



UnB

Instituto de Química

**DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS PRINCIPAIS
PARÂMETROS DO AZEITE DE OLIVA PARA APLICAÇÃO
COMO DILUENTE DE EXTRATOS MEDICINAIS À BASE DE
CANNABIS**

Natália Soares de Oliveira

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Orientadora

Profa. Dra. Ana Cristi Basile Dias

BRASÍLIA, DF.

2023



UnB

Instituto de Química

Natália Soares de Oliveira

**DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS PRINCIPAIS
PARÂMETROS DO AZEITE DE OLIVA PARA APLICAÇÃO
COMO DILUENTE DE EXTRATOS MEDICINAIS À BASE DE
CANNABIS**

Trabalho de conclusão do curso de Bacharelado em Química apresentado ao Instituto de Química da Universidade de Brasília como requisito parcial de obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristi Basile Dias

Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Vasconcelos de Almeida

“Faz silêncio no teu corpo e escuta-te.”

Cecília Meireles

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me proporcionou tudo e me deu a oportunidade de estar aqui.

Agradeço minha família, principalmente a minha mãe, minha maior companheira, que sempre acreditou em mim, me deu força, me apoiou e me incentivou nas minhas escolhas.

Obrigada à minha orientadora Profa. Ana e coorientadora Profa. Fernanda pelos ensinamentos e pela confiança no meu trabalho. Agradeço aos colegas de laboratório que me ajudaram, me ensinaram, mas também deixaram os dias mais leves com as conversas.

Obrigada aos amigos de curso, que deixaram a jornada muito mais alegre com o companheirismo, as trocas, os estudos e os laboratórios que tivemos juntos e a disponibilidade de ajudar sempre que preciso.

RESUMO

Devido as características antioxidantes e extensa validade do azeite de oliva extravirgem quando comparado com outros óleos, escolheu-se esse produto para ser utilizado como diluente de extratos medicinais à base de *Cannabis* contendo canabidiol (CBD), tetrahydrocannabinol (THC) e canabigerol (CBG), moléculas que possui ação terapêutica em inúmeras doenças. Apesar da ação antioxidante dos compostos fenólicos no azeite, seus ácidos graxos são degradados ao longo do tempo, devido a exposição à luz, ao calor e ao contato com oxigênio atmosférico, sofrendo reações de hidrólise e oxidação, que ocasionam alterações no seu sabor, na sua cor e no seu aroma. Por isso esse trabalho determinou e avaliou os parâmetros Índice de Peróxidos (IP), Índice de p-Anisidina (IPA), Índice de Acidez (IA), Capacidade Antioxidante (CA) e Coeficiente de Extinção Específica (EE) em 232 nm e 270 nm em 15 amostras de azeite de oliva, em TCM e em óleo de soja. A fim de determinar os parâmetros que possuem uma diferença significativa entre as amostras e verificar a qualidade dos azeites de acordo com a concordância com os dados dos rótulos e com os limites exigidos pela ANVISA.

Praticamente todas as amostras apresentaram valores para os parâmetros dentro do limite estabelecido pela ANVISA e indicado pela IUPAC ($IA \leq 0,8$; $IP \leq 20,0$; EE em 232 nm $\leq 2,5$; $IPA \leq 10,0$) com exceção de quatro amostras que apresentaram EE em 270 nm maior do que 0,22. Porém, os valores Totox foram muito acima do indicado na maioria das amostras, com exceção de duas. A PCA realizada condessou os parâmetros em PC1 e PC2 e agrupou as amostras de azeite em 3 grupos, onde a amostra Nova Oliva se destacou das outras, provavelmente, devido à alta CA e aos baixos IPA, IP e IA. A ANOVA mostrou que a diferença entre todos os parâmetros das amostras foi significativa, já que todas apresentaram F maior do que F crítico (1,8993). O teste Tukey realizado determinou que as análises do IPA, IP e EE em 270 nm apresentaram menos da metade dos pares de amostras significativamente diferentes, enquanto que as análises da CA, IA, e EE em 232 nm apresentaram mais da metade dos pares de amostras significativamente diferentes. Conclui-se que os parâmetros índice de acidez e capacidade antioxidante são os mais significantes, sendo necessário apenas determinar esses dois, a fim de diminuir o número de análises, para avaliar a qualidade de um azeite a ser utilizado como diluente de extrato medicinal à base de *Cannabis*.

ABSTRACT

Due to the antioxidant characteristics and long shelf life of extra virgin olive oil when compared to other oils, this product was chosen to be used as a diluent for medicinal *Cannabis*-based extracts containing cannabidiol (CBD), tetrahydrocannabinol (THC) and cannabigerol (CBG), molecules that have therapeutic action in numerous diseases. Despite the antioxidant action of the phenolic compounds in olive oil, its fatty acids are degraded over time due to exposure to light, heat and contact with atmospheric air, undergoing hydrolysis and oxidation reactions, which cause changes in its flavor, in its color and its aroma. Therefore, this work determined and evaluated the parameters Peroxide Index (PI), p-Anisidine Index (PAI), Acidity Index (AI), Antioxidant Capacity (AC) and Specific Extinction Coefficient (SE) at 232 nm and 270 nm in 15 samples of olive oil, in TCM and in soybean oil. In order to determine the parameters that have a significant difference between the samples and verify the quality of the oils according to the agreement with the labels data and with the limits required by ANVISA.

Almost all the samples presented values for the parameters within the limit established by ANVISA and indicated by IUPAC ($AI \leq 0.8$; $PI \leq 20.0$; $SE \text{ at } 232 \text{ nm} \leq 2.5$; $PAI \leq 10.0$) with the exception of four samples that showed SE at 270 nm greater than 0.22. However, the Totox values were much higher than indicated in most samples, with the exception of two. The PCA carried out condensed the parameters into PC1 and PC2 and grouped the olive oil samples into 3 groups, where the Nova Oliva sample stood out from the others, probably, due to the high AC and the low PAI, PI and AI. The ANOVA showed that the difference between all parameters of the samples was significant, since all had an F greater than the critical F (1.8993). The Tukey test performed determined that the PAI, PI, and SE at 270 nm analysis showed less than half of the sample pairs significantly different, while the AC, AI, and SE at 232 nm analysis showed more than half of the sample pairs significantly different. It is concluded that the parameters acidity index and antioxidant capacity are the most significant, being only necessary to determine these two, in order to reduce the number of analyses, to evaluate the quality of an oil to be used as a diluent of a medicinal extract based on of *Cannabis*

Sumário

ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
ÍNDICE DE EQUAÇÕES	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
1.1. Origem do Azeite de Oliva	14
1.2. Produção e Consumo	14
1.3. Tipos de Azeite	17
1.4. Processo de Produção do Azeite de Oliva Extra Virgem	17
1.5. Composição do Azeite de Oliva	18
1.5.1. Compostos Fenólicos.....	19
1.5.2. Ácidos Graxos	20
1.6. Degradação do Azeite	21
1.6.1. Rancidez Hidrolítica	22
1.6.2. Oxidação	22
1.7. Parâmetros de Qualidade do Azeite de Oliva	24
1.7.1. Índice de Peróxidos - Método Iodométrico	25
1.7.2. p-Anisidina	26
1.7.3. Índice de Acidez Livre – Titulação Ácido-Base	27
1.7.4. Capacidade Antioxidante – DPPH	28
1.7.5. Extinção Específica no Ultravioleta	29
1.8. Extratos medicinais de espécies de Cannabis	32
2. OBJETIVOS.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. Reagentes	34
3.2. Materiais	35
3.3. Equipamentos	35
3.4. Preparo de Soluções	36
3.5. Métodos	37
3.5.1. Determinação de Índice de Peróxido	37
3.5.2. Método da p-Anisidina	37
3.5.3. Titulação Ácido-Base	37
3.5.4. Capacidade Antioxidante.....	38

