,28CD	0,28BCD	0,28CD	0,28BCD	0,29 A	

\*As médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e mesmo tipo de tratamento e por mesma letra maiúscula na linha e mesmo tempo de estocagem, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

¹DMS: 0,00607 / ²DMS: 0,00509

Os resultados obtidos estão de acordo com os apresentados por Pristouri e colaboradores (2010). Ao analisarem a estabilidade de azeite extra virgem em embalagem PET e vidro transparentes armazenados no escuro, os azeites mantiveram por 12 meses dentro do limite de 8% de ácidos graxos livres. Quando submetidas a 12 horas sob luz do dia, as amostras em embalagens PET transparente ultrapassaram este limite após o 6<sup>o</sup> mês de estocagem.

Desta forma, é provável que o período de 6 meses de análise não seja suficiente para apresentar mudanças significativas de qualidade no azeite em relação ao teor de ácidos graxos livres. Além disso, a acidez não está diretamente relacionada à ação da foto e auto-oxidação lipídica.

Boskou, Blekas e Tsimidou (2006) afirmam que o aumento da acidez livre é uma consequência, principalmente, da atividade enzimática causada por avarias na azeitona. Alba, Izquierdo e Gutiérrez (1997) apontam outros diversos fatores que podem afetar o grau de acidez: cultivo, variedade da azeitona, tipo de colheita, mescla de azeitonas (solo e árvores), tipo e tempo de armazenamento das azeitonas, condição de elaboração, entre outros.

Méndez e Falqué (2005) analisaram 4 amostras de azeite de oliva extra virgem nas embalagens PET e vidro transparentes, PET opaco, lata e Tetra Brik<sup>®</sup> armazenadas sob luz ambiente por 12 horas/dia. De acordo com os autores, todos os tratamentos apresentaram teor de ácidos graxos livres menores que 5% durante os 6 meses de estocagem e o teor de umidade se manteve baixo e sem alterações significativas.

Uma vez que a rancidez hidrolítica ocorre na presença de umidade, o baixo percentual observado nos tratamentos durante o experimento pode ter contribuído para que o teor de ácidos graxos livres do azeite sofresse pouca variação durante o período de estocagem.

De acordo com as resoluções 482/2000 da ANVISA e com os padrões do CODEX *Alimentarius* 33/1981 (revisado em 2003) o azeite classificado como extra virgem não deve ultrapassar 0,2% de umidade e substâncias voláteis. Como

apresentado na Tabela 4, durante todo o período de estocagem, o conteúdo de umidade não foi ultrapassou este limite.

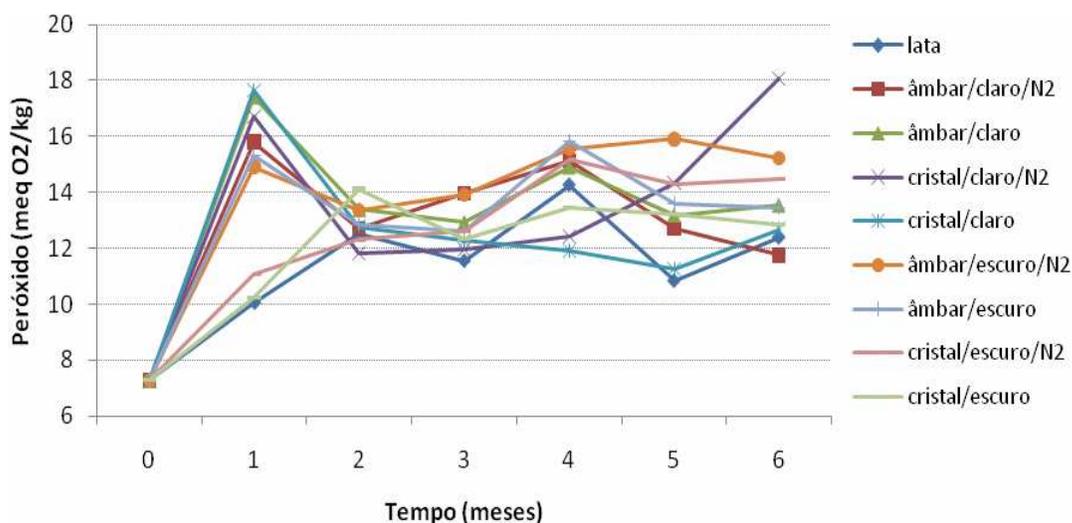
**Tabela 4.** Análise de umidade das amostras de azeite de oliva extra virgem em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

Umidade (%)	PET								Lata
	Estocagem sob luz				Estocagem no escuro				
	Âmbar		Cristal		Âmbar		Cristal		
Tempo (meses)	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	
0	0,089	0,089	0,089	0,089	0,089	0,089	0,089	0,089	0,089
3	0,053	0,089	0,054	0,056	0,054	0,052	0,053	0,054	0,086
6	0,021	0,044	0,020	0,054	0,126	0,199	0,191	0,129	0,165
<b>Média</b>	<b>0,054</b>	<b>0,074</b>	<b>0,054</b>	<b>0,066</b>	<b>0,089</b>	<b>0,113</b>	<b>0,111</b>	<b>0,090</b>	<b>0,113</b>
<b>Desvio padrão</b>	0,0338	0,0261	0,0342	0,0196	0,0361	0,0763	0,0712	0,0376	0,0449
<b>CV %</b>	62,43	35,43	62,76	29,60	40,37	67,48	64,26	41,61	39,56

O índice de peróxido característico para azeite de oliva extra virgem é  $\leq 20$  meqO<sub>2</sub>/kg segundo as resoluções 482/2000 e 270/2005 da ANVISA, o Regulamento da Comunidade Européia 702/2007 e o CODEX *Alimentarius* 33/1981(revisado em 2003). Durante os 6 meses de armazenamento, o índice de peróxido das amostras não ultrapassou este limite, como pode ser observado na Tabela 5.

Neste experimento, o índice de peróxido apresentou pouca diferença em relação ao tipo de embalagem, à estocagem e à inertização com nitrogênio. Em relação ao tempo, o índice de peróxido apresentou um crescimento mais pronunciado nos primeiros 30 dias, seguindo por poucas alterações até o fim do armazenamento. No entanto, ao observar a média geral de cada tratamento, verifica-se que a lata apresentou o menor valor.

O comportamento dos tratamentos quanto ao índice de peróxidos pode ser também observado na Figura 10.



**Figura 10.** Comportamento das amostras de azeite de oliva extra virgem quanto ao índice de peróxido em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

É possível notar (Figura 10) que todas as amostras apresentaram um aumento considerável no índice de peróxido no primeiro mês de estocagem, principalmente aquelas sob incidência de luz. A partir do segundo mês, percebe-se que estes valores diminuíram, apresentando uma menor variação até o sexto mês. Este comportamento pode ser explicado uma vez que os hidropéroxidos são formados rapidamente porém, são muito instáveis quando há disponibilidade de oxigênio e luz.

**Tabela 5.** Índice de peróxido das amostras de azeite de oliva extra virgem em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

Peróxido (mequiv O <sub>2</sub> /kg)	PET								Lata	²Média
	Estocagem sob luz				Estocagem no escuro					
	Âmbar		Cristal		Âmbar		Cristal			
Tempo (meses)	com N <sub>2</sub>	Sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>		
0	7,27 c A	7,27 c A	7,27 e A	7,27 c A	7,27 c A	7,27 c A	7,27 d A	7,27 c A	7,27 d A	7,27 d
1	15,80 a AB	17,40 a AB	16,72 ab AB	17,64 a A	14,91 ab B	15,25 a AB	11,08 c C	10,24 b C	10,06 c C	14,39 a
2	12,70 b A	13,39 b A	11,83 d A	12,77 b A	13,36 b A	12,85 b A	12,31 bc A	14,12 a A	12,51 ab A	12,88 c
3	13,97 ab A	12,93 b A	11,96 cd A	12,26 b A	13,92 ab A	12,68 b A	12,61 bc A	12,34 ab A	11,55 bc A	12,69 c
4	15,12 a A	14,90 b AB	12,43 cd BC	11,90 b C	15,56 ab A	15,81 a A	15,20 a A	13,45 a ABC	14,26 a ABC	14,29 a
5	12,71 b BCD	13,18 b BCD	14,34 bc AB	11,27 b CD	15,90 a A	13,61 ab ABC	14,30 ab AB	13,20 a BCD	10,84 bc D	13,26 bc
6	11,75 b D	13,54 b BCD	18,07 a A	12,67 b CD	15,22 ab B	13,44 ab BCD	14,50 ab BC	12,84 a BCD	12,38 abc CD	13,82 ab
<b>¹Média</b>	12,76 BCD	13,23 AB	13,23 AB	12,25 CD	13,74 A	12,99 ABC	12,46 BCD	11,92 DE	11,27 E	

\*As médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e mesmo tipo de tratamento e por mesma letra maiúscula na linha e mesmo tempo de estocagem, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

¹DMS: 0,95043 / ²DMS: 0,79586

Os resultados obtidos estão de acordo com o estudo publicado por Sacchi e colaboradores (2008), no qual o azeite extra virgem foi envasado em garrafas de vidro e de PET com absorvedor de oxigênio nas proporções de 0, 1 e 5% e estocado sob luz durante 6 meses. Os autores afirmaram que não houve variação nos resultados de índice de peróxido em relação ao tipo de embalagem, uma vez que os resultados aumentaram nos primeiros 35 dias e posteriormente, diminuíram até o sexto mês.

Pristouri e colaboradores (2010) estudaram a estabilidade oxidativa de azeite extra virgem em embalagens de PET e vidro transparentes armazenadas no escuro. As amostras armazenadas nas embalagens de vidro mantiveram durante 12 meses o limite de 18 meq/kg e as embalagens de PET mantiveram este limite até o 6º mês.

Diante disso, sabendo que o azeite extra virgem é um óleo estável por manter suas propriedades antioxidantes, é provável que o período de 6 meses não seja suficiente para observar grandes mudanças no índice de peróxido que pudessem ser significativas para os padrões de qualidade do azeite de oliva extra virgem. No entanto, diante dos resultados obtidos (Tabela 5), é possível perceber que o azeite estudado está na iminência de atingir o limite de 18 meq/kg.

A avaliação do grau de oxidação do óleo de oliva pode ser realizada também por meio de análises da extinção específica da amostra de óleo diluída em um solvente adequado. A absorbância específica, convencionalmente indicada como K, é medida na região do UV em comprimentos de onda que correspondem ao máximo de absorção de dienos e trienos conjugados em cerca de 232 e 270 nm, respectivamente. Os dienos e trienos conjugados são formados no processo de auto-oxidação dos hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados e seus produtos de fragmentação (ANGEROSA *et al.*, 2006).

De acordo com a análise de variância do K232 apresentada na Tabela 6, os resultados submetidos ao teste F somente foram significativos ( $p < 0,05$ ) em relação aos tratamentos e no decorrer do tempo. No entanto, a interação

tratamento X tempo não foi significativa ( $p > 0,05$ ), o que indica que os tratamentos se comportaram de forma semelhante no decorrer do experimento.

Ao analisar as diferenças entre as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Tabelas 7 e 8), pode-se constatar que a maior diferença na análise de K232 ocorreu em relação ao tempo de estocagem, com um crescimento discreto nos primeiros 30 dias, mantendo-se com poucas alterações posteriormente.

Segundo a resolução 482/2000 da ANVISA, o Regulamento da Comunidade Européia 702/2007 e o CODEX *Alimentarius* 33/1981 (revisado em 2003) o valor de K232 deve ser  $\leq 2,5$  para azeite de oliva extra virgem. Observa-se que é provável que após os seis meses de estocagem, o valor de K232 ultrapasse o limite de 2,5, já que a extinção específica aumentou a partir do segundo mês de estocagem atingindo valores próximos a este limiar, como pode ser visto na Tabela 7.

O alto valor de K232 observado no azeite no início do experimento pode estar relacionado à oxidação do azeite durante o tempo em que ficou estocado desde sua produção até o início das análises.

**Tabela 6.** Análise de variância de K232 dos nove tratamentos de amostras de azeite de oliva extra virgem analisadas durante 6 meses de estocagem.

<b>Quadro de Análise</b>						
<b>Fonte Variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Fcrit</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Tratamentos</b>	2,76681	8	0,34585	2,6543	4,2012 **	<0,001
<b>Blocos (tempo)</b>	7,60976	6	1,26829	2,9529	15,4067 **	<0,001
<b>Trat x Bloco</b>	4,97523	48	0,10365	1,4593	1,2591 ns	0,1564
<b>Resíduo</b>	10,37246	126	0,08232			
<b>Total</b>	25,72426	188				

\*\*Significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ) pelo teste F.

\*Significativo a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) pelo teste F.

ns: não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabela 7.** Média da extinção específica a 232 nm em relação ao tempo de estocagem.

Tempo (mês)	K232 (média dos tratamentos)
0	1,85 c
1	2,51 a
2	2,29 ab
3	2,25 b
4	2,37 ab
5	2,37 ab
6	2,45 ab

\*As médias seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

\*\*DMS: 0,23391

**Tabela 8.** Extinção específica a 232 nm durante 6 meses de estocagem para cada tipo de tratamento.

PET								Lata
Estocagem sob luz				Estocagem no escuro				
Âmbar		Cristal		Âmbar		Cristal		
Com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	
2,27 b	2,23 b	2,22 b	2,11 b	2,58 a	2,35 ab	2,37 ab	2,27 b	2,28 b

\*As médias seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

\*\*DMS: 0,27960

O acompanhamento das alterações oxidativas nos óleos é baseado em dois parâmetros: índice de peróxido e absorbância a 232 nm. A auto-oxidação do azeite virgem durante o armazenamento é um processo extremamente lento, se o produto apresentar baixos valores iniciais peróxido/K232 e altos teores de compostos fenólicos e  $\alpha$ -tocoferol. A retirada do ar do azeite de oliva envasado é um pré-requisito para o controle da auto-oxidação (ANGEROSA *et al.*, 2006).

A extinção específica a 232nm é um método apropriado para monitorar a evolução da oxidação lipídica, em particular nos casos em que os peróxidos formados na oxidação são muito instáveis, assim, a formação de dienos

conjugados passa a ser um método mais confiável (POKORNY; SCHMIDT; PARKÁNYIOVÁ, 2005).

Sendo assim, ao relacionar os resultados obtidos de índice de peróxido com o K232, observa-se que os valores foram correspondentes na medida em que ambos apresentaram um grande aumento nos primeiros trinta dias de estocagem, chegando a valores próximos ao limiar de estabilidade do azeite extra virgem.

Grigoriadou e Tsimidou (2006) examinaram os valores de K232 como uma forma de substituir a determinação do valor de peróxidos no controle de qualidade do azeite virgem armazenado e pronto para o consumo. Um grande número de amostras (n=40) foram analisadas em índice de peróxido e coeficiente de extinção. As amostras foram então armazenadas a 45 °C por várias semanas. Alterações nas matrizes lipídicas foram monitoradas através de medições periódicas dos índices de qualidade das mesmas. Dados de regressão mostraram que o índice de peróxido estava correlacionado com o valor K232 não apenas no tempo zero, mas também durante o armazenamento.

Comportamento semelhante pode ser encontrado nos resultados das análises de Méndez e Falqué (2005) para 4 amostras de azeite de oliva extra virgem nas embalagens PET e vidro transparentes, PET opaco, lata e Tetra Brik® armazenadas sob luz ambiente por 12 horas/dia. De acordo com os autores, todos os tratamentos apresentaram aumento do índice de peróxido e K232 com o decorrer dos 6 meses de estocagem, independentemente do tipo de embalagem em que foram acondicionadas. Porém, as amostras envasadas em lata e em Tetra Brik® apresentaram aumentaram mais lentamente.

A análise de K270 mede os produtos secundários da oxidação lipídica, como os trienos conjugados. De acordo com o Regulamento da Comunidade Européia 702/2007 e com o CODEX *Alimentarius* 33/1981(revisado em 2003) o valor de K270 deve ser  $\leq 0,22$  para azeite de oliva extra virgem. Segundo a resolução 482/2000 da ANVISA, o valor aceitável deve ser  $\leq 0,20$ .