3.5.5. Extinção Específica no Ultravioleta	38
3.6. Amostras	38
4. RESULTADOS	40
4.1. Atividade antioxidante	40
4.1.1. Estabilidade da solução de DPPH	40
4.1.2. Precisão das Medidas do Equipamento	41
4.1.3. Número de Gotas	42
4.1.4. Estudo Cinético	42
4.1.5. Precisão da Amostragem	43
4.2. Análises dos Azeites	44
4.3. Análise do TCM e Óleo de Soja	48
4.4. Análise de Componentes Principais (PCA)	49
4.5. ANOVA e Teste Tukey	52
5. CONCLUSÃO	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - (a) Plantação de oliveira (ALVES, 2021); (b) Azeitonas (CARDOSO et al., 2018).....	14
Figura 2 - Exportação de azeite em toneladas nos primeiros meses da safra (INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL, 2022)	15
Figura 3 - Produção de azeite no Rio Grande do Sul 2010- 2022 (JOÃO, 2022)	16
Figura 4 - Importação de azeite em toneladas nos primeiros meses da safra (INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL, 2022)	16
Figura 5 - Etapas do Processo de Produção do azeite. (a) Lavagem e Trituração; (b) Centrifugação; (c) Decantação; (d) Envase e Etiquetagem (CHAGAS, 2021)	18
Figura 6 – Compostos fenólicos presentes no azeite. (a) Apigenina; (b) Luteolina; (c) Hidroxitirosol; (d) Tirosol; (e) Ácido Siringico; (f) Oleocantal; (g) Oleuropeína	19
Figura 7 - Composto Fenólico impedindo a oxidação do ácido graxo	19
Figura 8 - Indicação da dupla ligação do ácido oleico, parte da família dos ômega 9 .	21
Figura 9 - Principais ácidos graxos no azeite de oliva (a) ácido palmítico; (b) ácido palmitoleico; (c) ácido esteárico; (d) ácido oleico; (e) ácido linoleico; (f) ácido linolênico	21
Figura 10 - Esquema da reação de hidrólise de um triglicérido	22
Figura 11 - Esquema das reações que resultam na oxidação de ácido graxo	23
Figura 12 - Curva típica de auto oxidação (ENCICLOPÉDIA MUNDIAL DA OLIVEIRA, 1998).....	24
Figura 13 - Oxidação do iodeto pelo peróxido e redução do iodo pelo tiosulfato.....	25
Figura 14 - Formação do triiodeto e do complexo amido-triiodeto	26
Figura 15 - Esquema de Formação de Imina a partir da reação da p-anisidina com aldeídos e cetonas	26
Figura 16 - Reação de neutralização de ácido graxo	27
Figura 17 - Diferenças estruturas e de coloração da fenolftaleína de acordo com o pH do meio	28
Figura 18 - Reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio, formando o DPPH-H.....	29
Figura 19 - Conjugação do ácido linoleico durante a oxidação	30
Figura 20 - Estrutura do Canabidiol (a), do Tetrahydrocannabinol (b) e do Canabigerol (c)	33
Figura 21 - Espectro UV-Vis do DPPH	41
Figura 22 - Gráfico número de gotas.....	42
Figura 23 - Gráfico cinética.....	43
Figura 24 - Dendograma para amostras de Azeite	50
Figura 25 - Biplot dos dados: Amostras de Azeite.....	51
Figura 26 - Componente Principal 1.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de ácidos graxos no azeite de oliva (adaptado de AUED-PIMENTEL, S. et al., 2002)	20
Tabela 2 – Limites de Tolerância de Parâmetros de Qualidade do Azeite de Oliva (adaptado de MAPA, 2012).....	24
Tabela 3 – Composição dos ácidos graxos insaturados em diferentes óleos vegetais (adaptado de FONSECA et al., 1974)	31
Tabela 4 – Amostras de Azeite para Testes Prévios.....	38
Tabela 5 - Amostras de azeite.....	40
Tabela 6 - Amostras de TCM e Óleo de soja	40
Tabela 7 - Solução de DPPH	41
Tabela 8 - Reprodutibilidade do equipamento (n=10)	42
Tabela 9 - Amostragem	44
Tabela 10 - Valores dos Parâmetros das Amostras	45
Tabela 11 - Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo dos Parâmetros CA, IPA e EE...	47
Tabela 12 - Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo dos Parâmetros IP e IA.....	48
Tabela 13 - Valores dos Parâmetros para o TCM e o Óleo de Soja	49
Tabela 14 - Percentagem de variância capturada pelo modelo PCA.....	51
Tabela 15 - F, valor-p e % que a marca do azeite explica a variação do parâmetro	52

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo do índice de peróxido	26
Equação 2 - Cálculo do Índice de p-anisidina	27
Equação 3 - Cálculo do Índice de Acidez Livre	28
Equação 4 - Cálculo da Capacidade Antioxidante	29
Equação 5 - Cálculo dos Coeficientes de Extinção Específica	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
CA	Capacidade antioxidante
CBD	Canabidiol
CBG	Canabigerol
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EE	Extinção específica no ultravioleta
IA	Índice de acidez
IP	Índice de peróxidos
IPA	Índice de p-anisidina
TCM	Triglicerídeos de cadeia média
THC	Tetrahydrocannabinol
PCA	Análise de componentes principais
PC1	Componente principal 1
PC2	Componente principal 2

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Origem do Azeite de Oliva

O azeite de oliva, líquido amarelo-esverdeado e aromático amplamente consumido no mundo inteiro, é extraído da azeitona, o fruto da oliveira (Figura 1). A oliveira (*Olea europaea L.*) é uma árvore pertencente à família *Oleaceae* e ao gênero *Olea* (ENCICLOPÉDIA MUNDIAL DA OLIVEIRA, 1998), que produz melhor na presença de algum estresse, tolerando condições quentes e secas, desde que se forneça um pouco de resfriamento e não exista umidade durante o florescimento. Consequentemente, essa árvore foi tradicionalmente direcionada para terras onde poucas espécies sobreviveriam. Sua origem não é realmente conhecida, mas se acredita que começou na Síria ou na África Subsaariana, e, durante 6000 anos, a plantação das azeitonas foi se desenvolvendo junto com as civilizações Mediterrâneas. Sendo, por muitos anos, majoritariamente cultivada para a utilização do seu óleo como combustível nas lamparinas e somente mais adiante assumindo uma grande importância na alimentação e na culinária (VOSSEN, 2007).

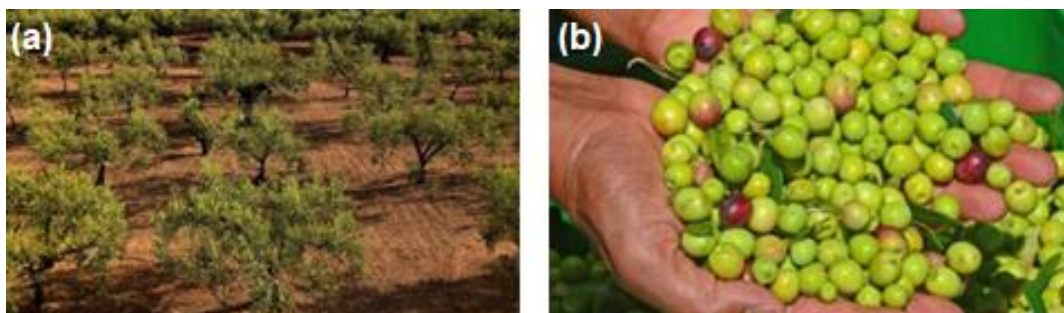


Figura 1 - (a) Plantação de oliveira (ALVES, 2021); (b) Azeitonas (CARDOSO et al., 2018).

1.2. Produção e Consumo

As maiores plantações de oliveiras encontram-se na bacia mediterrânea, porém também existem cultivos na África do Sul, Tunísia, Califórnia, Austrália, Argentina, Chile e mais recentemente no Brasil. São produzidas em média 3 milhões de toneladas de azeite em todo o mundo todos os anos, sendo a União Europeia (UE) responsável por cerca de 2 milhões desta produção. Os principais países produtores são a Espanha (66% da produção da UE), Itália (15%), Grécia (13%) e Portugal (5%) (EUROPEAN

COMMISSION, 2022). A UE também é o maior consumidor de azeite, cerca de 1,5 milhões de toneladas são consumidas todos os anos, e, ainda, é o maior exportador de azeite, cerca de 570 mil toneladas são exportadas por ano, sendo Espanha, Itália e Portugal responsáveis por 70% dessa exportação (Figura 2). Nos primeiros meses da safra de 2021/2022, 118738 toneladas de azeite foram exportadas pelos países Espanha, Itália, Tunísia, Portugal e Argentina, quantidade inferior aos 3 anos anteriores, conforme a Figura 2.

	2017/2018	2018/2019	2019/2020	2020/2021	2021/2022	%Share	%Variation rates
SPAIN	34364	45568	51975	41442	44523	37.5	↑ 7.4
ITALY	30042	32775	25741	32227	25792	21.7	↓ -20
TUNISIA	3674	13025	12973	33424	17388	14.6	↓ -48
PORTUGAL	8530	11975	14082	18962	13134	11.1	↓ -30.7
ARGENTINA	6980	4236	5248	6668	5899	5.0	↓ -11.5
Others	12255	16541	11027	13143	12003	10.1	↓ -8.7
Total	95845	124120	121045	145866	118738	100	↓ -18.6

Figura 2 - Exportação de azeite em toneladas nos primeiros meses da safra (INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL, 2022)

O azeite de oliva está presente na alimentação da população brasileira principalmente por conta da influência da cultura portuguesa. Porém, seu consumo é limitado, ocorrendo 50% das vendas anuais desse produto na Páscoa e no Natal. O maior consumo de azeite é nas regiões sul e sudeste devido ao maior poder aquisitivo e à presença de descendentes de imigrantes europeus (italianos, espanhóis e alemães). Por outro lado, na região nordeste esse consumo é baixo por conta da menor renda e da utilização de outros óleos como óleo de coco e azeite de dendê (COUTINHO et al., 2009).

Segundo o Conselho Oleícola Internacional (OIC), o Brasil é o segundo maior importador de azeite de oliva no mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. Em 2021, importou mais de 100 milhões de litros desse produto, representando quase 100% do consumo nacional. A produção de azeite no Brasil é relativamente recente, porém vem crescendo bastante no decorrer dos últimos anos. Os cultivares (variedades cultivadas de uma espécie vegetal) de oliveiras das variedades Arbequina, Arbosana, Ascollana, Frantoio, Grapollo, Koroneiki, Manzanilla e Picual são encontradas em Santa Catarina, São Paulo e, principalmente, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, os dois estados com a produção mais significativa no país (MELLO, et al., 2012).

Aproximadamente, 30% da produção de azeite do país vem de Minas Gerais. Em 2012, cerca de 300 mil oliveiras estavam plantadas na região da Serra da Mantiqueira. Onde 50% dessa quantidade correspondia a cultivar Arberquina (OLIVEIRA da SILVA et al., 2012). No Rio Grande do Sul, estado que é responsável por a maior parte da produção nacional de azeite, o volume de óleo produzido a partir das oliveiras cresceu 773% nos últimos cinco anos (Figura 3), 58000 litros em 2018, para 448500 em 2022 (JOÃO, 2022).

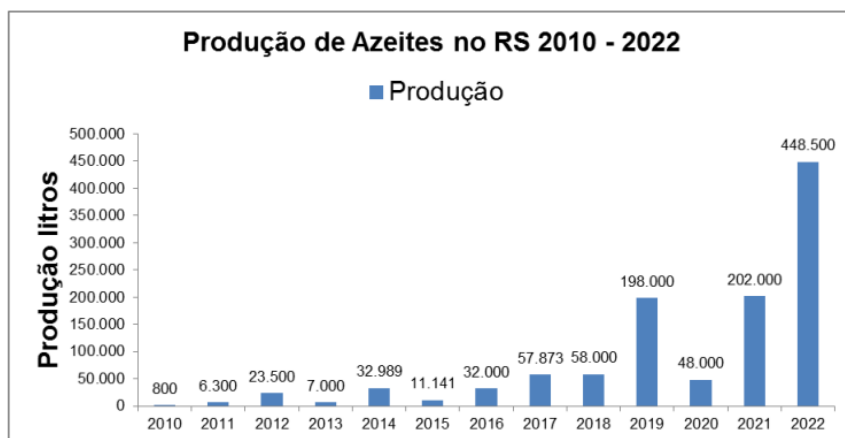


Figura 3 - Produção de azeite no Rio Grande do Sul 2010- 2022 (JOÃO, 2022)

De acordo com a Figura 4, no último ano, a taxa de importação mundial decaiu 18,6%, valor bastante expressivo, sendo que no Brasil esse número foi maior ainda, 26,9%. Nos primeiros meses da safra de 2021/2022, o Brasil importou 17021 toneladas de azeite, quantidade inferior aos 2 anos anteriores (Figura 4). Essa diminuição pode estar relacionada ao considerável aumento da produção de azeite no país nos últimos anos.

	2015/2016	2016/2017	2017/2018	2018/2019	2019/2020	2020/2021	2021/2022	Average	%Variation Rates
AUSTRALIA	3425	5660	4867	6640	4692	5770	5561	5231	↓ -3.6
BRAZIL	10176	11900	12637	16660	19262	23269	17021	15846	↓ -26.9
CANADA	5893	8161	7372	8519	8373	10778	6736	7976	↓ -37.5
CHINA	5406	10777	5989	6521	9277	7503	7832	7615	↑ 4.4
JAPAN	7867	9265	8983	10700	10079	10871	11013	9825	↑ 1.3
RUSSIA	3032	3239	3390	4559	4922	6174	4858	4311	↓ -21.3
USA	45223	49110	45977	59225	54617	61665	55117	52991	↓ -10.6
Extra-EU	18265	7832	6629	11296	9824	19836	10601	12041	↓ -46.6
Total	99287	105946	95845	124120	121045	145866	118738	115835	↓ -18.6

Figura 4 - Importação de azeite em toneladas nos primeiros meses da safra (INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL, 2022)

1.3. Tipos de Azeite

Existe uma variedade de cultivares de oliveira sendo as mais comuns: Picual, Coratina, Koroneiki, Arbequina, Frantoio e Leccino. Da azeitona, obtém-se tanto o azeite de oliva como o óleo de bagaço de oliva, que são classificados em grupos de acordo com a matéria prima e o processo de obtenção pela RDC nº 270 de 2005 e a Instrução Normativa do MAPA de 2012.