Podemos observar na Tabela 9 que a maior influência nas diferenças dos valores de K270 foi do tipo de estocagem. Em relação ao tempo, os tratamentos tiveram os valores aumentados ligeiramente no primeiro mês, porém, permaneceram estáveis no decorrer do período de estocagem.

O alto valor de K270 observado no azeite no início do experimento pode estar relacionado à oxidação do azeite durante o tempo em ficou estocado desde sua produção até o início das análises.

Está evidente que os tratamentos expostos à radiação luminosa apresentaram valores maiores que os armazenados no escuro e em latas. De acordo com a resolução da ANVISA, os tratamentos expostos à luz já estariam fora dos padrões propostos para azeite de oliva extra virgem a partir do segundo mês de estocagem (valores > 0,20).

**Tabela 9.** Extinção específica a 270 nm das amostras de azeite de oliva extra virgem em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

K270	PET								Lata	Média
	Estocagem sob luz				Estocagem no escuro					
	Âmbar		Cristal		Âmbar		Cristal			
Tempo (meses)	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>		
0	0,17 c A	0,17 c A	0,17 d A	0,17 b A	0,17 bc A	0,17 b A	0,17 b A	0,17 ab A	0,17 a A	0,17 e
1	0,21 bc BC	0,22 b ABC	0,25 bc AB	0,24 a AB	0,26 a A	0,22 a ABC	0,23 a ABC	0,21 a ABC	0,18 a C	0,22 ab
2	0,22 b ABC	0,22 b ABC	0,23 c A	0,22 a AB	0,17 bc C	0,19 ab ABC	0,18 b BC	0,20 a ABC	0,19 a ABC	0,20 cd
3	0,22 b ABC	0,20 bc BCD	0,24 bc AB	0,25 a A	0,16 c D	0,16 b D	0,17 b D	0,18 ab CD	0,17 a D	0,19 d
4	0,24 b A	0,24 b A	0,28 ab A	0,26 a A	0,18 bc B	0,16 b B	0,17 b B	0,14 b B	0,16 a B	0,20 cd
5	0,28 a A	0,25 ab A	0,25 bc A	0,26 a A	0,18 bc B	0,16 b B	0,20 ab B	0,19 ab B	0,17 a B	0,21 bc
6	0,28 a AB	0,29 a AB	0,33 a A	0,26 a B	0,21 b C	0,19 ab C	0,17 b C	0,18 ab C	0,18 a C	0,23 a
<sup>1</sup> Média	0,23 AB	0,23 B	0,25 A	0,24 AB	0,19 C	0,18 C	0,18 C	0,18 C	0,17 C	

\*As médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e mesmo tipo de tratamento e por mesma letra maiúscula na linha e mesmo tempo de estocagem, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup>DMS: 0,01895 / <sup>2</sup>DMS: 0,01585

É possível observar também que as embalagens de PET cristal e âmbar tiveram resultados semelhantes quando expostas à luz e que os tratamentos que foram inertizados não diferiram daqueles que não receberam o nitrogênio.

Para as embalagens PET armazenadas no escuro, após os seis meses de estocagem, é provável que o valor de K270 pudesse ultrapassar o limiar de 0,20. O azeite acondicionado na lata permaneceu mais estável e não apresentou diferenças significativas no decorrer do tempo.

Os resultados obtidos estão de acordo com os apresentados por Pristouri e colaboradores (2010) ao analisarem a estabilidade de azeite extra virgem em amostras acondicionadas em embalagens de PET transparente. Quando armazenadas no escuro, as amostras mantiveram os valores de K270 menores que 0,22 até o 6º mês. Quando submetidas a 12 horas sob luz do dia, as amostras chegaram a ultrapassar este limite em menos de 3 meses de estocagem.

No estudo de Méndez e Falqué (2005) que analisaram 4 amostras de azeite de oliva extra virgem em embalagens de PET e vidro transparentes, PET opaco, lata e Tetra Brik® armazenadas sob luz ambiente por 12 horas/dia, as amostras acondicionadas em PET e vidro transparente apresentaram um maior aumento de K270 em relação aos demais tratamentos no decorrer dos 6 meses de estocagem.

De acordo com a análise de variância do teor de compostos fenólicos totais na Tabela 10, observa-se que os resultados somente foram significativos a 95% de confiança quando avaliados em relação ao tempo de estocagem.

Para a variação entre os tratamentos, apesar do p-valor estar abaixo 0,05 no teste F (Tabela 10), quando aplicado o teste de Tukey a 0,05 de probabilidade (Tabela 11), a diferença entre as médias da interação não foram significativos. Desta forma, o teor de compostos fenólicos totais não sofreu interferência do tipo de embalagem, dos diferentes ambientes de estocagem e da inertização com nitrogênio.

Na Tabela 11, é notável que o teor de fenólicos totais sofreu uma diminuição estatisticamente significativa apenas no sexto mês de estocagem. No entanto, podemos considerar que foi uma redução sutil e que qualitativamente o teor de fenólicos totais permaneceu estável.

**Tabela 10.** Análise de variância do teor de compostos fenólicos totais dos nove tratamentos de amostras de azeite de oliva extra virgem analisadas nos meses 0, 3 e 6 de experimento.

<b>Quadro de Análise</b>						
<b>Fonte Variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Fcrit</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Tratamentos</b>	8,80045	8	1,10006	2,0585	2,0770*	0,0475
<b>Blocos (tempo)</b>	20,60423	2	10,30212	4,8815	19,4509**	<0,001
<b>Trat x Bloco</b>	7,98240	16	0,49890	0,4142	0,9419ns	0,5261
<b>Resíduo</b>	42,90143	81	0,52965			
<b>Total</b>	80,28851	107				

\*\*Significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ) pelo teste F.

\*Significativo a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) pelo teste F.

ns: não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabela 11.** Média do teor de compostos fenólicos totais dos tratamentos em relação ao tempo de estocagem.

<b>Tempo (mês)</b>	<b>Compostos fenólicos (mg ác.gálico/kg) média dos tratamentos</b>
0	27,60 a
3	27,32 a
6	26,57 b

DMS: 0,40989

Nos resultados das análises de Méndez e Falqué (2005) para 4 amostras de azeite de oliva extra virgem nas embalagens PET e vidro transparentes, PET opaco, lata e Tetra Brik<sup>®</sup> armazenadas sob luz ambiente por 12 horas/dia. Todos os tratamentos apresentaram redução do conteúdo de compostos fenólicos totais no decorrer dos 6 meses de estocagem, independentemente do tipo de embalagem em que foram acondicionadas.

O  $\alpha$ -tocoferol, o mais importante antioxidante *in vivo*, é encontrado em níveis consideráveis em azeite de oliva extra virgem. Os tocoferóis são conhecidos por atuar como antioxidantes doando um átomo de hidrogênio para radicais peroxil durante sua propagação (PSOMIADOU; TSIMIDOU; BOSKOU, 2000).

Durante a foto-oxidação, o  $\alpha$ -tocoferol eficientemente seqüestra o oxigênio singlete por um mecanismo de transferência de carga. A rápida degradação  $\alpha$ -tocoferol durante a exposição de azeite extra virgem à luz tem sido relatada (PSOMIADOU & TSIMIDOU, 1998; PIRISI *et al.*, 1998).

Analisando a Tabela 12, fica evidente que a diminuição no teor de  $\alpha$ -tocoferol está relacionada às variáveis tempo e ambiente de estocagem. As embalagens armazenadas sob luz sofreram diminuição significativa no teor de  $\alpha$ -tocoferol, mais expressiva nas embalagens transparentes, como mostra a Figura 11. Nas embalagens âmbar, o efeito da radiação luminosa foi menos acentuado, porém ainda mais expressivo se comparado aos tratamentos estocados no escuro. Nas amostras que permaneceram no escuro e em latas a diminuição do conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol foi sutil. Percebe-se que a inertização não provocou influência na variação do teor de  $\alpha$ -tocoferol.

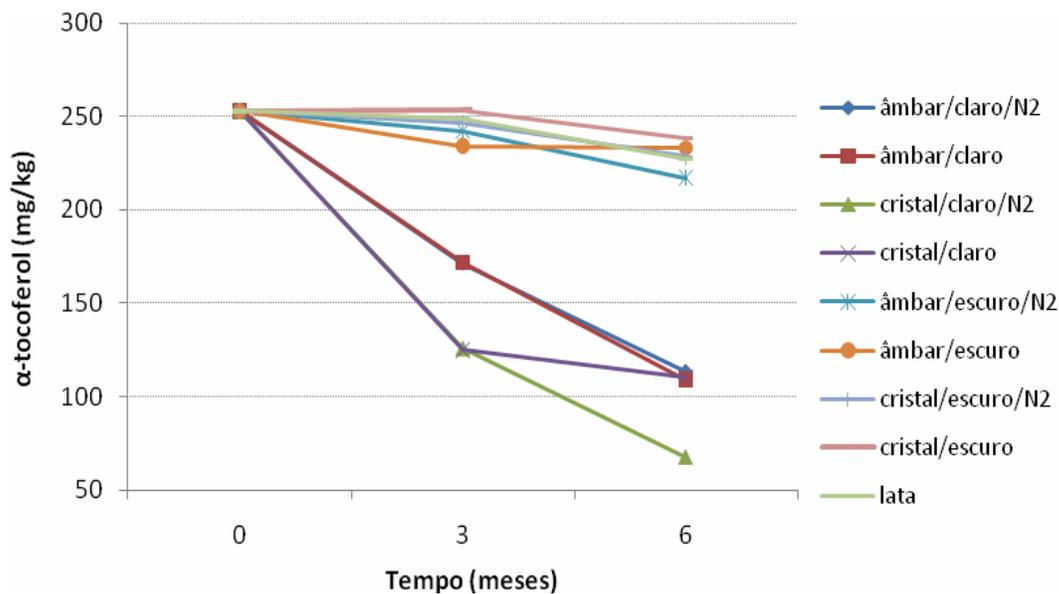
Resultado semelhante foi apresentado por Sacchi e colaboradores (2008), no qual as amostras de azeite virgem envasadas em embalagens transparentes de PET, PET com abosorvedor de oxigênio e vidro, armazenadas sob luz por 6 meses, também apresentaram queda de aproximadamente 90% no teor de  $\alpha$ -tocoferol.

**Tabela 12.** Teor de  $\alpha$ -tocoferol de azeite de oliva extra virgem em nove diferentes tratamentos analisadas nos meses 0, 3 e 6 de experimento.

$\alpha$ -tocoferol (mg/kg)	PET								Lata	<sup>2</sup> Média
	Estocagem sob luz				Estocagem no escuro					
	Âmbar		Cristal		Âmbar		Cristal			
Tempo (mês)	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>		
0	252,77 a A	252,77a A	252,77 a A	252,77 a A	252,77 a A	252,77 a A	252,77 a A	252,77 a A	252,77 a A	252,77 a
3	171,27 b C	171,56 b C	125,78 b D	124,85 b D	242,25 a AB	234,15 b B	246,65 a AB	253,43 a A	248,95 a AB	202,10 b
6	113,13 c C	109,10 c C	67,68 c D	110,12 c C	217,11 b B	232,95 b AB	228,41 b AB	238,15 b A	227,14 b AB	171,53 c
<sup>1</sup> Média	179,06 c	177,81 c	148,74 e	162,58 d	237,38 b	239,96 ab	242,61 ab	248,12 a	242,95 ab	

\*As médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e mesmo tipo de tratamento e por mesma letra maiúscula na linha e mesmo tempo de estocagem, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup>DMS: 10,66228 / <sup>2</sup>DMS: 4,61400



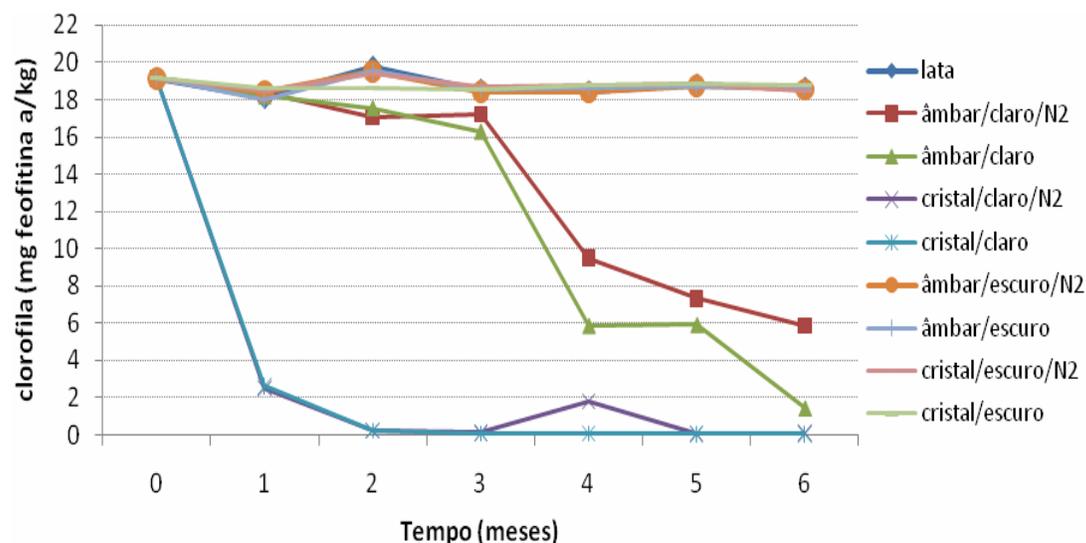
**Figura 11.** Comportamento das amostras de azeite de oliva extra virgem quanto ao teor de  $\alpha$ -tocoferol em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

A clorofila e seus produtos de degradação (feofitinas e feoforbidas) agem como sensibilizadores para a produção de oxigênio singlete na presença de luz e  $O_2$  atmosférico e aceleram a oxidação do óleo. Endo, Usuki e Kaneda (1984) estudaram o efeito pró-oxidante de alguns derivados de clorofila e descobriu que as feofitinas tiveram um maior efeito fotossensibilizante que as clorofilas, mas inferior às feoforbidas. A atividade da feofitina *a*, o pigmento majoritário no azeite de oliva, é menor se comparado à feofitina *b* (PSOMIADOU & TSIMIDOU, 2001).

Observando a Tabela 13, percebe-se que para os tratamentos estocados sob luz as variáveis que influenciaram no teor de clorofila foram o tipo de armazenamento e o tempo. No entanto, nas amostras estocadas no escuro, independentemente do tipo de embalagem e inertização, o teor de clorofila permaneceu constante, assim como nas latas.

Fica evidente o efeito da foto-oxidação no teor de clorofila das amostras estocada sob luz, especialmente quando acondicionadas em embalagens PET cristal (transparentes). Percebe-se que os tratamentos PET âmbar e PET cristal perderam clorofila no decorrer da estocagem, porém, na embalagem

transparente, esta redução foi mais acentuada. Este resultado é esperado em decorrência da pigmentação da embalagem na cor âmbar servir como barreira à luz. Porém, pode-se notar que esta pigmentação não foi eficiente para os seis meses de estocagem na intensidade luminosa de 2900 lux. Estes resultados ficam mais evidentes observando a Figura 12.



**Figura 12.** Comportamento das amostras de azeite de oliva extra virgem quanto ao teor de clorofila em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

Cecchi e colaboradores (2010) analisaram a estabilidade de azeite extra virgem exposto à luz e no escuro nas seguintes embalagens: PET transparente e PET transparente com absorvedor de O<sub>2</sub>. Os autores constataram que o teor de clorofila das amostras expostas à luz diminuiu drasticamente no primeiro mês de estocagem, mesmo na embalagem com absorvedor de O<sub>2</sub>. Nas embalagens estocadas no escuro, as amostras finalizaram os 13 meses com redução de 50% do teor inicial.

**Tabela 13.** Teor de clorofila das amostras de azeite de oliva extra virgem em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

clorofila (mg feofitina a/kg)	PET								Lata	<sup>2</sup> Média	
	Estocagem sob luz				Estocagem no escuro						
	Âmbar		Cristal		Âmbar		Cristal				
Tempo (mês)	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>			
0	19,14 a A	19,14 a A	19,14 a A	19,14 a A	19,14 a A	19,14 a A	19,14 a				
1	18,35 a A	18,18 a A	2,51 b B	2,63 b B	18,44 a A	17,96 a A	18,43 a A	18,65 a A	18,08 a A	18,08 a A	14,80 b
2	17,04 a A	17,55 a A	0,23 b B	0,23 b B	19,52 a A	19,54 a A	19,42 a A	18,65 a A	19,76 a A	19,76 a A	14,66 b
3	17,21 a A	16,28 a A	0,13 b B	0,08 b B	18,41 a A	18,58 a A	18,66 a A	18,54 a A	18,52 a A	18,52 a A	14,04b
4	9,49 b B	5,88 b BC	1,80 b CD	0,06 b D	18,40 a A	18,61 a A	18,77 a A	18,76 a A	18,42 a A	18,42 a A	12,29 c
5	7,33 b B	5,93 b B	0,06 b C	0,04 b C	18,76 a A	18,72 a A	18,85 a A	18,86 a A	18,80 a A	18,80 a A	11,93 c
6	5,88 b B	1,46 b BC	0,10 b C	0,04 b C	18,55 a A	18,65 a A	18,46 a A	18,76 a A	18,62 a A	18,62 a A	11,17 c
<sup>1</sup> Média	13,49 B	12,10 B	3,42 C	3,17 C	18,75 A	18,74 A	18,82 A	18,76 A	18,76 A	18,76 A	

\*As médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e mesmo tipo de tratamento e por mesma letra maiúscula na linha e mesmo tempo de estocagem, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup>DMS: 1,91493 / <sup>2</sup>DMS: 1,60204

A cor desempenha um papel importante na especificação de óleos comerciais, mesmo que as expectativas possam ser muito diferentes. Para óleos de sementes em geral, um produto claro, ou quase incolor é desejável, enquanto que para azeites, tonalidades mais intensas são bem aceitas (PIERGIOVANNI & LIMBO, 2010).

A Tabela 14 apresenta os resultados da análise de cor pelo sistema  $L^*C^*h$ . A luminosidade ( $L^*$ ) aumentou pronunciadamente nas amostras em embalagem de PET cristal, que no primeiro mês de estocagem já se diferenciava dos demais tratamentos. A embalagem âmbar armazenada na luz também apresentou aumento da luminosidade, porém, se diferenciando a partir do terceiro mês. A saturação ( $C^*$ ) aumentou em todos os tratamentos no primeiro mês de estocagem. Nos tratamentos no escuro a saturação permaneceu estável do segundo até o sexto mês. A exposição à luz influenciou no valor de  $C^*$ , sendo que o tratamento em PET cristal apresentou o maior crescimento dos demais tratamentos, se diferenciando a partir do primeiro mês. Quanto à tonalidade ( $h$ ), as amostras se apresentaram na região do amarelo (próximo ao ângulo de  $90^\circ$ ) e sofreram pouca alteração durante o experimento. Contudo, pode-se afirmar que, pelo modelo  $L^*C^*h$ , os tratamentos estocados no escuro e na lata não tiveram alterações significativas durante o experimento. Já as amostras estocadas sob luz sofrerem influência das variáveis tempo, ambiente de estocagem e tipo de embalagem.

A Tabela 15 apresenta a análise de cor na escala Lovibond (R, Y, B, N). Nota-se que a cor das amostras armazenadas no escuro e na lata sofreram pequenas alterações. As amostras estocadas sob luz apresentaram um significativo aumento nas escalas R (vermelho) e N (neutro), especialmente as embalagens PET cristal. Nestas amostras a escala Y (amarelo) diminuiu ligeiramente e zerou na escala B (azul).

As análises de cor  $L^*C^*h$  e Lovibond se correlacionam, uma vez que demonstraram que as amostras armazenadas no escuro sofreram pouca alteração, permanecendo na tonalidade amarela. Já as amostras expostas à luz

apresentaram maior alteração, com o aumento da luminosidade e com maior saturação da tonalidade amarela.

Nas análises apresentadas por Méndez e Falqué (2005) para 4 amostras de azeite de oliva extra virgem nas embalagens PET e vidro transparentes, PET opaco, lata e Tetra Brik® armazenadas sob luz ambiente por 12 horas/dia, os tratamentos acondicionados em PET e vidro transparente apresentaram tonalidade mais escura.

Criado e colaboradores (2008) analisaram as alterações nos pigmentos de azeites extra virgem acondicionados em vidro âmbar, inertizados com nitrogênio e mantidos 4°C no escuro por 24 meses. Durante o armazenamento o teor de clorofila diminuiu com o tempo, mesmo nas condições apropriadas de estocagem (na ausência de luz e oxigênio) e os pigmentos luteína e  $\beta$ -caroteno não tiveram mudanças significativas. Os autores verificaram que, diante das alterações nos perfis dos componentes responsáveis pela cor do azeite, a luminosidade ( $L^*$ ) aumentou, a intensidade de cor do azeite diminuiu e não houve mudança nas coordenadas  $a^*$  e  $b^*$ , que se mantiveram na região do verde (-) e amarelo (+), respectivamente.

Pristouri e colaboradores (2010) relata que a cor de azeite de oliva extra virgem acondicionados em PET e PET com absorvedor de UV expostas à luz apresentou mudanças significativas após 6 meses de estocagem. Em ambas as embalagens, a luminosidade do azeite aumentou, a coordenada  $a^*$  diminuiu e a  $b^*$  aumentou, o que representa uma aproximação para os tons de amarelo e vermelho.

**Tabela 14.** Cor L\*C\*h das amostras de azeite de oliva extra virgem em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

Cor L*C*h	Tempo (meses)	PET								Lata	Média
		Estocagem sob luz				Estocagem no escuro					
		Âmbar		Cristal		Âmbar		Cristal			
		com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>		
L*	0	79,44 d A	79,44 d A	79,44 e A	79,44 d A	79,44 a A	79,44 a A	79,44 a A	79,44 a A	79,44 a A	79,44 f
	1	79,55 d B	79,44 d B	83,43 d A	83,04 c A	79,50 a B	79,39 a B	79,42 a B	79,34 a B	79,36 a B	80,28 e
	2	80,10 d B	79,78 cd B	85,77 c A	85,75 b A	79,62 a B	79,59 a B	79,36 a B	79,45 a B	79,84 a B	81,03 d
	3	80,12 d BC	80,37 c B	86,42 bc A	86,53 ab A	79,32 a C	79,62 a BC	79,45 a C	79,49 a BC	79,47 a BC	81,20 d
	4	81,94 c C	82,94 b B	86,69 b A	86,91 a A	79,77 a D	79,47 a D	79,39 a D	79,39 a D	79,84 a D	81,82 c
	5	83,46 b B	83,63 b B	87,05 ab A	87,05 a A	79,81 a C	79,73 a C	79,57 a C	79,48 a C	79,83 a C	82,18 b
	6	84,49 a B	85,30 a B	87,83 a A	87,32 a A	79,96 a C	79,88 a C	79,72 a C	79,65 a C	79,97 a C	82,68 a
	<b>Média</b>	81,30 B	81,56 B	85,24 A	85,16 A	79,63 C	79,59 C	79,48 C	79,46 C	79,68 C	
C*	0	108,91 b A	108,91 d A	108,91 c A	108,91 c A	108,91 b A	108,91 b A	108,91 b A	108,91 b A	108,91 b A	108,94 d
	1	113,83 a B	112,83 c B	115,70 b A	115,33 b A	112,56 a B	112,62 a B	112,95 a B	112,86 a B	112,22 a B	113,34 c
	2	113,18 a B	113,21 c B	117,34 a A	117,23 a A	112,70 a B	112,68 a B	113,01 a B	112,96 a B	112,32 a B	113,85 ab
	3	113,29 a B	113,55 bc B	117,72 a A	117,48 a A	112,53 a B	112,86 a B	113,02 a B	113,06 a B	112,52 a B	114,01 a
	4	114,05 a B	114,80 ab B	114,30 b B	117,27 a A	111,87 a C	111,67 a C	112,10 a C	112,28 a C	112,13 a C	113,39 bc
	5	113,13 a C	115,22 a B	117,33 a A	117,33 a A	112,10 a C	112,30 a C	112,63 a C	112,77 a C	112,24 a C	113,90 ab
	6	114,46 a B	116,10 a A	115,73 b AB	117,16 a A	112,21 a C	112,29 a C	112,77 a C	112,83 a C	112,27 a C	113,98 a
	<b>Média</b>	112,87 C	113,52 B	115,29 A	115,82 A	111,84 D	111,91 D	112,20 D	112,24 D	111,82 D	
h	0	86,18 cd A	86,18 ab A	86,18 b A	86,18 bc A	86,18 bc A	86,18 ab A	86,18 a A	86,18 a A	86,18 bc A	86,18 b
	1	85,85 d A	85,84 b A	85,23 d B	86,11 c B	86,11 c A	86,01 b A	85,88 a A	85,86 a A	86,17 c A	85,79 c
	2	86,34 bc AB	86,18 ab ABC	85,69 cd D	86,41 abc CD	86,41 abc AB	86,41 ab AB	86,09 a BCD	86,12 a BCD	86,62 abc A	86,18 b
	3	86,28 bcd AB	86,32 a AB	85,77 bc C	86,20 bc BC	86,20 bc ABC	86,39 ab A	86,20 a ABC	86,17 a ABC	86,40 abc A	86,18 b
	4	86,20 cd BC	85,99 ab C	86,86 a A	86,41 abc C	86,41 abc ABC	86,29 ab BC	86,04 a BC	85,97 a C	86,52 abc AB	86,25 b
	5	86,93 a A	86,23 ab BCD	86,08 bc D	86,71 a D	86,71 a AB	86,58 a ABC	86,29 a BCD	86,19 a CD	86,64 abc ABC	86,41 a
	6	86,68 ab AB	86,07 ab D	86,75 a A	86,59 ab CD	86,59 ab ABC	86,59 a ABC	86,22 a BCD	86,16 a CD	86,66 a AB	86,43 a
	<b>Média</b>	86,35 A	86,12 B	86,08 B	85,88 C	86,37 A	86,35 A	86,13 B	86,09 B	86,46 A	

\*As médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e mesmo tipo de tratamento e por mesma letra maiúscula na linha e mesmo tempo de estocagem, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Tabela 15.** Cor Lovibond das amostras de azeite de oliva extra virgem em nove diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

Cor Lovibond	Tempo (meses)	PET								Lata	Média
		Estocagem sob luz				Estocagem no escuro					
		Âmbar		Cristal		Âmbar		Cristal			
		com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>		
R (vermelho)	0	2,85 b A	2,85 b A	2,85 c A	2,85 b A	2,85 b A	2,85 a A	2,85 b A	2,85 b A	2,85 a A	2,85 c
	3	3,21 b B	3,12 b B	5,75 a A	5,57 a A	3,32 a B	3,12 a B	3,30 a B	3,37 a B	3,02 a B	7,75 b
	6	4,15 a C	4,67 a B	5,38 b A	5,67 a A	3,13 ab D	3,07 a D	2,97 ab D	3,13 ab D	3,12 a D	3,92 a
	<b>Média</b>	3,40 B	3,54 B	4,67 A	4,70 A	3,10 C	3,01 C	3,04 C	3,12 C	3,00 C	
Y (amarelo)	0	71,95 b A	71,95 a A	71,95 a A	71,95 a A	71,95 b A	71,95 b A	71,95 b A	71,95 b A	71,95 b A	71,95 a
	3	72,33 a ABC	72,05 a C	70,00 b D	70,00 b D	72,67 a AB	72,30 a BC	72,68 a AB	72,07 ab A	72,07 ab C	71,86 a
	6	70,40 c B	70,00 b B	70,00 b B	70,00 b B	72,27 b A	72,17 ab A	71,90 b A	72,28 a A	72,28 a A	71,25 b
	<b>Média</b>	71,56 B	71,33 B	70,65 C	70,65 C	72,30 A	72,14 A	72,18 A	72,30 A	72,07 A	
B (azul)	0	1,95 b A	1,95 a A	1,95 a A	1,95 a A	1,95 c A	1,95 b A	1,95 b A	1,95 b A	1,95 b A	1,95 a
	3	2,33 a ABC	2,05 a C	0,00 b D	0,00 b D	2,67 a AB	2,30 a BC	2,68 a AB	2,73 a A	2,23 ab C	1,89 a
	6	0,40 c B	0,00 b B	0,00 b B	0,00 b B	2,27 b A	2,17 ab A	1,90 b A	2,22 b A	2,28 a A	1,25 b
	<b>Média</b>	1,56 B	1,33 B	0,65 C	0,65 C	2,29 A	2,13 A	2,17 A	2,30 A	2,16 A	
N (neutro)	0	0,00 b A	0,00 b A	0,00 c A	0,00 c A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 c
	3	0,00 b B	0,00 b B	0,92 b A	1,07 b A	0,00 a B	0,00 a B	0,00 a B	0,00 a B	0,00 a B	0,22 b
	6	0,60 a B	0,63 a B	1,75 a A	1,67 a A	0,00 a C	0,00 a C	0,00 a C	0,00 a C	0,00 a C	0,52 a
	<b>Média</b>	0,20 B	0,21 B	0,89 A	0,91 A	0,00 C	0,00C	0,00 C	0,00 C	0,00C	

\*As médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e mesmo tipo de tratamento e por mesma letra maiúscula na linha e mesmo tempo de estocagem, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

## 4 CONCLUSÕES

As embalagens de PET âmbar e PET cristal (transparente) usadas no experimento apresentaram espessura irregular. Esta característica tem relação com baixa resistência da parede ao colapso nas embalagens que não foram inertizadas com gás nitrogênio. As embalagens plásticas apresentaram baixa taxa de permeabilidade ao oxigênio e ao vapor de água.

A embalagem âmbar apresentou baixa taxa de transmitância, que ocorreu apenas na região do visível. Já a embalagem cristal apresentou alta taxa de transmitância que ocorreu desde a região UV seguindo em linha constante em toda região do visível.

O azeite usado no experimento está de acordo com os parâmetros que caracterizam o azeite de oliva do tipo extra virgem conforme recomendações da ANVISA, da Regulamentação Européia e do CODEX *Alimentarium*.

Durante o tempo de estocagem, a porcentagem de ácidos graxos livres se manteve baixa em todos os tratamentos. O índice de peróxido cresceu moderadamente com o tempo em todos os tratamentos, mas, de forma menos pronunciada na lata. Este mesmo comportamento foi observado para a extinção específica a 232 nm.

O teor de compostos fenólicos totais sofreu pouca alteração. A foto-oxidação teve um importante efeito na variação das análises de K270,  $\alpha$ -tocoferol, clorofila e cor, sendo responsável pela degradação até mesmo das amostras em embalagem âmbar.

Dentre os parâmetros avaliados pela ANVISA, o único que extrapolou o limite aceitável para azeite de oliva extra virgem foi o K270 dos tratamentos expostos à luz.

As amostras inertizadas não apresentaram diferença em relação aos demais tratamentos, o que pode ser um sinal de que o procedimento não foi eficaz.

Portanto, as embalagens de PET avaliadas neste trabalho não são recomendadas para o uso em azeite de oliva extra virgem, uma vez que, tanto a embalagem cristal, quanto a âmbar, quando expostas à luz, não mantiveram a estabilidade oxidativa do azeite de oliva.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBA, J.; IZQUIERDO, J. R.; GUTIÉRREZ, F. **Aceite de oliva virgen. Análisis sensorial**. Ed. Agrícola Española, S.A. Madrid, 1997.

ALVES, R. M. V. Ensaio de determinação da taxa de permeabilidade ao vapor d'água e embalagem. **CETEA/ITAL**, 1999. 2p.

ANGEROSA, F.; CAMPESTRE, C.; GIANANTE, C. Analysis and Authentication. In **Olive Oil: Chemistry and Technology**; Boskou, D., Ed.; AOCS Press: Champaign, 2 ed, cap 7, 2006, p 113.