- Azeite de oliva virgem: é o produto extraído do fruto da oliveira (*Olea europaea L.*), somente por processos mecânicos, em condições térmicas, com controle de temperatura, ideal entre 23 e 27 °C, que não produzam alteração do azeite, e que não tenha sido submetido a outros tratamentos além da lavagem, decantação, centrifugação e filtração. O azeite de oliva virgem é classificado em três tipos de acordo com alguns parâmetros de qualidade como acidez livre, índice de peróxidos e extinção específica no ultravioleta. Os tipos são azeite de oliva extra virgem (índice de acidez $\leq 0,80\%$), azeite de oliva virgem (índice de acidez $\leq 2,00\%$) e azeite lampante (índice de acidez $> 2,00\%$)
- Azeite de oliva: constituído pela mistura de azeite de oliva virgem ou extra virgem com azeite de oliva refinado.
- Azeite de oliva refinado: proveniente de azeite de oliva virgem, que possui acidez elevada ou apresenta características sensoriais indesejadas devido a problemas climáticos ou de processo. Esse azeite passa por técnicas de refino, como extração e filtração, que não modificam sua estrutura química, mas corrigem os parâmetros não atendidos.
- Óleo de bagaço de oliva refinado: é o produto obtido pelo tratamento do bagaço de frutos da oliveira (*Olea europaea L.*), com solventes ou outros tipos de tratamentos físicos, por meio de técnica de refino que não modifique a estrutura química inicial.
- Óleo de bagaço de oliva: constituído pela mistura de azeite de oliva virgem ou extra virgem com óleo de bagaço de oliva refinado.

1.4. Processo de Produção do Azeite de Oliva Extra Virgem

O processo de produção do azeite de oliva extravirgem consiste de uma série de etapas. Inicialmente, as azeitonas são coletadas manualmente ou de forma mecanizada,

geralmente, no final do verão e início do outono. Após recolhidos os frutos, são imediatamente levados para as folhas os detritos serem separados e as azeitonas lavadas e pesadas (Figura 5a). Em seguida, elas são trituradas (Figura 5a), formando uma pasta que passa para a batedora, onde permanece por até 60 minutos a uma temperatura que não pode passar de 27 °C por conta da fermentação do fruto, dando origem ao termo extração à frio. Depois, o azeite é centrifugado (Figura 5b), separando a água e outras impurezas, e filtrado para retirar as impurezas restantes. Por fim, o azeite é armazenado em tanques para decantar por até 20 dias (Figura 5c), permitindo que os dejetos sólidos se mantenham no fundo do tanque, sendo, em seguida, envasado e etiquetado (Figura 5d), estando pronto para a comercialização (CHAGAS, 2021).



Figura 5 - Etapas do Processo de Produção do azeite. (a) Lavagem e Trituração; (b) Centrifugação; (c) Decantação; (d) Envase e Etiquetação (CHAGAS, 2021)

1.5.Composição do Azeite de Oliva

O azeite possui uma grande quantidade de ácidos graxos e de antioxidantes naturais. Sua composição se divide em fração saponificável (98-99%), formada por ácidos graxos livres, triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos, e em fração não saponificável (1-2%) formada por compostos voláteis, pigmentos, polifenóis, tocoferóis, esteróis, vitaminas e clorofila (BALLUS et al., 2014). A seguir será apresentada uma breve revisão de alguns compostos presentes no azeite.

1.5.1. Compostos Fenólicos

O azeite possui uma variedade de compostos fenólicos, como oleuropeína, oleocantal, hidroxitirosol, tirosol, apigenina, luteolina e ácido siríngico (Figura 6). Essas moléculas estão presentes nas folhas e nos frutos da oliveira, agindo como protetores dessas plantas em situações de estresse como a falta de água e pragas (ENCICLOPÉDIA MUNDIAL DA OLIVEIRA, 1998).

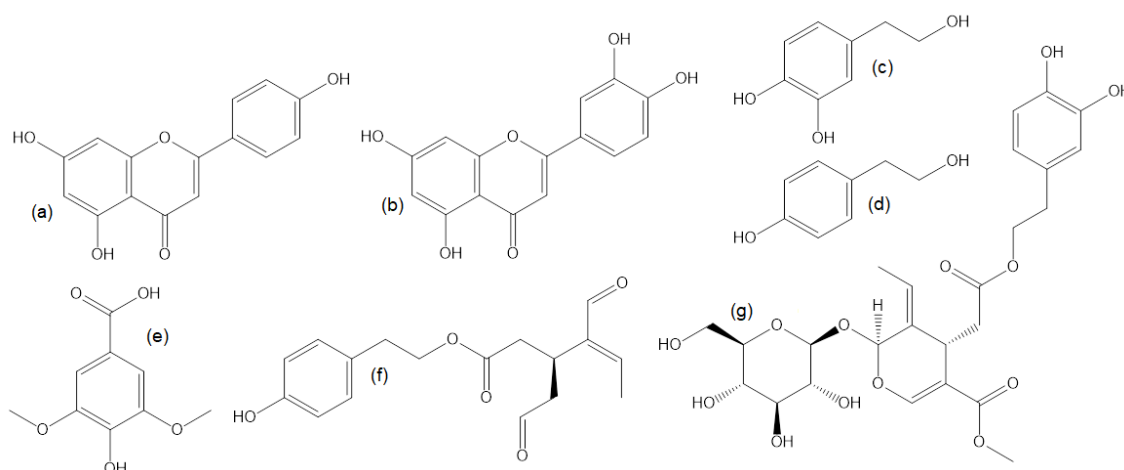


Figura 6 – Compostos fenólicos presentes no azeite. (a) Apigenina; (b) Luteolina; (c) Hidroxitirosol; (d) Tirosol; (e) Ácido Siríngico; (f) Oleocantal; (g) Oleuropeína

Esses compostos possuem atividade antioxidante devido a presença de átomos de hidrogênio disponíveis para doação (hidrogênios fenólicos), atrasando a reação de oxidação dos ácidos graxos do azeite, ao inibir a formação de radicais livres ou interromper a propagação deles (Figura 7), já que os radicais desses compostos fenólicos são mais estáveis devido a ressonância do anel aromático.

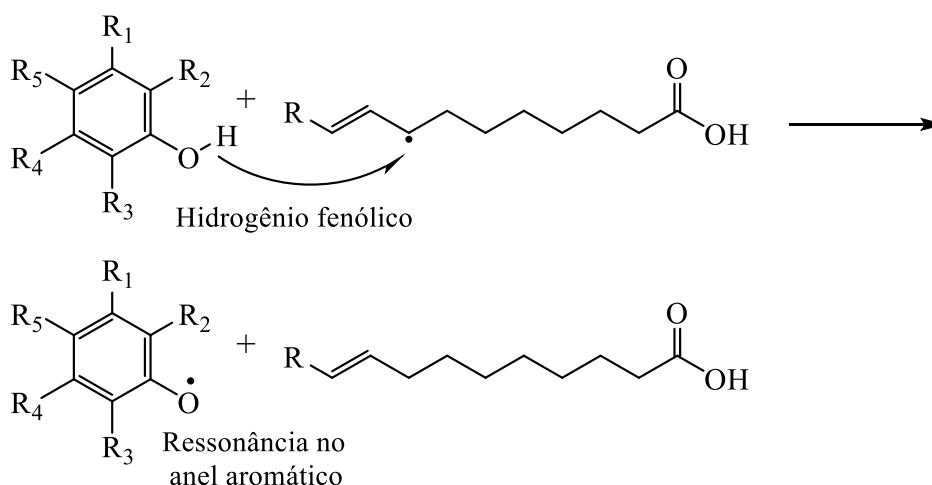


Figura 7 - Composto Fenólico impedindo a oxidação do ácido graxo

A presença dos polifenóis, que depende do cultivar da oliveira e de fatores agronômicos e climáticos durante a produção do azeite, contribui nas características sensoriais deste produto, como sabor amargo característico da oleuropeína ou a sensação de queimação no fundo da garganta devido ao oleocantal. A esses compostos fenólicos são atribuídos vários benefícios à saúde, como prevenção de doença cardíaca coronária, câncer, inflamação crônica, doenças, crônicas, derrames e outras doenças degenerativas (FUENTES et al, 2018).