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY - AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society**. 5 ed., Champaign: AOCS, 2004.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard Test Method for Water Vapor Permeability of Packages**. ASTM D 895-94. ASTM International, West Conshohocken, PA, 1997.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard Test Method for Haze and Luminous Transmittance of Transparent Plastics**. ASTM D 1003-00. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2000.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard Practices for Determining Hermeticity of Electron Devices by Dye Penetration**. ASTM F97-72(2002)e1. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2002.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard Test Method for Measurement of Thickness of Nonmagnetic Materials by Means of a Digital Magnetic Intensity Instrument**. ASTM D 4166-99. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2004.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard Test Method for Leaks Using Bubble Emission Techniques**. ASTM E515 – 05. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2005.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard Test Method for Oxygen Transmission Rate Through Dry Packages Using a Coulometric Sensor**. ASTM F1307-02. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2007.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS . **Standard Specification for Dimensions and Tolerances for Plastic Bottles**. ASTM D 2911-10. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2010.

AZEREDO, H. M. C. **Maximização da estabilidade oxidativa de óleo de soja acondicionado em garrafas plásticas**. 2001. Tese (Doutor em Engenharia de

Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

BOSKOU, D.; BLEKAS, G.; TSIMIDOU, M. Olive Oil Composition. In Olive Oil: **Chemistry and Technology**; Boskou, D. (Ed.); AOCS Press: Champaign, ed. 2, cap. 4, p 41-72. 2006.

BOSSET, J. O.; GALLMANN, P. U.; SIEBER, R. Influence of light transmittance of packaging materials on the shelf-life of milk and dairy products – a review. In: Mathlouthi, M. (Ed). **Food packaging and preservation**. London: Blackie Academic & Professional; 1994. p.222-68.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais. **Diário Oficial da União**, Brasília, publicada em 20 de junho de 2000, p. 3029.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução n. 270, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 de setembro de 2005, p. 2134.

CECCHI, T.; PASSAMONTI., P.; CECCHI, P. Study of the quality of extra virgin olive oil stored in PET bottles with or without an oxygen scavenger. **Food Chemistry**.120. p 730–735. 2010.

CODEX *Alimentarius Commission*. **CODEX Standards for olive oils, and olive pomace oils**, CODEX STAN 33, 1981. CODEX *Alimentarius*, Rome: FAO/WHO, rev.2, 2003.

COLTRO,L.; PADULA, M.; SARON, E. S.; BORGHETTI, J. & BURATIN, A. E. P. Evaluation of a UV Absorber Added to PET Bottles for Edible Oil Packaging. **Packaging Technology and Science**. 16: 15–20. 2003.

CRIADO, M. N.; ROMERO, M. P.; CASANOVAS, M.; MOTILVA M. J. Pigment profile and colour of monovarietal virgin olive oils from Arbequina cultivar obtained during two consecutive crop seasons. **Food Chemistry**, 110 (4), p. 873-880. 2008.

DI GIOVACCHINO, D. I. L.; MUCCIARELLA, N.; CONSTANTINI, N.; FERRANTE, M. L.; SURRICCHIO, G. Use of nitrogen to improve stability of virgin olive oil during storage. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 79, 339–344. 2002.

ENDO, Y.; USUKI, R.; KANEDA, T. Prooxidant activities of chlorophylls and their decomposition products on the photooxidation of methyl linoleate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 61, 781-784,1984.

FARIA, J. A. F. **Recipientes de vidro para embalagem**. Campinas: FEA – UNICAMP, 2004. 13p. Publicação interna.

- GARCIA, E. E. C.; PADULA, M.; SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. Embalagens plásticas: propriedades de barreira. **ITAL**: Campinas, 1989. 44 p.
- GARCÍA, A.; BRENES, M; MARTÍNEZ, F; ALBA, J; GARCÍA, P; GARRIDO, A. High-Performance Liquid Chromatography Evaluation of Phenols in Virgin Olive Oil During Extraction at Laboratory and Industrial Scale. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 78, p.625-629, 2001.
- GIMENO, E; CASTELLOTE, A.I.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M; DE LA TORRE, M. C; LÓPEZ-SABATER, M. C. The effect of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics,  $\alpha$ -tocopherol, and  $\beta$ -carotene) in virgin olive oil. **Food Chemistry**, 78, 2002, p. 207.
- GRIGORIADOU, D.; TSIMIDOU. M. Quality Control and Storage Studies of Virgin Olive Oil. Exploiting UV Spectrophotometry Potential. **European Journal of Lipid Science Technology**. v. 108. 1, p. 61-69. 2006.
- GUGUMUS, F. Light stabilizers. In: Zweifel H. (Ed). **Plastics additives handbook**. 5th. ed. Munich: Hanser; 2001. p.141- 425.
- GUTFINGER, T. Polyphenols in olive oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 58, p.966–968, 1981.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A Rapid preparation of fatty methyl acid esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, 22, p.475-6 ,1973.
- MÉNDEZ, A. I.; FALQUÉ, E. Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. **Food Control**. 18, 521-529. 2007.
- OLIVEIRA, L. M. Termossoldagem de embalagens flexíveis. **Coletânea do ITAL**, v. 26, n. 2, p. 111-117, 1996.
- OLIVEIRA, L. M. Requisitos de proteção de produtos em embalagens plásticas rígidas. Campinas: **CETEA/ITAL**, 2006. 228p.
- PERCUSSI, L. **Azeite: história, produtores, receitas**. 2ª ed., São Paulo: Editora Senac São Paulo, 2007, 281p.
- PIERGIOVANNI, L.; LIMBO, S. Packaging and the Shelf Life of Vegetable Oils In: Robertson, G. L. **Food Packaging and Shelf Life: A Practical Guide**, CRC Press, Boca Raton, p. 318, 2010.
- PIRISI, F. M.; ANGIANI, A.; BANDINO, G.; CABRAS, P.; GUILLOU, C.; MACCIONI, E.; RENIERO, F. Photolysis of  $\alpha$ -tocopherol in olive oils and model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46, 4529-4533. 1998.
- POKORNY, J.; SCHMIDT, S., PARKÁNYIOVÁ, J. Ultraviolet-Visible Spectrophotometry in the Analysis of Lipid. In: Kamal-Eldin A., Pokorny J. **Analysis of Lipid Oxidation**. AOCS Press: Champaign. USA. cap. 3. p. 17-39. 2005.

PRISTOURI, T. G.; BADEKA, A.; KONTOMINAS, M. G. Effect of packaging material headspace, oxygen and light transmission, temperature and storage time on quality characteristics of extra virgin olive oil. **Food Control**, 21 (4), pp. 412-418. 2010.

PSOMIADOU, E.; TSIMIDOU, M. Simultaneous HPLC determination of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46:5132–5138. 1998.

PSOMIADOU, E.; TSIMIDOU, M.; BOSKOU, D.  $\alpha$ -Tocopherol content of Greek virgin olive oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48:1770–1775. 2000.

PSOMIADOU, E.; TSIMIDOU, M. Pigments in Greek Virgin Olive Oils: Occurrence and Levels. **Journal of the Science Food and Agriculture**. 41, 640-647. 2001.

SACCHI, R.; SAVARESE, M.; DEL REGNO, A.; PADUANO, A.; TERMINIELLO R.; AMBROSINO M. L. Shelf Life of Vegetable Oils Bottled in Different Scavenging Polyethyleneterephthalate (PET) Containers. **Packaging Technology and Science**. 21, p 269–277, 2008.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis. Campinas: **CETEA**, 2001. 213 p.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M. V.; GARCIA, E. E. C. Embalagens plásticas flexíveis. Campinas: **CETEA**, 2002. 267 p.

TSIMIDOU, M. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. **Italian Journal of Food Science**. v. 10, p. 99–116. 1998.

UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) nº 702/2007. **Jornal Oficial da União Européia**. 21 de julho de 2007. p. 11-27.2007.

## **CAPÍTULO 3**

**ESTABILIDADE DE AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM EM EMBALAGENS DE VIDRO E LATA DE FOLHA-DE-FLANDRES, SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM E SUBMETIDO À INERTIZAÇÃO**

## **ESTABILIDADE DE AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM EM EMBALAGENS DE VIDRO E LATA DE FOLHA-DE-FLANDRES, SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM E SUBMETIDO À INERTIZAÇÃO**

### **RESUMO**

A oxidação lipídica, que representa um importante fator de degradação do azeite de oliva, é desencadeada por fatores como a disponibilidade de oxigênio, presença de luz e temperatura. Neste trabalho foi avaliada a estabilidade de azeite de oliva extra virgem em embalagens de vidro transparente e lata de folha-de-flandres. Um lote da embalagem de vidro foi inertizado com nitrogênio gasoso. O envase e o fechamento foram feitos de forma manual. As amostras foram estocadas à temperatura ambiente ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e em duas condições: mantidas em caixas de papelão ao abrigo da luz e expostas à luz (2900 lux) por 12 horas/dia por um período de seis meses. Para determinação da estabilidade do azeite as análises físico-químicas de ácidos graxos livres, índice de peróxidos, extinção específica a 230 e 270 nm, teor de clorofila e cor  $L^*C^*h$  foram realizadas no momento inicial e a cada 30 dias. Já as análises de umidade, compostos fenólicos totais, teor de tocoferóis e cor Lovibond foram realizadas em intervalos de 90 dias. Observou-se que no período de 6 meses de estocagem, os resultados mais expressivos ocorreram devido à foto-oxidação, com degradação mais acentuada dos compostos  $\alpha$ -tocoferol, clorofila e significativa alteração da cor. Os efeitos da auto-oxidação foram observados pelo aumento do valor de K232 e do índice de peróxido. Quando armazenados no escuro durante 6 meses, todos os tratamentos foram eficazes em manter a estabilidade oxidativa do azeite. No entanto, quando exposto à luz, o azeite acondicionado em vidro transparente apresentou expressiva degradação. A inertização com nitrogênio não teve efeito sobre a estabilidade do azeite nos diferentes tipos de embalagens. Considerando que o azeite é um produto exposto à luz, seja durante a venda ou no consumo doméstico, pelos resultados apresentados, não é recomendado uso da

embalagem de vidro transparente para este produto por comprometer sua estabilidade e sua característica nutricional.

**Palavras-chave:** azeite de oliva, estabilidade oxidativa, estocagem, embalagem.

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre os óleos vegetais comestíveis comercializados mundialmente, o azeite de oliva (*Olea europaea*) é um dos mais importantes e antigos. O azeite de oliva é o produto obtido de azeitonas maduras, procedentes de oliveiras sadias, cujo processamento tenha sido realizado com frutos frescos evitando qualquer tratamento que altere a natureza química de seus componentes, tanto durante a extração como no armazenamento (GOODACRE; KEL; BIANCHI, 1993).

Devido ao seu índice elevado de ácidos graxos insaturados, o azeite de oliva é suscetível ao ranço oxidativo, que pode ser causado pela ação do oxigênio atmosférico e/ou do oxigênio no espaço livre das embalagens e/ou do oxigênio dissolvido no produto. A reação é favorecida pela temperatura elevada, pela incidência da luz e pela presença de metais pró-oxidantes. As mudanças na qualidade do azeite estão relacionadas com a formação de compostos oxidados que alteram as características sensoriais e nutricionais do óleo incluindo o aumento da acidez, a produção de compostos carbonílicos, uma diminuição da concentração de  $\alpha$ -tocoferol e a formação de compostos de *off-flavor* (KANAVOURAS *et al.*, 2004).

Diante disso, para controlar a oxidação, é necessário remover o oxigênio dissolvido no produto e reduzir o oxigênio do espaço livre da embalagem, pois à medida que o oxigênio dissolvido for consumido, o oxigênio do espaço livre passará a se dissolver no óleo, dando continuidade à reação de oxidação. Se a embalagem for permeável, haverá sempre um fornecimento de oxigênio para o espaço livre, que irá se dissolver no produto e manter a oxidação. Caso a embalagem seja impermeável ou de alta barreira aos gases, apenas o residual de oxigênio no espaço livre e o dissolvido no produto irão promover a oxidação (OLIVEIRA, 2006).

O uso do nitrogênio durante as etapas de produção e estocagem tem efeito sobre as taxas de oxidação, já que permite remover o oxigênio dissolvido no produto e aquele presente no espaço livre dos tanques e das embalagens. A adição de nitrogênio no óleo após o envase, na forma gasosa ou líquida, inertiza o espaço livre da embalagem antes de seu fechamento (ARRUDA, 2003).

O vidro, como embalagem, apresenta características que o distingue perante os demais materiais: impermeabilidade aos gases, vapor de água e aromas, relativamente inerte aos produtos e o fato de ser reciclável, o que permite sua reutilização. Outras vantagens que encontramos ao acondicionar determinado produto em vidro são: versatilidade de formatos e cores à embalagem final e a destacável apresentação visual que confere ao produto. No entanto, vidros transparentes e translúcidos apresentam limitações de barreira à radiação e proteção do alimento contra a foto-oxidação (FARIA, 2004).

As latas de folha-de-flandres foram usadas por um longo tempo para o acondicionamento de óleo e ainda são muito promissoras devido as suas muitas vantagens. Elas oferecem proteção total contra a luz, o oxigênio, o vapor de água e micro-organismos, e são resistentes aos diversos tipos de danos mecânicos. O interior da lata é revestido com resinas que protegem a superfície do metal contra as reações de corrosão (PIERGIOVANNI & LIMBO, 2010).

Assim, conhecendo os fatores que promovem a oxidação lipídica e as condições de armazenamento e estocagem comumente usadas, este projeto tem como objetivo avaliar a estabilidade do azeite de oliva extra virgem em garrafas de vidro transparente e lata de folha-de-flandres submetidas a duas condições de estocagem (com incidência de luz e no escuro). Também foi avaliado o uso do nitrogênio como gás inerte com o intuito de inibir ou retardar a oxidação lipídica e as alterações de compostos de importância nutricional e organoléptica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras de azeite

Os ensaios experimentais foram conduzidos com azeite de oliva extra virgem português de mesmo lote e fabricação datada em 05/2009, originalmente envasado em garrafas de vidro transparente de 250mL com tampa de rosca de polipropileno (PP).

### 2.2 Preparo das amostras

O azeite foi fracionado manualmente nas seguintes embalagens (Figura 13):

- Garrafa de vidro transparente com volume total de 220 mL;
- Lata de folha-de-flandres cilíndrica de 3 peças com volume total de 350 mL.

As embalagens de vidro foram envasadas até o volume de 200 mL, deixando aproximadamente 9% de espaço livre e posteriormente fechadas com tampa de folha-de-flandres do tipo “garra-torção” com vedante de plastisol.



**Figura 13.** Embalagens usadas no experimento.

O azeite que não foi inertizado com o gás nitrogênio foi mantido na sua embalagem original de vidro transparente com volume total de 265 mL, envasada com 250 mL de azeite e com aproximadamente 5% de espaço livre.

Um lote de embalagens de vidro foi inertizado com a injeção de gás nitrogênio de alta pureza. A inertização foi feita manualmente, através de uma agulha que perfurava a tampa e injetava o gás até o fundo da embalagem. Um segundo furo foi feito para a saída do oxigênio presente no interior da embalagem, posteriormente arrastado pelo gás inerte. O nitrogênio foi injetado até que a concentração de oxigênio do espaço livre (headspace) da embalagem fosse inferior a 5%, medida por meio do analisador de gás PacCheck™ 650 Dual Head Space Analyser (Modern Company Inc. – MOCON). Os furos na tampa foram vedados com um septo adesivo, conforme Figura 14.



**Figura 14.** Injeção de nitrogênio na embalagem.

### 2.3 Estocagem

As amostras de azeite acondicionadas nas embalagens de vidro foram divididas em dois grupos e estocadas nos diferentes ambientes:

- Em caixas de papelão sob abrigo de luz ( $52 \pm 8$  %UR /  $25 \pm 2$  °C).
- Na presença de luz por 12 horas/dia ( $47 \pm 10$  %UR /  $26 \pm 2$  °C).

As amostras avaliadas no ensaio de foto-oxidação foram armazenadas em uma câmara de luz de 200x100x100 cm adaptada com 2 lâmpadas fluorescentes (Osram FO 840 Lumilux Cool/White) com potência de 32 W, cuja intensidade luminosa foi de  $2900 \pm 495$  lux, a uma distância de 60 cm, conforme Figura 15. Estas amostras foram rearranjadas semanalmente para garantir a uniformidade da exposição à luz.

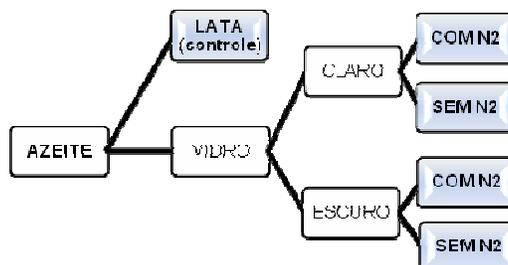


**Figura 15.** Estocagem das amostras nas câmara de luz e em caixas.

O azeite envasado nas latas foi estocado apenas no escuro.

As amostras foram armazenadas durante 6 meses. A temperatura ambiente e a umidade relativa foram monitoradas durante todo o período por um termo-higrômetro.

Assim, foram criados 5 diferentes tratamentos, como pode ser mostrado na Figura 16.



**Figura 16.** Tratamentos usados no processo.

## 2.4 Métodos

### 2.4.1 Análises Físico-Químicas

As seguintes análises físico-químicas foram realizadas seguindo as metodologias descritas a seguir:

- **Composição em ácidos graxos:** realizada em cromatógrafo a gás com coluna capilar – CGC AGILENT 6850 SERIES GC SYSTEM, após esterificação preparada de acordo com o método proposto por Hartman & Lago (1973). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados de acordo com as normas da *American Oil Chemists' Society* (AOCS, 2004), método Ce 2-66 em coluna capilar DB – 23 AGILENT (50% cyanopropyl-methylpolysiloxano), dimensões 60m,  $\phi$  int: 0,25 mm, 0,25  $\mu$ m filme. Temperatura do forno de 110°C-5min, 110°C-215°C (5°C/min), 215°C- 24min; temperatura do detector: 280°C; temperatura do injetor 250°C; gás de arraste: Hélio; Razão Split 1:50; volume injetado: 1,0 $\mu$ L. A composição qualitativa foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os dos respectivos padrões de ácidos graxos.
- **Ácidos graxos livres:** realizada de acordo com o método Ca 5a-40 (AOCS, 2004). Os resultados do teor de ácidos graxos livres foram expressos em porcentagem de ácido oléico.
- **Índice de peróxido:** realizada de acordo com o método Cd 8b-90 (AOCS, 2004). Os resultados do índice de peróxido foram expressos em miliequivalentes de oxigênio ativo por quilograma de azeite (mEq O<sub>2</sub>/ kg).
- **Índice de iodo:** calculado a partir da composição em ácidos graxos segundo o método Cd 1c-85 (AOCS, 2004).
- **Índice de saponificação:** calculado a partir da composição em ácidos graxos segundo o método Cd 3a-94 (AOCS, 2004).
- **Matéria insaponificável:** realizada pelo método Ca 6a-40 (AOCS, 2004).
- **Coefficiente de Extinção Específica:** realizada de acordo com o método Ch 5-91 (AOCS, 2004), em espectrofotômetro UV/Visível Beckman,

modelo DU-70, com leituras de absorvância conduzidas em comprimentos de onda de 232 e 270nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de espessura e tendo-se o isooctano como referêcia.

- **Umidade:** realizada segundo o método Ca 2e-84 (AOCS, 2004) por titulação com reagente Karl Fischer por meio do equipamento automático marca Metrohm, modelo 701 KF Titrimo.
- **Clorofila:** realizada segundo o método Ch 4-91 (AOCS, 2004), em espectrofotômetro PerkinElmer UV/Visível (Lambda 20) e estimado pela equação:  $C \text{ (mg de Pheo a/kg de óleo)} = 345,3 (A_{670} - 0,5A_{630} - 0,5A_{710}) / L$ , onde  $A_\lambda$  é a absorvância do óleo no respectivo comprimento de onda e L é a espessura da cubeta em mm.
- **$\alpha$ -tocoferol:** realizada de acordo com o método Ce 8-89 (AOCS, 2004) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando cromatógrafo Perkin Elmer SERIES 200, com sistema gradiente em fase móvel n-hexano/ 2-propanol (99:1 v/v), em coluna analítica Hibar RT 250 x 4 mm Li Chrosorb Si 60,5 mm, fluxo médio de 1,0 mL/min, com detector UV/Visível PerkinElmer Series 200a de comprimento de onda de 292 nm.
- **Análise colorimétrica de compostos fenólicos totais:** adaptada do método proposto por GUTFINGER (1981). Os compostos fenólicos foram medidos na fração polar obtida de 10 g de azeite dissolvido em hexano e extraída com 3 lavagens usando uma solução de metanol:água (60:40 v/v). O procedimento consistiu na reação de uma alíquota de 0,5 mL do extrato com 0,5mL do reagente de Folin-Ciocalteu adicionado de 1,0 mL da solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  durante 1 hora no escuro. Posteriormente, foi feita a leitura em espectrofotômetro de absorção ultravioleta na região do visível (760nm). O resultado foi expresso em equivalente de ácido gálico e a curva padrão foi calculada usando concentrações de 10-100 $\mu\text{g/mL}$ .
- **Análise instrumental de cor:** realizada através do espectrofotômetro de cor Hunterlab modelo Colorquest II, ângulo de visão 10°, iluminante D65, usando o sistema de cor CIE L\*C\*h para transmitância total de cada amostra em cubeta de vidro opticamente limpo com 10 mm de caminho óptico.

- **Cor Lovibond:** determinada pelo equipamento automático Lovibond PFX 995 Tintometer, usando cubeta de vidro óptico de 5<sup>1/4</sup>" , segundo o método Cc 13j-97 (AOCS, 2004).
- **Concentração de oxigênio no espaço livre:** com o uso do analisador de gás PacCheck™ 650 Dual Head Space Analyser (Modern Company Inc. – MOCON).

## 2.5 Análise Estatística

Para a análise estatística foi usado o Delineamento em Blocos Casualizados (DBC) com no mínimo 3 repetições. Os dados foram analisados pela Análise de Variância com teste F a 5% de probabilidade, sendo as médias comparadas com teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os cálculos foram realizados através do programa estatístico Assistat 7.5 beta.

## 2.6 Procedimento Experimental

A amostra inicial de azeite foi caracterizada de acordo com os parâmetros recomendados para azeite extra virgem pela legislação brasileira vigente (resoluções 482/2000 e 270/2005 da ANVISA). Para a caracterização foram feitas todas as análises físico-químicas em triplicata.

Após o fracionamento e envase nos diferentes sistemas de embalagem e estocagem, a qualidade do azeite foi avaliada mensalmente quanto às análises de índice de peróxido, ácidos graxos livres, coeficiente de extinção específica, clorofila e cor ( $L^*C^*h$ ); e trimestralmente pelas análises de  $\alpha$ -tocoferol, compostos fenólicos totais, cor Lovibond e umidade Karl Fischer.

A cada mês foram analisadas 3 embalagens por tratamento, sendo que as análises de cada embalagem foram realizadas em duplicata, somando 6 resultados de análise por tratamento.

A cada abertura das embalagens para as análises, primeiramente foi feita a medida de concentração de oxigênio no espaço livre.

O fluxograma do procedimento experimental encontra-se na Figura 17.

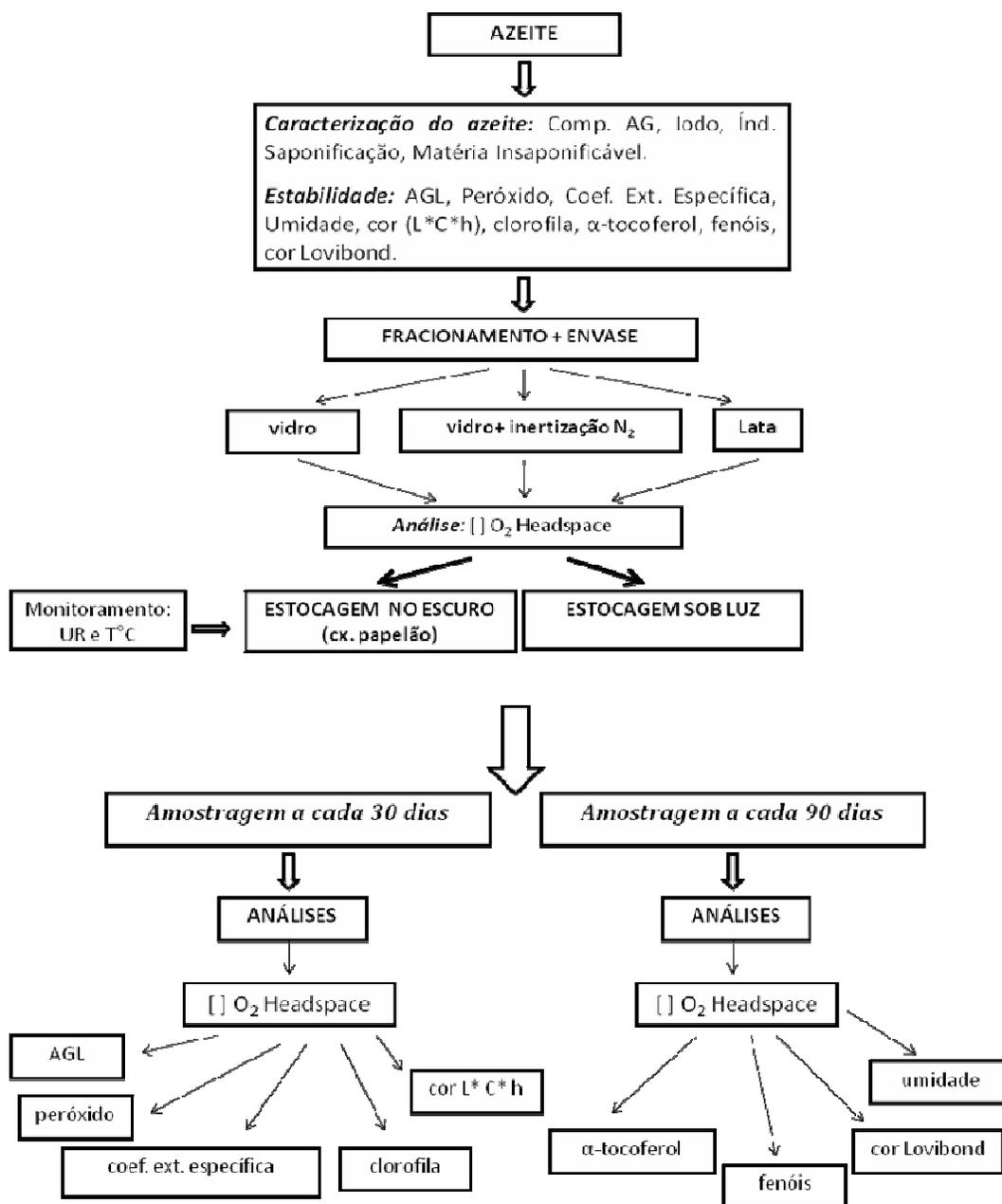


Figura 17. Fluxograma representativo do procedimento experimental.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização do azeite extra virgem

Na caracterização da amostra inicial de azeite, os resultados do teor de ácidos graxos livres, índice de peróxidos, umidade, índice de saponificação, índice de iodo, extinção específica a 230 e 270 nm, matéria insaponificável e composição em ácidos graxos apresentados na Tabela 15 estão de acordo com os critérios de classificação de azeite de oliva extra virgem das resoluções 482/2000 e 270/2005 da ANVISA, com o Regulamento da Comunidade Européia 702/2007 e com o CODEX *Alimentarius* 33/1981 (revisado em 2003).

Os dienos e trienes conjugados são formados no processo de auto-oxidação dos hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados e seus produtos de fragmentação. A análise de K232 indica a formação de dienos conjugados que são produtos primários de oxidação. Nota-se que o parâmetro K232 está no limiar do valor característico para azeite extra virgem (<2,5) segundo as normas citadas acima, o que significa que o azeite usado no experimento pode ter sofrido efeitos da auto-oxidação durante o período em que ficou estocado antes do início do experimento.

Conforme apresentado na Tabela 16, o resultado das análises de compostos fenólicos, indicou um valor abaixo do que é comumente encontrado na literatura. Isso pode estar relacionado desde à origem e processo de extração do azeite, até devido ao tempo de armazenamento desde a fabricação até o início das análises. Também deve-se levar em consideração a eficiência do método de análise, que por ter sido adaptado e apresentar várias etapas, pode ter originado desvios nos resultados.

**Tabela 16.** Resultados das análises de caracterização da amostra inicial de azeite de oliva extra virgem e limites dos parâmetros considerados pela legislação.

<b>Parâmetro/unidade</b>	<b>Resultados</b>	<b>Limites*</b>
Ácidos graxos livres (% ác. oléico)	0,27	máximo 0,8
Umidade (%)	0,07	máximo 0,2
Índice de peróxido (mequiv O <sub>2</sub> /kg)	10,08	≤20
Índice de saponificação (mg KOH/g)	191,47	184 – 196
Índice de iodo (g de I <sub>2</sub> /100g)	83,87	75-94
Cor L*C*h	82,24 / 109,16 / 87,30	-
Cor Lovibond (cell 51/4 ") R/Y/B/N <sup>1</sup>	3,10 / 70,62 / 0,62 / 0,00	-
Extinção específica 232nm	2,49	≤2,50
Extinção específica 270nm	0,17	≤0,20
Matéria insaponificável (%)	0,93	1,5
Clorofila (mg feofitina a/kg)	13,43	-
α-tocoferol (mg/kg)	184,54	-
Compostos fenólicos totais (mg ác.gálico/kg)	30,52	-
Composição ácidos graxos (%)		
Palmítico (C16:0)	8,84	7,5 - 20,0
Palmitoléico (C16:1)	0,50	0,3 - 3,5
Esteárico (C18:0)	3,47	0,5 - 5,0
Oléico (C18:1)	80,27	55,0 - 83,0
Linoléico (C18:2)	5,25	3,5 - 21,0
Linolênico (C18:3)	0,56	máximo 0,9
Araquídico (C20:0)	0,46	máximo 0,6
Outros	0,65	-

<sup>1</sup>R/Y/B/N: vermelho/amarelo/azul/neutro, respectivamente.

\*FONTE: resoluções 482/2000 e 270/2005 da ANVISA.

Segundo Tsimidou (1998), uma ampla faixa de teor de compostos fenólicos tem sido relatada (50-1000 mg/kg), mas os valores são geralmente entre 100 e 300 mg/kg cultivar. O sistema de extração e as condições de

processamento, embalagem, distribuição e armazenamento são fatores críticos que afetam o conteúdo final de compostos fenólicos no azeite. Os compostos fenólicos na forma livre são encontrados principalmente em azeites armazenados, enquanto que os os azeites frescos contêm formas mais complexas de agliconas.

Em estudo realizado por Gimeno e colaboradores (2002) de 60 amostras de azeites de oliva extra virgem obtidos por dois diferentes tipos de extração, a menor concentração de compostos fenólicos totais encontrada foi de  $42,07 \pm 7,30$  mg/kg em uma das amostras.

De acordo com Boskou, Blekas e Tsimidou (2006), a forma  $\alpha$ -tocoferol corresponde a 90% do total de tocoferóis presentes no azeite de oliva. O teor de  $\alpha$ -tocoferol encontrado na amostra inicial deste experimento está de acordo com a faixa de 98 a 370 mg/kg obtida de 90 amostras de azeites analisadas por Psomiadou e colaboradores (2000).

Resultado semelhantes também foram relatados por Gimeno e colaboradores (2002) que analisaram amostras de azeites de oliva extra virgem obtidos por dois diferentes métodos de extração e encontraram valores de 185 a 212 mg/kg de  $\alpha$ -tocoferol.

Quanto ao teor de clorofila, segundo Psomiadou & Tsimidou (2001), o azeite de oliva virgem contém até 40 mg/kg, expresso em feofitina *a*. Os mesmos autores, ao analisarem quatro diferentes amostras de azeite extra virgem gregos, encontraram valores que variaram de 9,1 a 23 mg feofitina *a*/kg. O teor de clorofila de 13,43 mg feofitina *a*/mg do azeite usado neste experimento está de acordo com os valores relatados pelos autores.

### 3.2 Estabilidade do azeite extra virgem

Durante o experimento 11% das amostras (n=4) apresentaram concentração de oxigênio no espaço livre da embalagem maior que 5%. Uma vez que não havia um equipamento adequado para a injeção do gás inerte, a hermeticidade destas embalagens não foi garantida, pois as tampas foram violadas e vedadas com um septo, o que pode ter permitido o escape do nitrogênio e/ou a entrada do oxigênio. Além disso, como as amostras foram envasadas manualmente, o nível de oxigênio dissolvido no azeite foi maior e a quantidade de nitrogênio injetado não foi suficiente para substituir o oxigênio residual.