1.5.2. Ácidos Graxos

Os ácidos graxos também conhecidos como ácidos carboxílicos de cadeia longa, compõem os mono, di e triglicerídeos, que são os principais componentes dos óleos e gorduras (FONSECA, GUTIERRA, 1974). O azeite de oliva é formado em sua maioria por ácidos graxos monoinsaturados, principalmente o ácido oleico que corresponde à 55,0 - 83,0% (Tabela 1). Esse ácido faz parte da família dos ômega 9, com a primeira dupla ligação a partir da extremidade oposta à carboxila no carbono 9, conforme se observa na Figura 8.

Ácido graxo	Nomenclatura	g/100 g
C 14:0	Mirístico	≤0,05
C 16:0	Palmítico	7,5 – 20,0
C 16:1	Palmitoleico	0,3 – 3,5
C 17:0	Margárico	<0,3
C 17:1	Heptadecenoico	<0,6
C 18:0	Esteárico	0,5 – 5,0
C 18:1	Oleico	55,0 – 83,0
C 18:2	Linoleico	3,5 – 21,0
C 18:3	Linolênico	≤0,9
C 20:0	Araquídico	≤0,6
C 20:1	Eicosanoico	≤0,4
C 22:0	Behênico	≤0,2
C 24:0	Lignocérico	≤0,2

Tabela 1 - Composição de ácidos graxos no azeite de oliva (adaptado de AUED-PIMENTEL, S. et al., 2002)

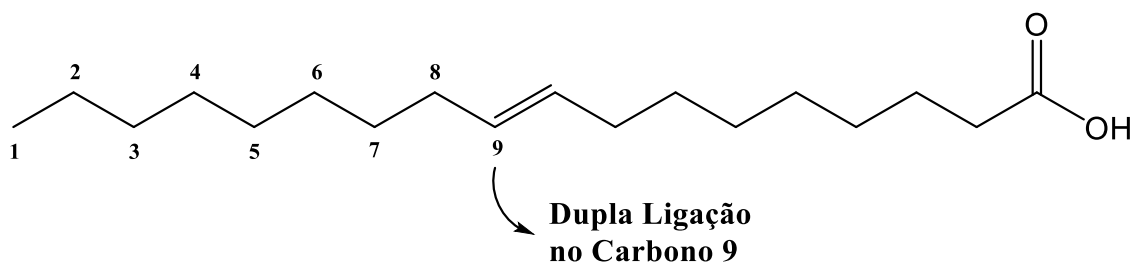


Figura 8 - Indicação da dupla ligação do ácido oleico, parte da família dos ômega 9

No azeite, os principais ácidos graxos são os saturados (ácido palmítico e ácido esteárico), os monoinsaturados apresentam uma ligação dupla (ácido palmitoleico e ácido oleico) e os poli-insaturados com duas ou mais ligações duplas (ácido linoleico - ômega 6 e ácido linolênico - ômega 3) (Figura 9).



Figura 9 - Principais ácidos graxos no azeite de oliva (a) ácido palmítico; (b) ácido palmitoleico; (c) ácido esteárico; (d) ácido oleico; (e) ácido linoleico; (f) ácido linolênico

1.6. Degradação do Azeite

O azeite é degradado ao longo do tempo, devido a exposição à luz, ao calor, ao contato com gás oxigênio atmosférico, sofrendo reações de hidrólise e degradação oxidativa, como fotoxidação e autoxidação, dos ácidos graxos, ocasionando alterações no seu sabor, na sua cor e no seu aroma. Para retardar esses processos, a embalagem do azeite deve ser de vidro escuro, um material mais inerte que minimiza a passagem de luz ultravioleta, catalisadora de reações de oxidação. Enquanto que a embalagem de plástico

não evita a passagem de luz e pode liberar substâncias prejudiciais, logo, não é adequada para o armazenamento deste óleo (RODRIGUES, 2016). Além disso, o produto deve ser armazenado em local fresco e sem incidência de luz direta, pois temperaturas mais altas e raios ultravioletas podem acelerar esses processos (FELLOWS, 2006). Outro fator que precisa ser observado é o tamanho da embalagem, pois caso o consumo do produto seja lento, a quantidade de oxigênio no frasco irá aumentar e oxidar mais rapidamente o azeite. Assim, é melhor optar por embalagens menores que terão menos espaço ocupado pelo ar e serão consumidas mais rapidamente. As principais reações que promovem a degradação do azeite devido às influências externas serão apresentadas a seguir.

1.6.1. Rancidez Hidrolítica

A rancidez hidrolítica é um processo onde ocorre a hidrólise da ligação éster dos triglicerídeos (RODRIGUES, 2016) catalisado pelo calor (Figura 10). Essa reação gera ácidos graxos livres alterando as características sensoriais do azeite como a cor e o aroma (FREIRE et al., 2013; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2014). Quanto maior a quantidade de ácidos graxos livres maior será o índice de acidez do produto, indicando que o processo de deterioração está acelerado.

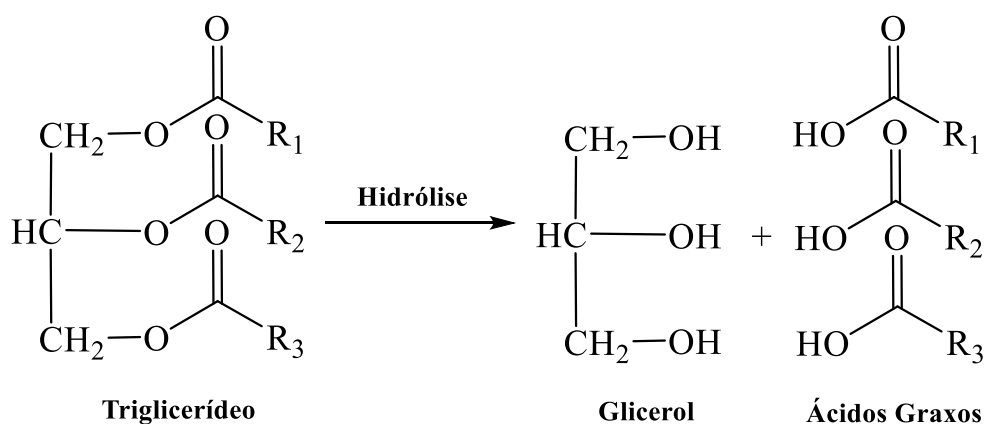


Figura 10 - Esquema da reação de hidrólise de um triglicerídeo

1.6.2. Oxidação

A oxidação refere-se a um conjunto de reações que resulta na formação de peróxidos, podendo ocorrer por fotooxidação ou auto oxidação. O mecanismo de fotooxidação é promovido essencialmente pela radiação UV e envolve a participação de

oxigênio como intermediário reativo. A auto oxidação é um fenômeno bastante complexo, envolvendo reações radiculares capazes de auto propagação, e que dependem do tipo de ação catalítica (temperatura, radicais livres, pH). O fenômeno de oxidação primeiramente acontece nos carbonos adjacentes às ligações duplas, mas pode ocorrer também no carbono adjacente ao grupo carboxílico no ácido graxo saturado (SILVA, et al, 1999). O processo começa com a ativação desses centros adjacentes às ligações duplas ou ao grupo carboxílico que ocorre fotoquimicamente (com radiação ultravioleta), ou utilizando outra energia ou meios químicos, essa primeira etapa é denominada Iniciação (ENCICLOPÉDIA MUNDIAL DA OLIVEIRA, 1998). Dois radicais diferentes podem se formar a partir do ácido oleico, os quais depois reagem com o oxigênio atmosférico. Esses radicais peróxidos formados removem um átomo de hidrogênio de duas moléculas de ácidos graxos formando dois novos radicais e dois hidroperóxidos que são relativamente estáveis, etapa chamada de Propagação (Figura 11).