De acordo com as resoluções 482/2000 e 270/2005 da ANVISA, com o Regulamento da Comunidade Européia 702/2007 e com o CODEX *Alimentarius* 33/1981(revisado em 2003) o azeite classificado como extra virgem não deve ultrapassar 0,8 g/100 g de ácidos graxos livres (expresso em ácido oléico).

Na Tabela 17, observamos que o teor de ácidos graxos livres em todos os tratamentos está de acordo com o valor considerado característico para azeite de oliva extra virgem.

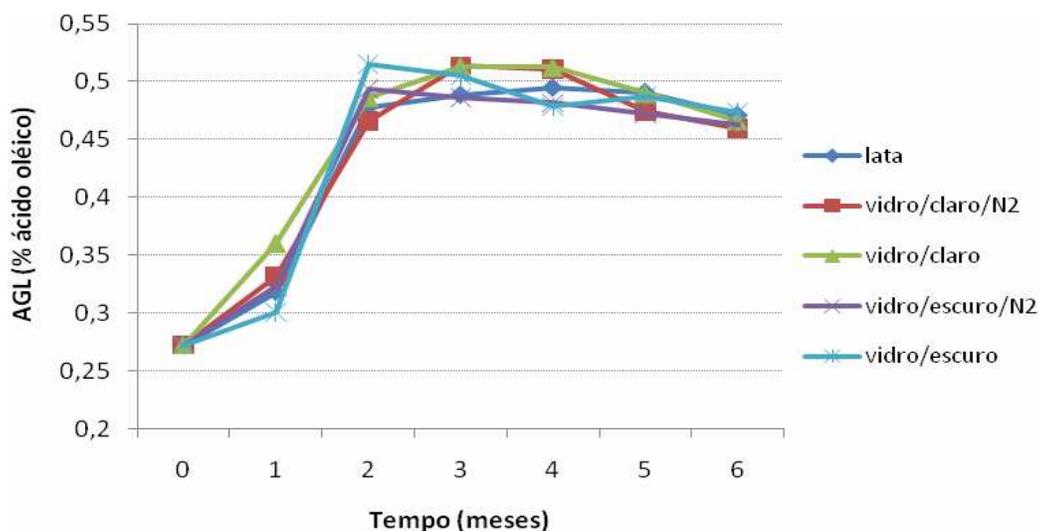
**Tabela 17.** Análise do teor de ácidos graxos livres das amostras de azeite de oliva extra virgem em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

AGL (% ác. oléico)	Vidro				Lata	<sup>2</sup> Média
	Estocagem sob luz		Estocagem no escuro			
	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>		
Tempo (meses)						
0	0,27 d A	0,27 e A	0,27 e A	0,27 e A	0,27 d A	0,27 f
1	0,33 c B	0,36 d A	0,32 d B	0,30 d C	0,32 c BC	0,33 e
2	0,47 b C	0,49 b B	0,49 a B	0,51 a A	0,48 ab BC	0,49 bc
3	0,51 a A	0,51 a A	0,49 ab C	0,51 ab AB	0,49 ab BC	0,50 a
4	0,51 a A	0,51 a A	0,48 abc B	0,48 c B	0,49 a AB	0,50 ab
5	0,47 b AB	0,49 b AB	0,47 bc B	0,49 bc AB	0,49 a A	0,48 c
6	0,46 b A	0,47 c A	0,46 c A	0,47 c A	0,47 b A	0,47 d
<sup>1</sup> Média	0,43 B	0,44 A	0,43 B	0,43 B	0,43 B	

\*As médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e mesmo tipo de tratamento e por mesma letra maiúscula na linha e mesmo tempo de estocagem, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup>DMS: 0,00676 / <sup>2</sup>DMS: 0,00865

É possível observar que, apesar dos resultados diferirem estatisticamente, esta diferença não representa grandes alterações em relação à qualidade e estabilidade do azeite extra virgem. Pode-se considerar que o teor de ácidos graxos livres apresentou um ligeiro aumento em relação ao tempo. Porém, não foram observadas alterações no teor de ácidos graxos livres devido à diferença do tipo de estocagem, tipo de embalagem e inertização com nitrogênio. O comportamento dos tratamentos em relação ao teor de ácidos graxos livres pode ser melhor observado na Figura 18.



**Figura 18.** Comportamento das amostras de azeite de oliva extra virgem quanto ao teor de ácidos graxos livres em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

Os resultados obtidos estão de acordo com os apresentados por Caponio e colaboradores (2005) que analisaram azeites de oliva extra virgem em embalagens de vidro na ausência e em presença de luz. As amostras não apresentaram alterações significativas no teor de ácidos graxos livres até 12 meses de estocagem.

Pristouri e colaboradores (2010) analisaram a estabilidade de azeite extra virgem em embalagens PET e vidro transparentes armazenadas no escuro e verificaram que os azeites mantiveram por 12 meses dentro do limite de 8% de ácidos graxos livres.

Desta forma, é provável que o período de 6 meses de análise não seja suficiente para apresentar mudanças significativas de qualidade no azeite em relação ao teor de ácidos graxos livres. Além disso, a acidez não está diretamente relacionada à ação da foto e auto-oxidação lipídica.

Boskou, Blekas e Tsimidou (2006) afirmam que o aumento da acidez livre é uma consequência, principalmente, da atividade enzimática causada por avarias na azeitona. Alba, Izquierdo e Gutiérrez (1997) apontam outros diversos fatores que podem afetar o grau de acidez: cultivo, variedade da

azeitona, tipo de colheita, mescla de azeitonas (solo e árvores), tipo e tempo de armazenamento das azeitonas, condição de elaboração, entre outros.

Méndez e Falqué (2005) analisaram 4 amostras de azeite de oliva extra virgem nas embalagens de PET e vidro transparentes, PET opaco, lata e Tetra Brik® armazenadas sob luz ambiente por 12 horas/dia. De acordo com os autores, todos os tratamentos apresentaram teores de ácidos graxos livres menores que 5% durante os 6 meses de estocagem e o teor de umidade se manteve baixo e sem alterações significativas.

Uma vez que a rancidez hidrolítica ocorre na presença de umidade, o baixo teor de umidade observado nos tratamentos durante o experimento pode ter contribuído para que o teor de ácidos graxos livres do azeite sofresse pouca variação durante o período de estocagem.

De acordo com as resoluções 482/2000 da ANVISA e com os padrões do CODEX *Alimentarius* 33/1981(revisado em 2003) o azeite classificado como extra virgem não deve ultrapassar 0,2% de umidade e substâncias voláteis. Como apresentado na Tabela 18, durante todo o período de estocagem, o conteúdo de umidade não ultrapassou este limite.

**Tabela 18.** Análise de umidade das amostras de azeite de oliva extra virgem em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

Umidade (%)	Estocagem sob luz		Estocagem no escuro		Lata
	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	
Tempo (meses)					
0	0,070	0,070	0,070	0,070	0,070
3	0,045	0,070	0,053	0,077	0,078
6	0,031	0,066	0,073	0,090	0,186
<b>MÉDIA</b>	<b>0,049</b>	<b>0,069</b>	<b>0,065</b>	<b>0,079</b>	<b>0,111</b>
<b>DESV. PAD.</b>	0,0197	0,0021	0,0110	0,0100	0,0647
<b>CV %</b>	40,56	3,08	16,91	12,70	58,06

O índice de peróxido característico para azeite de oliva extra virgem é  $\leq 20$  meqO<sub>2</sub>/kg segundo as resoluções 482/2000 e 270/2005 da ANVISA, o Regulamento da Comunidade Européia 702/2007 e o CODEX *Alimentarius* 33/1981(revisado em 2003). Durante os 6 meses de armazenamento, o índice de peróxido das amostras não ultrapassou este limite, como pode ser observado na Tabela 19.

Neste experimento, o índice de peróxido não apresentou diferença em relação à inertização com nitrogênio e ao ambiente de estocagem. Em relação ao tempo, as amostras em garrafas de vidro apresentaram um aumento do índice de peróxido mais pronunciado nos primeiros 30 dias, seguindo por alterações menores até o fim do armazenamento. Ao observar a média geral de cada tratamento, verifica-se que a lata apresentou o menor valor e um aumento mais lento e gradual do índice de peróxido no decorrer do tempo.

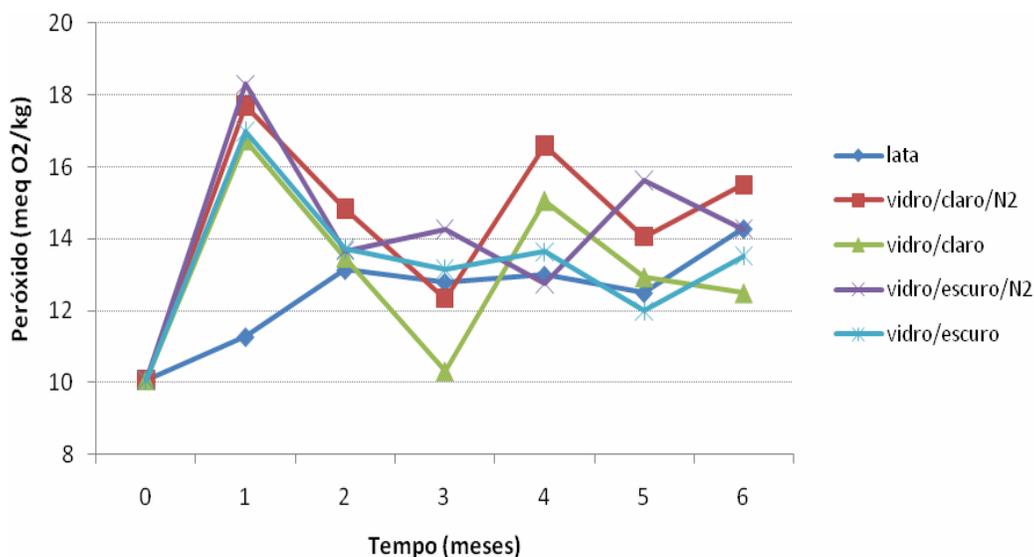
O comportamento do índice de peróxidos nos tratamentos também pode ser visto na Figura 19.

**Tabela 19.** Índice de peróxido das amostras de azeite de oliva extra virgem em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

Peróxido (mequiv O <sub>2</sub> /kg)	Vidro				Lata	<sup>2</sup> Média
	Estocagem sob luz		Estocagem no escuro			
Tempo (meses)	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>		
0	10,08 e A	10,08 d A	10,08 d A	10,08 c A	10,08 c A	10,08 d
1	17,70 a A	16,74 a A	18,29 a A	16,99 a A	11,28 bc B	16,20 a
2	14,84 bc A	13,48 bc A	13,66 bc A	13,72 b A	13,14 ab A	13,77 b
3	12,34 d A	10,32 d B	14,26 bc A	13,15 b A	12,80 ab A	12,57 c
4	16,59 ab A	15,06 ab AB	12,76 c C	13,64 b BC	13,00 ab A	14,21 b
5	14,06 cd AB	12,93 bc BC	15,63 b A	11,99 bc C	12,50 ab BC	13,42 bc
6	15,50 bc A	12,49 c B	14,27 bc AB	13,52 b AB	14,30 a AB	14,01 b
<sup>1</sup> Média	14,44 A	13,01 BC	14,14 A	13,30 B	12,44 C	

\*As médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e mesmo tipo de tratamento e por mesma letra maiúscula na linha e mesmo tempo de estocagem, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup>DMS: 0,75637 / <sup>2</sup>DMS: 0,96758



**Figura 19.** Comportamento das amostras de azeite de oliva extra virgem quanto ao índice de peróxido em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

A reação de oxidação desencadeada pelo oxigênio singlete tem baixa energia de ativação (0-6 kcal / mol). A luz é muito importante para que esta reação ocorra, sendo que a radiação de menor comprimento de onda tem efeitos mais prejudiciais do que comprimentos de onda mais longos. Uma vez que a oxidação ocorre na presença de luz, as garrafas transparentes podem aumentar a oxidação do óleo (CHOE; LEE; MIN, 2005).

Os resultados obtidos estão de acordo com os apresentados por Pristouri e colaboradores (2010) ao analisarem a estabilidade de azeite extra virgem em embalagens PET e vidro transparentes armazenadas no escuro. As amostras armazenadas nas embalagens de vidro mantiveram durante 12 meses o limite de 18 meq/kg e as embalagens PET mantiveram este limite até o 6º mês.

Diante disso, uma vez que não foram notadas grandes diferenças entre as amostras estocadas no claro e no escuro, e sabendo que o azeite extra virgem é um óleo estável por manter suas propriedades antioxidantes, é provável que o período de 6 meses não seja suficiente para observar grandes

mudanças no índice de peróxido que pudessem ser significativas para os padrões de qualidade do azeite de oliva extra virgem.

A avaliação do grau de oxidação do óleo de oliva pode ser realizada também por meio da análise de extinção específica da amostra de óleo diluída em um solvente adequado. A absorvância específica, convencionalmente indicada como K, é medida na região do UV em comprimentos de onda que correspondem ao máximo de absorção de dienos e trienos conjugados em cerca de 232 e 270 nm, respectivamente. Os dienos e trienos conjugados são formados no processo de auto-oxidação dos hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados e seus produtos de fragmentação (ANGEROSA *et al.*, 2006).

Segundo a resolução 482/2000 da ANVISA, o Regulamento da Comunidade Européia 702/2007 e o CODEX *Alimentarius* 33/1981 (revisado em 2003) o valor de K<sub>232</sub> deve ser  $\leq 2,5$  para azeite de oliva extra virgem. Nota-se na Tabela 21 que desde o tempo zero a amostra já apresentou um valor próximo ao limiar da legislação. O alto valor de K<sub>232</sub> observado no azeite no início do experimento pode estar relacionado à oxidação do azeite durante o tempo em que ficou estocado desde sua produção até o início das análises.

De acordo com a análise de variância do K<sub>232</sub> apresentada na Tabela 20, os resultados submetidos ao teste F somente foram significativos ( $p < 0,05$ ) em relação aos tratamentos e no decorrer do tempo. No entanto, a interação tratamento X tempo não foi significativa ( $p > 0,05$ ), o que indica que os tratamentos se comportaram de forma semelhante. Esta afirmação pode ser confirmada na interpretação das Tabelas 21 e 22 de diferenças de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, em que se verifica que o valor de K<sub>232</sub> não sofreu alterações significativas para os diferentes tratamentos no decorrer do tempo.

**Tabela 20.** Análise de variância de K232 dos cinco tratamentos de amostras de azeite de oliva extra virgem analisadas durante 6 meses de estocagem.

<b>Quadro de Análise</b>						
<b>Fonte Variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Fcrit</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Tratamentos</b>	0,85223	4	0,21306	3,6014	3,6225 **	0,0097
<b>Blocos (tempo)</b>	1,47517	6	0,24586	3,0743	4,1802 **	0,0012
<b>Trat x Bloco</b>	1,53012	24	0,06375	1,6743	1,084 ns	0,3836
<b>Resíduo</b>	4,11711	70	0,05882			
<b>Total</b>	7,97464	104				

\*\*Significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ) pelo teste F.

\*Significativo a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) pelo teste F.

ns: não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabela 21.** Média da extinção específica a 232 nm em relação ao tempo de estocagem.

<b>Tempo (mês)</b>	<b>K232 (média dos tratamentos)</b>
0	2,49 a
1	2,33 ab
2	2,19 b
3	2,23 ab
4	2,14 b
5	2,11 b
6	2,22 ab

\*As médias seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

\*\*DMS: 0,26863

**Tabela 22.** Extinção específica a 232 nm durante 6 meses de estocagem para cada tipo de tratamento.

<b>Vidro</b>				<b>Lata</b>
<b>Estocagem sob luz</b>		<b>Estocagem no escuro</b>		
<b>com N<sub>2</sub></b>	<b>sem N<sub>2</sub></b>	<b>com N<sub>2</sub></b>	<b>sem N<sub>2</sub></b>	
2,21 ab	2,14 b	2,41 a	2,21 ab	2,26 ab

\*As médias seguidas por mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

\*\*DMS: 0,20972

O acompanhamento das alterações oxidativas nos óleos é baseado em dois parâmetros: índice de peróxido e absorbância a 232 nm. A auto-oxidação do azeite virgem durante o armazenamento é um processo extremamente lento, se o produto apresentar baixos valores iniciais peróxido/K232 e altos teores de compostos fenólicos e  $\alpha$ -tocoferol. A retirada do ar do azeite de oliva envasado é um pré-requisito para o controle da auto-oxidação (ANGEROSA *et al.*, 2006).