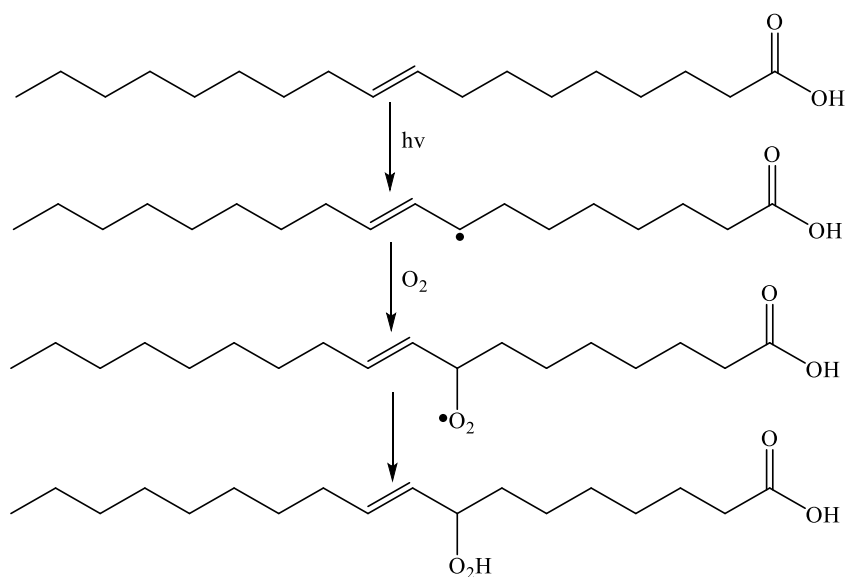


Figura 11 - Esquema das reações que resultam na oxidação de ácido graxo

Assim, o número de peróxidos vai praticamente duplicando ao longo do tempo, podendo ser medido pelo índice de peróxidos. Quando todos os ácidos graxos são oxidados este processo se encerra, denominado de etapa da Conclusão (Figura 12). A fase de iniciação é impedida pelos antioxidantes presentes no azeite (compostos fenólicos) que neutralizam os radicais e também são oxidados através da formação dos seus peróxidos, usualmente mais estáveis já que são estabilizados por ressonância. Eventualmente essa função antioxidante termina, dando início a oxidação dos ácidos graxos (ENCICLOPÉDIA MUNDIAL DA OLIVEIRA, 1998).



Figura 12 - Curva típica de auto oxidação (ENCICLOPÉDIA MUNDIAL DA OLIVEIRA, 1998)

1.7. Parâmetros de Qualidade do Azeite de Oliva

Para determinar a qualidade do azeite existem algumas análises que identificam os produtos primários e secundários da oxidação, a acidez e a atividade antioxidante. Esses métodos são Método Iodométrico para determinação do Índice de Peróxidos, Índice de p-Anisidina, Titulação Ácido-Base para determinação do Índice de Acidez, Método do DPPH e Extinção Específica no ultravioleta, respectivamente. Para o azeite ser comercializado no Brasil, é preciso que os parâmetros de acidez livre, índice de peróxidos e extinção específica no ultravioleta estejam dentro dos limites exigidos pela ANVISA (Tabela 2).

	Azeite de Oliva Extra Virgem	Azeite de Oliva Virgem
Acidez Livre (%)	≤0,8	≤2,0
Índice de Peróxidos (mEq/kg)	≤20,0	≤20,0
Extinção específica no ultravioleta		
270 nm	≤0,22	≤0,25
232 nm	≤2,50	≤2,60

Tabela 2 – Limites de Tolerância de Parâmetros de Qualidade do Azeite de Oliva (adaptado de MAPA, 2012)

1.7.1. Índice de Peróxidos - Método Iodométrico

A iodometria é um método volumétrico indireto, em que excesso de iodeto é adicionado à uma solução contendo um agente oxidante, que reage formando uma quantidade equivalente de iodo o qual será titulado com uma solução padronizada de tiosulfato de sódio (SILVA et al., 1999). O método oficial da determinação do índice de peróxidos em azeite é o Cd 8b-90 da AOCS (Figura 13).

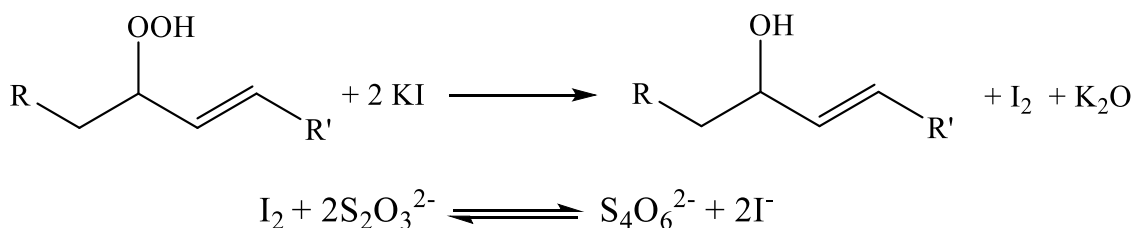


Figura 13 - Oxidação do iodeto pelo peróxido e redução do iodo pelo tiosulfato

Para determinar o ponto final da titulação, o indicador utilizado é uma solução de amido 0,7%. Moléculas que apresentam alta massa molar podem sofrer reações de complexação, com formação de compostos coloridos, como é o caso do amido, um polissacarídeo constituído por dois outros polissacarídeos estruturalmente diferentes: amilose (α -amilose) e amilopectina (β -amilose), que formam complexos de adsorção com o triiodeto (I_3^-). A primeira macromolécula forma um complexo de cor azul intensa, enquanto a segunda, complexo de cor violeta de forma irreversível (ANDRADE et al. 2001). Assim, o amido solúvel comercializado para uso como indicador deve consistir praticamente da amilose, separada da amilopectina. Ao adicioná-lo a solução, complexa com o triiodeto (formado a partir do iodo e do iodeto) formando um composto de coloração azul intensa devido o aprisionamento do triiodeto nas cadeias lineares de amilose (Figura 14). Ao final da titulação todo iodo é consumido pelo tiosulfato e não há mais triiodeto para adsorver no amido, por isso a solução fica incolor. É necessário ajustar o pH na iodometria, pois em meio com alta basicidade o tiosulfato pode ser oxidado a sulfato (SO_4^{2-}).

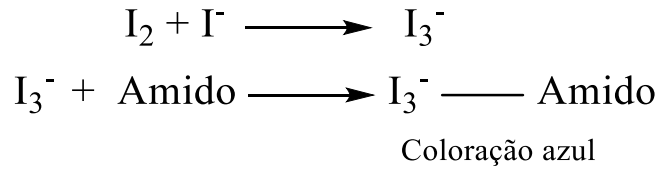


Figura 14 - Formação do triiodeto e do complexo amido-triiodeto

A unidade de medida para o índice de peróxidos, que determina a oxidação inicial de um azeite, é meq O_2 /kg (miliequivalente de oxigênio ativo por quilograma), sendo que para azeite extra virgem o valor deve ser abaixo de 20 meq O_2 /kg. Para calcular esse valor é necessário utilizar a seguinte equação (Equação 1).

$$I.P \left(\frac{\text{meq}O_2}{\text{kg}} \right) = \frac{V \cdot [Na_2S_2O_3] \cdot 1000}{m} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

V= volume em mililitro gasto na titulação

m= massa em gramas da amostra

$[Na_2S_2O_3]$ = concentração da solução de tiosulfato de sódio padronizada

1.7.2. p-Anisidina

A p-anisidina é reagente utilizado para avaliar a presença de produtos de oxidação em óleos. Essa molécula condensa-se prontamente com aldeídos e cetonas (derivados dos hidroperóxidos) formando iminas (bases de Schiff) que absorvem no comprimento de 350 nm (Figura 15) (STEELE, R., 2004).

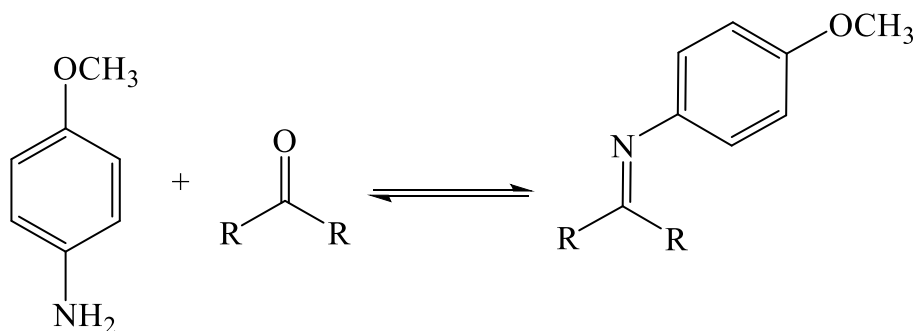


Figura 15 - Esquema de Formação de Imina a partir da reação da p-anisidina com aldeídos e cetonas

O método oficial para a determinação do índice de p-anisidina é o Cd 18-90 da AOCS. Esse índice de p-anisidina (IpA) é calculado pela equação a seguir (Equação 2) e, segundo a IUPAC, um bom óleo deve apresentar IpA menor que 10.

$$IpA = \frac{V(1,2A_b - A_s)}{m} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

V= volume da solução (25 mL)

A_b =absorção da amostra após a reação com o reagente p-anisidina

A_s =absorção da amostra sem p-anisidina

m= massa em gramas da amostra

1.7.3. Índice de Acidez Livre – Titulação Ácido-Base

O grau da acidez de um azeite refere-se à quantidade de ácidos graxos livres presentes nele, estando diretamente relacionado com a rancidez hidrolítica. O método oficial Ca 5a-40 da AOCS é baseado na determinação titulométrica do teor dos ácidos graxos livres existentes na amostra. A titulação ácido-base é um método muito utilizado para determinar a concentração de uma solução ácida ou básica (SANTOS et al., 2018). Como o ácido graxo é um ácido carboxílico é possível determinar sua quantidade no azeite a partir dessa titulação. Utiliza-se uma solução de hidróxido de sódio, previamente padronizada. O hidróxido de sódio reage com os ácidos graxos, neutralizando-o (Figura 16).

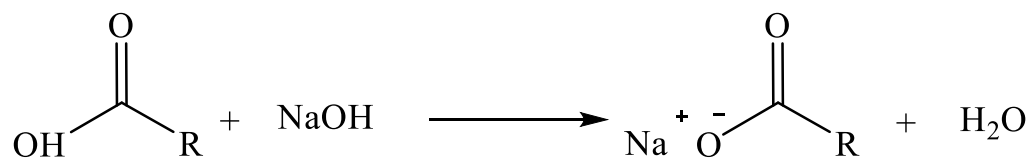


Figura 16 - Reação de neutralização de ácido graxo

Nessa titulação, utiliza-se como indicador uma solução alcoólica de fenolftaleína, molécula que é incolor em pH ácido e possui coloração rosa em pH maior do que 8 (Figura 17). Assim, quando todo o ácido graxo é consumido, qualquer excesso de hidróxido de

sódio irá modificar a cor da solução de incolor à levemente rosa, indicando o ponto final da titulação.

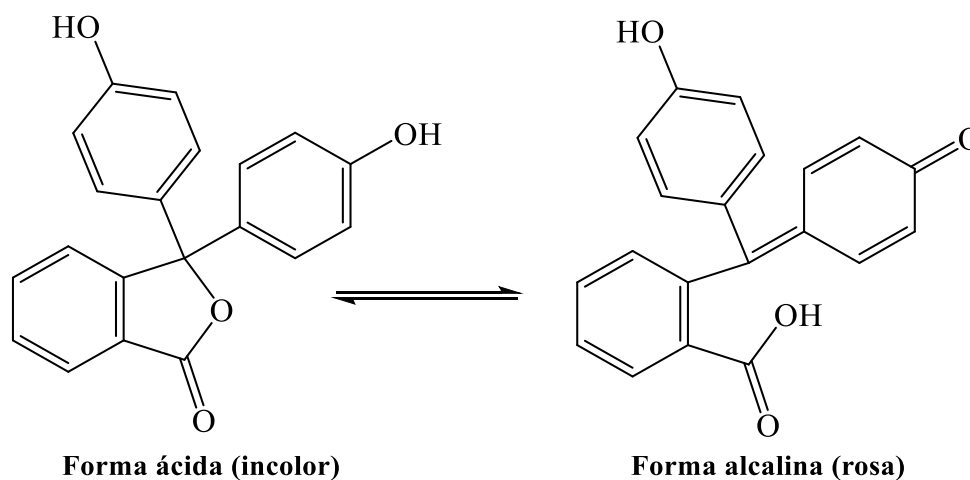


Figura 17 - Diferenças estruturais e de coloração da fenolftaleína de acordo com o pH do meio

Para calcular o índice de acidez livre do azeite, utiliza-se a seguinte equação (Equação 3).

$$I.A (\%) = \frac{V \cdot [NaOH] \cdot 56,1}{m} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

V= volume em mililitro gasto na titulação

m= massa em gramas da amostra

[NaOH] = concentração da solução de hidróxido de sódio padronizada

1.7.4. Capacidade Antioxidante – DPPH

O DPPH é a abreviatura utilizada para o composto químico orgânico 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. Essa molécula é caracterizada como um radical livre estável devido a deslocalização do elétron desemparelhado por toda estrutura. É um pó cristalino de coloração escura que em solução possui a cor púrpura por conta desta deslocalização do elétron, caracterizada por uma banda de absorção com o máximo entre 515 e 520 nm.

Devido à sua característica de radical livre, o DPPH é utilizado para a realização de ensaio antioxidante (BARONI et al., 2020). Este ensaio é baseado na capacidade

antioxidante de uma molécula em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o. Na presença de moléculas antioxidantes, como os compostos fenólicos presentes no azeite de oliva, que possui átomos de hidrogênio disponível para doação (hidrogênio fenólico), ocorre a transferência de um hidrogênio para o DPPH•, desfazendo-se a forma radicalar e obtendo-se a hidrazina, formando o DPPH-H que possui coloração amarelo pálido (Figura 18). Essa reação pode ser monitorada com um estudo cinético em espectrofotômetro onde acompanha-se o decréscimo de absorbância ao longo do tempo (ALVES et al, 2010).