A absorção de UV é um método apropriado para monitorar a evolução da oxidação lipídica, em particular nos casos em que os peróxidos formados na oxidação são muito instáveis, assim, a formação de dienos conjugados passa a ser um método mais confiável (POKORNY; SCHMIDT; PARKÁNYIOVÁ, 2005).

A análise de K270 mede os produtos secundários da oxidação lipídica, como os trienos conjugados. De acordo com o Regulamento da Comunidade Européia 702/2007 e com o CODEX *Alimentarius* 33/1981 (revisado em 2003) o valor de K270 deve ser  $\leq 0,22$  para azeite de oliva extra virgem. Segundo a resolução 482/2000 da ANVISA, o valor aceitável deve ser  $\leq 0,20$ .

Observa-se na Tabela 23 que a maior influência nas diferenças dos valores de K270 foi do tipo de estocagem. Em relação ao tempo, os tratamentos tiveram os valores ligeiramente aumentados no primeiro mês, porém, permaneceram estáveis no decorrer do período de estocagem.

É evidente a diferença entre os tratamentos expostos à radiação luminosa que apresentaram valores maiores de K270 que os armazenados no escuro e em latas. De acordo com a resolução da ANVISA, os tratamentos expostos à luz já estariam fora dos padrões propostos para azeite de oliva extra virgem a partir do segundo mês de estocagem (valores  $> 0,20$ ).

É possível observar também na Tabela 23 que os tratamentos que foram inertizados não diferiram daqueles que não receberam o nitrogênio.

**Tabela 23.** Extinção específica a 270 nm das amostras de azeite de oliva extra virgem em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

Tempo (meses)	Vidro				Lata	<sup>2</sup> Média
	Estocagem sob luz		Estocagem no escuro			
	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>		
0	0,17 b A	0,17 b A	0,17 ab A	0,17 b A	0,17 ab A	0,17 c
1	0,25 a A	0,25 a A	0,22 a AB	0,26 a A	0,19 ab B	0,23 a
2	0,24 a AB	0,25 a A	0,19 ab BC	0,18 b C	0,16 ab C	0,20 b
3	0,26 a A	0,25 a AB	0,16 b C	0,17 b C	0,20 a BC	0,20 b
4	0,26 a A	0,24 a A	0,18 ab B	0,17 b B	0,15 b B	0,20 b
5	0,26 a A	0,24 a A	0,17 ab B	0,17 b B	0,18 ab B	0,20 b
6	0,26 a A	0,26 a A	0,20 ab B	0,18 b B	0,19 ab B	0,22 ab
<sup>1</sup> Média	0,24 A	0,24 A	0,18 B	0,18 B	0,17B	

\*As médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e mesmo tipo de tratamento e por mesma letra maiúscula na linha e mesmo tempo de estocagem, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup>DMS: 0,01862 / <sup>2</sup>DMS: 0,02386

O alto valor de K270 observado no azeite no início do experimento pode estar relacionado à oxidação do azeite durante o tempo em ficou estocado desde sua produção até o início das análises.

Os resultados obtidos no experimento estão de acordo com os apresentados por Pristouri e colaboradores (2010) ao analisarem a estabilidade de azeite extra virgem armazenados no escuro. As amostras acondicionadas em embalagens de vidro mantiveram durante 9 meses os valores de K270 menores que 0,22.

No estudo de Méndez e Falqué (2005) que analisaram 4 amostras de azeite de oliva extra virgem nas embalagens PET e vidro transparentes, PET opaco, lata e Tetra Brik<sup>®</sup> armazenadas sob luz ambiente por 12 horas/dia, as amostras acondicionadas em PET e vidro transparente apresentaram um maior crescimento de K270 em relação aos demais tratamento no decorrer dos 6 meses de estocagem.

De acordo com a análise de variância apresentada na Tabela 24, observa-se que os resultados do teor de compostos fenólicos somente foram significativos a 95% de confiança quando avaliados em relação ao tempo de estocagem.

Para a interação entre os tratamentos o resultado não foi significativo. Desta forma, o teor de compostos fenólicos totais não sofreu interferência do tipo de embalagem, dos diferentes ambientes de estocagem e da inertização com nitrogênio.

Na Tabela 25, é notável que o teor de compostos fenólicos totais sofreu uma queda estatisticamente significativa apenas no sexto mês de estocagem.

Os resultados obtidos estão de acordo com os apresentados por Caponio e colaboradores (2005) que analisaram azeites de oliva extra virgem em embalagens de vidro na ausência e em presença de luz. As amostras não apresentaram alterações significativas no teor de compostos fenólicos em relação aos dois diferentes ambientes de estocagem, porém observou-se que durante os 12 meses de estocagem o conteúdo de compostos fenólicos totais diminuiu.

**Tabela 24.** Análise de variância do teor de compostos fenólicos totais dos cinco tratamentos de amostras de azeite de oliva extra virgem analisadas nos meses 0, 3 e 6 de experimento.

<b>Quadro de Análise</b>						
<b>Fonte Variação</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>Fcrit</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Tratamentos</b>	6,25	4	1,56	2,58	1,28 ns	0,291
<b>Blocos (tempo)</b>	31,11	2	15,55	5,11	12,76 **	<0,001
<b>Trat x Bloco</b>	6,88	8	0,86	0,26	0,71 ns	0,6847
<b>Resíduo</b>	54,84	45	1,22			
<b>Total</b>	99,08					

\*\*Significativo a 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ) pelo teste F.

\*Significativo a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) pelo teste F.

ns: não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabela 25.** Média do teor de compostos fenólicos totais dos tratamentos em relação ao tempo de estocagem.

Tempo (mês)	Compostos fenólicos (mg ác.gálico/kg) média dos tratamentos
0	30,52 a
3	30,09 a
6	28,82 b

DMS: 0,84586

Nos resultados das análises de Méndez e Falqué (2005) para 4 amostras de azeite de oliva extra virgem nas embalagens PET e vidro transparentes, PET opaco, lata e Tetra Brik<sup>®</sup> armazenadas sob luz ambiente por 12 horas/dia, todos os tratamentos apresentaram queda do conteúdo de compostos fenólicos totais no decorrer dos 6 meses de estocagem, independentemente do tipo de embalagem em que foram acondicionadas. No entanto, as embalagens nas quais a perda de compostos fenólicos foi menor foram as Tetra Brik<sup>®</sup> e a lata, seguida pela embalagem de vidro, sendo que as amostras que apresentaram maior perda foram aquelas envasadas em PET opaco e PET transparente.

O  $\alpha$ -tocoferol, o mais importante antioxidante *in vivo*, é encontrado em níveis consideráveis em azeite de oliva extra virgem. Os tocoferóis são conhecidos por atuar como antioxidantes doando um átomo de hidrogênio para radicais peroxil durante sua propagação (PSOMIADOU; TSIMIDOU; BOSKOU, 2000).

Durante a foto-oxidação, o  $\alpha$ -tocoferol eficientemente sequestra o oxigênio singlete por um mecanismo de transferência de carga. A rápida degradação  $\alpha$ -tocoferol durante a exposição de azeite extra virgem à luz tem sido relatada (PSOMIADOU & TSIMIDOU, 1998; PIRISI *et al.*, 1998).

Analisando a Tabela 26, fica evidente que a diminuição no teor de  $\alpha$ -tocoferol está relacionada às variáveis tempo e ambiente de estocagem. As embalagens armazenadas sob luz sofreram redução significativa no teor de  $\alpha$ -tocoferol. Nas amostras que permaneceram no escuro e em latas, a diminuição

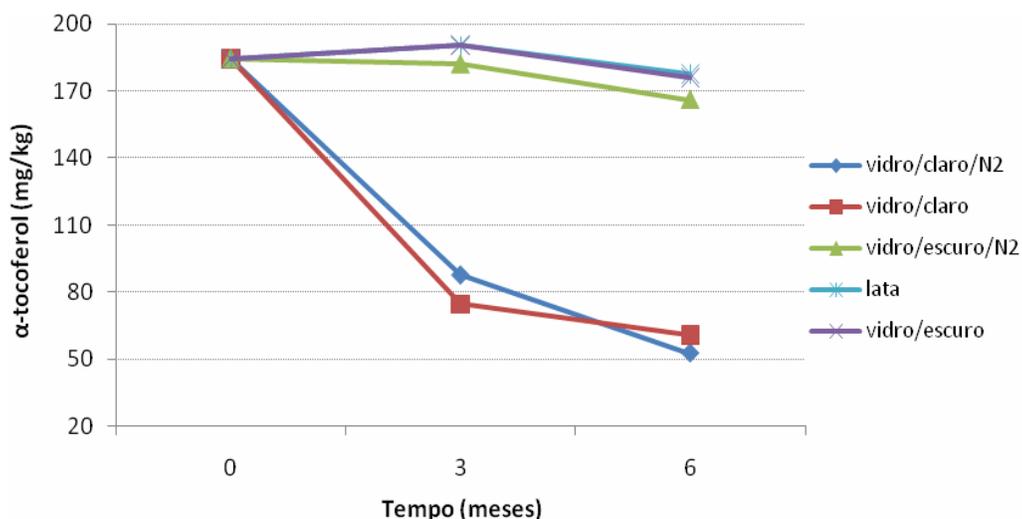
do conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol foi menos evidente. A inertização não influenciou na variação do teor de  $\alpha$ -tocoferol (Figura 20).

**Tabela 26.** Teor de  $\alpha$ -tocoferol das amostras de azeite de oliva extra virgem em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

$\alpha$ -tocoferol (mg/kg)	Vidro				Lata	<sup>2</sup> Média
	Estocagem sob luz		Estocagem no escuro			
Tempo (meses)	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>		
0	184,54 a A	184,54 a A	184,54 a A	184,54 ab A	252,77 a A	184,54 a
3	87,57 b B	74,55 b C	182,15 a A	190,41 a A	248,95 a A	145,01 b
6	52,59 c C	60,92 c C	166,08 b B	176,02 b AB	227,14 b A	126,67 c
<sup>1</sup> Média	108,23 C	106,67 C	177,59 B	183,65 ab	184,22 a	

\*As médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e mesmo tipo de tratamento e por mesma letra maiúscula na linha e mesmo tempo de estocagem, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup>DMS: 6,53859 / <sup>2</sup>DMS: 4,31723



**Figura 20.** Comportamento das amostras de azeite de oliva extra virgem quanto ao teor de  $\alpha$ -tocoferol em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

Psomiadou, Tsimidou e Boskou (2000) analisaram 5 tipos de azeites extra virgem estocados no escuro por 24 meses a 22°C em vidros transparentes e selados, sem *headspace*, envolvidos em alumínio e mantidos em caixas de papelão. Algumas amostras foram abertas periodicamente e outras somente foram abertas após 24 meses de estocagem. Eles constataram, que as amostras com níveis de peróxido baixos e mantidas fechadas durante toda estocagem, não sofreram alteração no teor de  $\alpha$ -tocoferol. Resultado oposto foi observado nas amostras abertas periodicamente, que apresentaram perdas significativas de  $\alpha$ -tocoferol. Assim, os autores chamam a atenção para a importância quanto aos cuidados durante o consumo doméstico de azeites e para o fato de que a permanência do azeite estocado por longo tempo, mesmo no escuro, não ser uma boa prática para manter seu valor nutricional.

Um segundo estudo foi realizado por Psomiadou e Tsimidou (1998) em amostras nas mesmas condições de estocagem no escuro, porém, em paralelo com um segundo grupo de amostras expostas à luz. Como resultado, foi constatado que as amostras com índices de peróxido similares apresentaram degradação do teor de  $\alpha$ -tocoferol mais rapidamente com da foto-oxidação.

A presença de clorofila nos óleos tem um significado importante no processo de auto-oxidação, podendo ser um sensibilizador de oxigênio, na presença de luz, agindo como pró-oxidante, e na ausência de luz atuar como antioxidante (ENDO; USUKI; KANEDA, 1984).

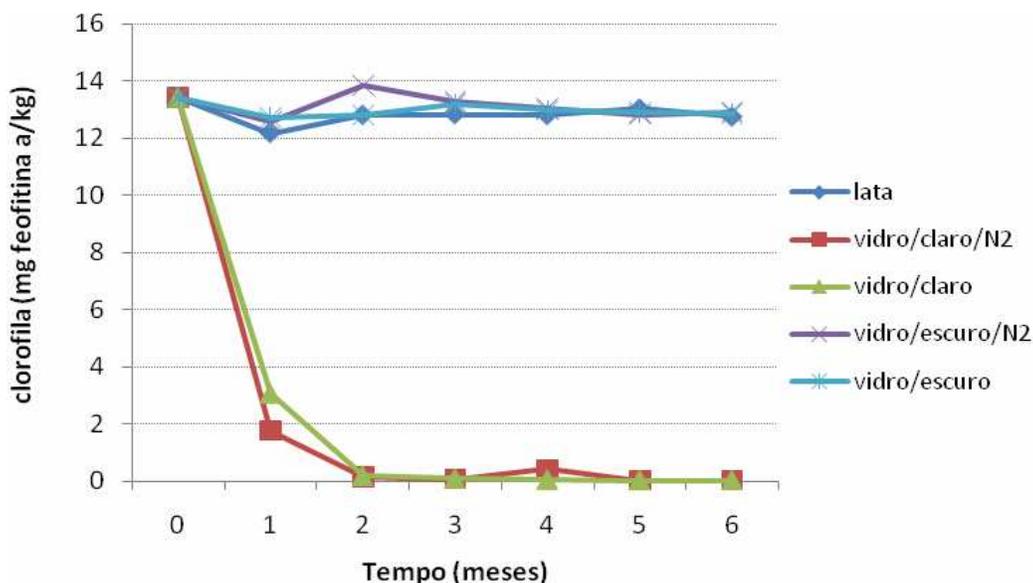
Observando a Tabela 27, nota-se que para os tratamentos estocados sob luz as variáveis que influenciaram no teor de clorofila foram o tipo de armazenamento e o tempo. O efeito da foto-oxidação é evidente. No entanto, nas amostras estocadas no escuro, o teor de clorofila permaneceu constante, assim como nas latas. O efeito de inertização não foi observado em nenhum dos tratamentos (Figura 21).

**Tabela 27.** Teor de clorofila das amostras de azeite de oliva extra virgem em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

CLOROFILA (mg feofitina a/kg)	Vidro				Lata	<sup>2</sup> Média
	Estocagem sob luz		Estocagem no escuro			
	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>		
Tempo (meses)	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>		
0	13,43 a A	13,43 a A	13,43 ab A	13,43 a A	13,43 a A	13,43 a
1	1,77 b C	3,06 b B	12,58 b A	12,72 a A	12,16 b A	8,46 b
2	0,16 c C	0,18 c C	13,84 a A	12,81 a B	12,80 ab B	7,96 c
3	0,07 c B	0,08 c B	13,27 ab A	13,18 a A	12,83 ab A	7,89 c
4	0,42 c B	0,05 c B	13,04 ab A	12,98 a A	12,80 ab A	7,86 c
5	0,03 c B	0,03 c B	12,82 b A	12,90 a A	13,03 ab A	7,76 c
6	0,03 c B	0,03 c B	12,92 ab A	12,86 a A	12,74 ab A	7,72 c
<sup>1</sup> Média	2,27 B	2,41 B	13,13 A	12,98 A	12,83 A	

\*As médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e mesmo tipo de tratamento e por mesma letra maiúscula na linha e mesmo tempo de estocagem, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup>DMS: 0,32529 / <sup>2</sup>DMS: 0,41666



**Figura 21.** Comportamento das amostras de azeite de oliva extra virgem quanto ao teor de clorofila em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

Psomiadou e Tsimidou (1998) analisaram amostras de azeite extra virgem estocadas no escuro por 24 meses a 22°C em vidros transparentes e selados, sem headspace, envolvidos em alumínio e mantidos em caixas de papelão, em paralelo com um segundo grupo de amostras expostas à luz. Como resultado, foi constatado que o efeito da luz foi destrutivo para o teor de clorofila após 3 meses de estocagem, período em que as alterações no índice de peróxido e K232 destas amostras ainda não eram significativas. Já as amostras estocadas no escuro mostraram queda de apenas 10% no decorrer dos 18 meses de estocagem.

A Tabela 28 apresenta os resultados da análise de cor pelo sistema L\*C\*h. A luminosidade (L\*) aumentou pronunciadamente nas amostras expostas à luz, com um ligeiro aumento na lata e se manteve estável nas amostras armazenadas no escuro. Esta diferenciação entre os tratamentos pode ser notada desde o segundo mês. A saturação (C\*) apresentou um ligeiro aumento no decorrer do tempo em todos os tratamentos, independentemente do ambiente de estocagem. Quanto à tonalidade (h), as amostras se apresentaram na região do amarelo (próximo ao ângulo de 90°) e sofreram pouca alteração durante o experimento. Contudo, pode-se afirmar que, pelo sistema L\*C\*h os tratamentos estocados no escuro e na lata apresentaram pequenas alterações durante o experimento. Já as amostras estocadas sob luz sofreram influência das variáveis tempo, ambiente de estocagem e tipo de embalagem.

A Tabela 29 apresenta a análise de cor na escala Lovibond (R, Y, B, N). Nota-se que a cor das amostras armazenadas no escuro sofreu pequenas alterações. As amostras estocadas sob luz apresentaram um significativo aumento nas escalas R (vermelho) e N (neutro), especialmente as embalagens PET cristal. Nestas amostras a escala Y (amarelo) diminuiu ligeiramente e zerou na escala B (azul).

As análises de cor L\*C\*h e Lovibond se correlacionam, uma vez que demonstraram que as amostras armazenadas no escuro sofreram pouca alteração, permanecendo na tonalidade amarela. Já as amostras expostas à

luz apresentaram maior mudança, com o aumento da luminosidade e permanecendo na tonalidade de amarela.

Nas análises apresentadas por Méndez e Falqué (2005) para 4 amostras de azeite de oliva extra virgem nas embalagens PET e vidro transparentes, PET opaco, lata e Tetra Brik<sup>®</sup> armazenadas sob luz ambiente por 12 horas/dia, os tratamentos acondicionados em PET e vidro transparente apresentaram tonalidade mais escura.

Criado e colaboradores (2008) analisaram as alterações nos pigmentos de azeites extra virgem acondicionados em vidro âmbar, inertizados com nitrogênio e mantidos 4°C no escuro por 24 meses. Durante o armazenamento o teor de clorofila diminuiu com o tempo, mesmo nas condições apropriadas de estocagem (na ausência de luz e oxigênio) e os pigmentos luteína e  $\beta$ -caroteno não tiveram mudanças significativas. Os autores verificaram que, diante das alterações nos perfis dos componentes responsáveis pela cor do azeite, a luminosidade ( $L^*$ ) aumentou, a intensidade de cor do azeite diminuiu e não houve mudança nas ordenadas  $a^*$  e  $b^*$ , que se mantiveram na região do verde (-) e amarelo (+), respectivamente.

**Tabela 28.** Cor L\*C\*h das amostras de azeite de oliva extra virgem em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

Cor L*C*h	Tempo (meses)	Vidro				Lata	Média
		Estocagem sob luz		Estocagem no escuro			
		com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>		
L*	0	82,23 g A	82,23 e A	82,23 ab A	82,23 a A	82,23 bc A	82,24 e
	1	85,50 f A	84,88 d B	82,29 ab C	82,11 ab C	82,09 c C	83,37 d
	2	87,45 e A	87,19 c B	82,12 b D	82,14 a D	82,40 b C	84,25 c
	3	87,88 d A	87,81 b A	81,74 c C	81,90 b C	82,35 b B	84,33 c
	4	88,16 c A	87,96 b A	82,18 b C	82,21 a C	82,43 b B	84,59 b
	5	88,47 b A	88,45 a A	82,30 ab C	82,20 a C	82,67 a B	84,82 a
	6	88,77 a A	88,40 a B	82,45 a D	82,16 a E	82,77 a C	84,91 a
	<b>Média</b>	86,92 A	86,70 B	82,18 D	82,14 D	82,42 C	
C*	0	109,19 d A	109,19 d A	109,19 d A	109,19 d A	109,19 b A	109,16 d
	1	113,61 a A	113,47 a AB	113,04 a B	113,00 ab B	111,86 a C	113,00 ab
	2	113,71 a A	113,41 a AB	112,96 ab B	113,12 a B	112,31 a C	113,10 a
	3	113,30 a A	113,34 a A	112,63 abc B	112,52 bc B	112,10 a B	112,79 b
	4	111,33 c C	112,29 b AB	112,41 bc A	112,33 c AB	111,81 a BC	112,08 c
	5	111,95 b AB	111,73 bc B	112,18 c AB	112,43 c A	111,83 a B	112,02 c
	6	111,64 bc B	111,40 c B	112,40 bc A	112,33 c A	111,88 a AB	111,93 c
	<b>Média</b>	112,10 A	112,12 A	112,11 A	112,13 A	111,58 B	
h	0	87,30 b A	87,30 b A	87,30 a A	87,30 ab A	87,30 d A	87,30 bc
	1	86,74 d C	86,70 d C	87,07 b B	86,96 d B	87,30 cd A	86,95 e
	2	87,03 c B	87,05 c B	87,10 b B	87,12 bcd B	87,54 b A	87,16 d
	3	87,23 b B	87,26 b B	86,94 b C	87,11 cd B	87,55 b A	87,22 cd
	4	87,71 a A	87,30 b C	87,08 b D	87,13 bcd CD	87,49 bc B	87,34 b
	5	87,62 a BC	87,68 a AB	87,47 a CD	87,37 a D	87,85 a A	87,60 a
	6	87,77 a A	87,55 a B	87,34 a C	87,19 abc C	87,81 a A	87,53 a
	<b>Média</b>	87,34 B	87,26 C	87,18 D	87,17 D	87,55 A	

\*As médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e mesmo tipo de tratamento e por mesma letra maiúscula na linha e mesmo tempo de estocagem, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Tabela 29.** Cor Lovibond das amostras de azeite de oliva extra virgem em cinco diferentes tratamentos durante 6 meses de estocagem.

Cor Lovibond	Tempo (meses)	Vidro				Lata	Média
		Estocagem sob luz		Estocagem no escuro			
		com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>	com N <sub>2</sub>	sem N <sub>2</sub>		
<b>R</b> (vermelho)	0	3,10 c A	3,10 c A	3,10 a A	3,10 a A	3,10 a A	3,10 c
	3	5,32 a A	5,30 a A	3,07 ab B	3,13 a B	2,95 b C	3,95 a
	6	5,20 b A	5,13 b A	3,00 b B	3,00 b B	2,72 c C	3,81 b
	<b>Média</b>	4,54 A	4,51 A	3,06 B	3,08 B	2,92 C	
<b>Y</b> (amarelo)	0	70,62 a A	70,62 a A	70,62 a A	70,62 a A	70,62 a A	70,62 a
	3	70,00 b B	70,00 b B	70,58 a A	70,68 a A	70,60 a A	70,37 b
	6	70,00 b B	70,00 b B	70,42 b A	70,37 b A	70,38 b A	70,23 c
	<b>Média</b>	70,20 B	70,20 B	70,54 A	70,56 A	70,53 A	
<b>B</b> (azul)	0	0,62 a A	0,62 a A	0,62 a A	0,62 a A	0,62 a A	0,62 a
	3	0,00 b C	0,00 b C	0,58 a A	0,68 a A	0,40 b B	0,33 b
	6	0,00 b B	0,00 b B	0,42 b A	0,37 b A	0,37 b A	0,23 c
	<b>Média</b>	0,20 C	0,20 C	0,54 A	0,56 A	0,46 B	
<b>N</b> (neutro)	0	0,00 c A	0,00 c A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 a A	0,00 c
	3	1,05 b B	1,27 b A	0,00 a C	0,00 a C	0,00 a C	0,46 b
	6	1,78 a A	1,68 a A	0,00 a B	0,00 a B	0,00 a B	0,69 a
	<b>Média</b>	0,94 A	0,98 A	0,00 B	0,00 B	0,00 B	

\*As médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e mesmo tipo de tratamento e por mesma letra maiúscula na linha e mesmo tempo de estocagem, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

## 4 CONCLUSÕES

O azeite usado no experimento apresentou os parâmetros que caracterizam o azeite de oliva do tipo extra virgem de acordo com a ANVISA, a Regulamentação Européia e o CODEX *Alimentarium*. Porém, a extinção específica da amostra inicial apresentou no limiar do aceite nestas leis.

Durante o tempo de estocagem, a porcentagem de ácidos graxos livres se manteve baixa em todos os tratamentos. O índice de peróxido aumentou moderadamente com o tempo em todos os tratamentos, mas, de forma menos pronunciada na lata. A extinção específica a 232 nm permaneceu estável. O teor de compostos fenólicos apresentou pouca alteração. A foto-oxidação teve um importante efeito na variação das análises de K270,  $\alpha$ -tocoferol, clorofila e cor.

As amostras inertizadas não apresentaram diferença em relação aos demais tratamentos, o que pode ser um sinal de que o procedimento não foi eficaz.

O único parâmetro que ultrapassou o limite aceitável para azeite de oliva extra virgem segundo as recomendações da ANVISA foi o K270 dos tratamentos expostos à luz.

Sabendo-se que o azeite é um produto exposto à luz, seja durante a venda ou no consumo doméstico e pelos resultados apresentados neste estudo, não é recomendado uso de embalagem de vidro transparente para este produto por comprometer sua estabilidade e seu caráter nutricional.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBA, J.; IZQUIERDO, J. R.; GUTIÉRREZ, F. **Aceite de oliva virgen. Análisis sensorial**. Ed. Agrícola Española, S.A. Madrid, 1997.

ANGEROSA, F.; CAMPESTRE, C.; GIANANTE, C. Analysis and Authentication. In Boskou, D. (Ed). **Olive Oil: Chemistry and Technology**. AOCS Press: Champaign, 2 ed. cap. 7, 2006, p 113.

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY - AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society**. 5 ed., Champaign: AOCS, 2004.

ARRUDA, C. S. **Efeito da concentração de oxigênio na estabilidade oxidativa do óleo de soja em garrafas PET (polietileno tereftalato)**. 2003. 110f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2003.

BOSKOU, D.; BLEKAS, G.; TSIMIDOU, M. Olive Oil Composition. In Boskou, D. (Ed). Olive Oil: **Chemistry and Technology**. AOCS Press: Champaign, ed. 2, cap. 4, p 41-72. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais. **Diário Oficial da União**, Brasília, publicada em 20 de junho de 2000, p. 3029.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução n. 270, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 de setembro de 2005, p. 2134.

CAPONIO F., BILANCIA M. T., PASQUALONE A., SIKORSKA E., GOMES T. Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage. **European Food Research and Technology**. 221, p. 92-98. 2005.

CHOE, E.; LEE, J.; MIN, D. B. Chemistry for Oxidative Stability of Edible Oils In: Akoh, C.C., Lai, O.M. **Healthful Lipids**. AOCS Press, Champaign, IL, USA, p. 99-126, 2005.

CODEX *Alimentarius Commission*. **CODEX Standards for olive oils, and olive pomace oils**, CODEX STAN 33, 1981. CODEX *Alimentarius*, Rome: FAO/WHO, rev.2, 2003.

CRIADO, M. N.; ROMERO, M. P.; CASANOVAS, M.; MOTILVA, M. J. Pigment profile and colour of monovarietal virgin olive oils from Arbequina cultivar obtained during two consecutive crop seasons. **Food Chemistry**, 110 (4), p. 873-880. 2008.

ENDO, Y.; USUKI, R.; KANEDA, T. Prooxidant activities of chlorophylls and their decomposition products on the photooxidation of methyl linoleate. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 61, 781-784, 1984.

GIMENO, E; CASTELLOTE, A. I; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M; DE LA TORRE M. C.; LÓPEZ-SABATER, M. C. The effect of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics,  $\alpha$ -tocopherol, and  $\beta$ -carotene) in virgin olive oil. **Food Chemistry**. 78, 2002, p. 207.

GOODACRE, R.; KEL, D. B.; BIANCHI, G. Rapid assessment of the adulteration of virgin olive oils by other seed oils using pyrolysis mass spectrometry and artificial neural networks. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 63, p. 297 – 307, 1993.

GUTFINGER, T. Polyphenols in olive oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 58, p.966–968, 1981.

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

KANAVOURAS, A.; HERNANDEZ-MÜÑOZ, P.; COUTELIERIS, F. A.; SELKE, S. Oxidation-Derived Flavor Compounds as Quality Indicators for Packaged Olive Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v.81, p.251–257, 2004.

MÉNDEZ, A.I.; FALQUÉ, E. Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil. **Food Control**, 18: 521-529. 2007.

OLIVEIRA, L. M. Requisitos de proteção de produtos em embalagens plásticas rígidas. **Centro de Tecnologia de Alimentos – ITAL**. Campinas, 2006. 328 p.

PIERGIOVANNI, L.; LIMBO, S. Packaging and the Shelf Life of Vegetable Oils In: Robertson, G. L. **Food Packaging and Shelf Life: A Practical Guide**. CRC Press, Boca Raton. 2010. p 318.

PIRISI, F. M.; ANGIANI, A.; BANDINO, G.; CABRAS, P.; GUILLOU, C.; MACCIONI, E.; RENIERO, F. Photolysis of  $\alpha$ -tocopherol in olive oils and model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46: 4529-4533. 1998.

POKORNY, J.; SCHMIDT, S.; PARKÁNYIOVÁ, J. Ultraviolet-Visible Spectrophotometry in the Analysis of Lipid. In: Kamal-Eldin, A.; Pokorny, J. **Analysis of Lipid Oxidation**. AOCS Press: Champaign. USA. cap. 3. p. 17-39. 2005.

PRISTOURI, T. G.; BADEKA, A.; KONTOMINAS, M. G. Effect of packaging material headspace, oxygen and light transmission, temperature and storage time on quality characteristics of extra virgin olive oil. **Food Control**. 21 (4), p. 412-418. 2010.

PSOMIADOU, E.; TSIMIDOU, M. Simultaneous HPLC determination of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46:5132–5138. 1998.

PSOMIADOU, E.; TSIMIDOU, M.; BOSKOU D.  $\alpha$ -Tocopherol content of Greek virgin olive oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48:1770–1775. 2000.

PSOMIADOU, E.; TSIMIDOU, M. Pigments in Greek Virgin Olive Oils: Occurrence and Levels. **Journal of the Science of Food and Agricultural**. 41: 640-647. 2001.

TSIMIDOU, M. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. **Italian Journal of Food Science**. 10: 99–116. 1998.

UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) nº 702/2007. **Jornal Oficial da União Européia**. 21 de julho de 2007. p. 11-27. 2007.

## **CONCLUSÕES GERAIS**

Neste experimento, foi observado que a estabilidade do azeite extra virgem não foi mantida quando envasado em embalagens de PET e vidro transparentes e exposto à radiação luminosa. Nestas embalagens, houve rápida degradação dos teores de clorofila e  $\alpha$ -tocoferol, acompanhada de uma significativa alteração da cor. No azeite acondicionado em embalagem de PET âmbar estas alterações também ocorreram, porém de forma menos intensa.

Dentre as embalagens estudadas, a lata foi a mais apropriada em manter a estabilidade oxidativa do azeite e amenizar a degradação dos seus compostos de importância nutricional e organoléptica. Considerando que o azeite é um produto exposto à luz, seja durante a venda ou no consumo doméstico e pelos resultados apresentados, não é recomendado uso da embalagem de PET e vidro transparentes para este produto. Quanto à embalagem de PET âmbar, faz-se necessário melhorar seus parâmetros de barreira à luz, como a pigmentação e a espessura da parede.