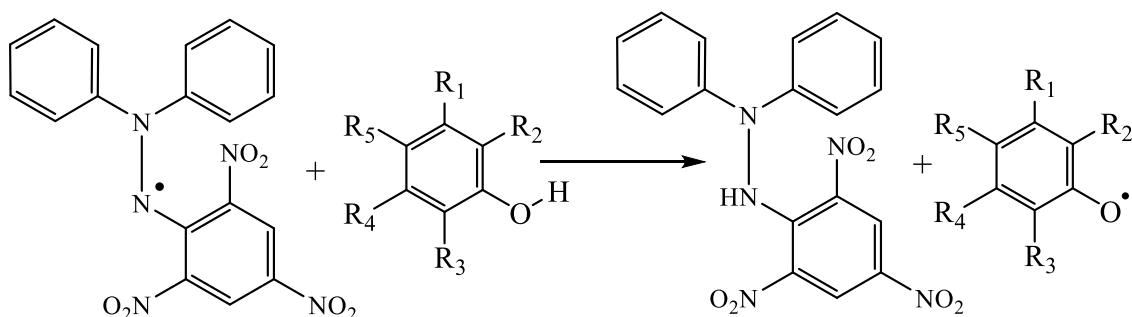


Figura 18 - Reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio, formando o DPPH-H

A capacidade antioxidante do composto é expressa em porcentagem e é determinada pela seguinte equação (Equação 4).

$$\text{Capacidade Antioxidante} = \frac{A_{DPPH} - A_{\text{composto}}}{A_{DPPH}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

A_{DPPH} = absorção da solução de DPPH

A_{composto} = absorção da solução contendo azeite em DPPH

1.7.5. Extinção Específica no Ultravioleta

A extinção específica no ultravioleta é um método utilizado para verificar adulteração do azeite de oliva por outros tipos de gordura, indicando a presença de óleos refinados. Com a utilização de um espectrofotômetro, determina-se a absorção de radiação ultravioleta pelo azeite nos comprimentos de onda 232 nm e 270 nm, sendo o limite máximo de absorção permitido para o azeite de oliva extra virgem de 2,5 e 0,22, respectivamente. O método oficial para determinação dos coeficientes de extinção específica é o Ch 5-91 da AOCS. O coeficiente de extinção determinado a 232 nm está

relacionado com a oxidação primária, por conta da conjugação de ácidos graxos poli-insaturados (Figura 19) (COSTA et al., 2018). Já o coeficiente à 270 nm está relacionado com os produtos secundários de oxidação, indicando a formação de aldeídos e cetonas (PAVIA, et al., 2016). Essa distinção permite diferenciar os estágios de evolução da oxidação (OETTERER et al., 2006).

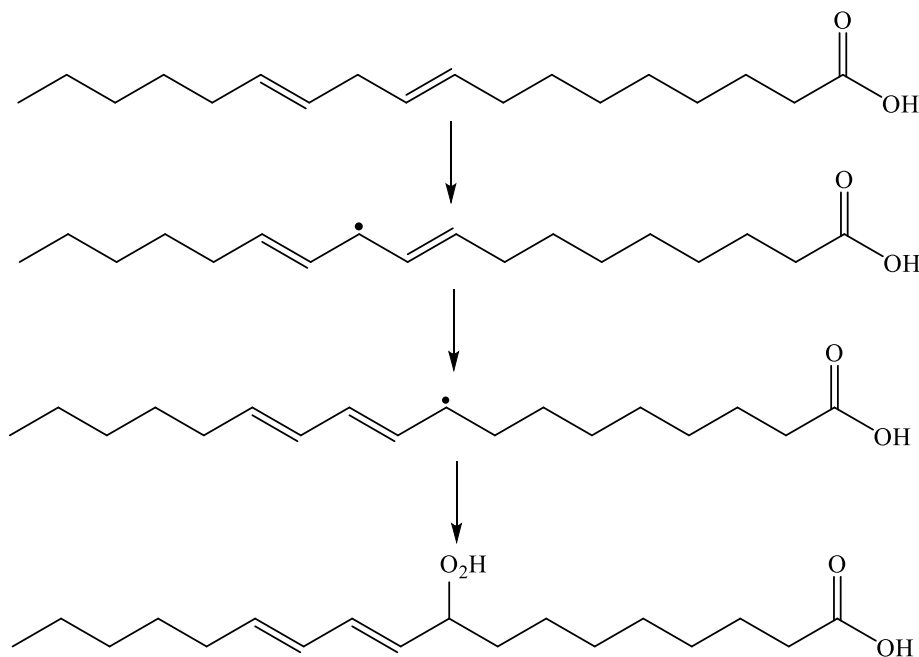


Figura 19 - Conjugação do ácido linoleico durante a oxidação

Durante o refino dos óleos vegetais são formados compostos com ligações conjugadas a partir dos ácidos graxos insaturados ligados ao glicerol (Figura 19). A presença de sistemas dienos conjugados é constatada pelo aumento da absorção dos óleos no espectro ultravioleta à 232 nm (SANTOS et al.,2020). Esse aumento na absorção pode indicar que o azeite de oliva foi refinado gerando esses sistemas de ligações duplas conjugadas ou então, altos valores podem indicar que o produto foi adulterado com óleos ricos em ácido linoleico, já que o azeite de oliva possui uma baixa porcentagem de ácidos poli-insaturados em comparação com outros óleos como o óleo de soja, o óleo de milho e o óleo de girassol (Tabela 3).

	Azeite de Oliva	Óleo de Milho	Óleo de Girassol	Óleo de Soja	Óleo de Algodão	Óleo de Amendoim
Ácido oleico (%)	71,10	35,08	27,65	25,30	22,86	41,69
Ácido linoleico (%)	6,76	44,40	56,30	50,60	50,16	38,46
Ácido linolênico (%)	1,36	1,96	2,06	8,20	1,32	1,17
Total Insaturados (%)	81,74	81,64	86,10	84,15	75,77	81,32

Tabela 3 – Composição dos ácidos graxos insaturados em diferentes óleos vegetais (adaptado de FONSECA et al., 1974)

Os coeficientes de extinção específica do óleo em 232 e 270 nm são calculados segundo a seguinte equação (Equação 5).

$$K_{232} = \frac{A_{232}}{cl} \quad K_{270} = \frac{A_{270}}{cl} \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

K_{232} =Coeficiente de extinção específica a $\lambda=232$ nm

K_{270} =Coeficiente de extinção específica a $\lambda=270$ nm

c= concentração do azeite em g/100mL

l= percurso óptico (1 cm)

Alguns trabalhos estudados avaliaram a qualidade de azeites de oliva de diferentes regiões e outros óleos e gorduras determinando alguns dos cinco parâmetros aprofundados acima. Santos et al. (2017) determinaram o índice de acidez em 10 amostras de óleo de soja, já Lima (2012) avaliou índice de acidez, índice de peróxidos e índice de p-anisidina em 11 amostras de óleo de baru e 11 amostras de óleo de amendoim. Mucciolo et al. (1948) determinaram o índice de peróxidos em 12 amostras de óleo de algodão, 12 amostras de banha e 12 amostras de manteiga. Rodrigues (2016) determina índice de acidez e índice de peróxidos em azeite de oliva em embalagem de plástico cristal e âmbar com e sem controle de luz, já Santos et al. (2018) determinaram índice de acidez e coeficientes de extinção específica em 232 nm e 270 nm em 3 amostras de azeite de oliva produzidas no sul do Brasil. Enquanto, Dabbou et al. (2010) avaliaram a qualidade de 5 azeites de oliva produzidos na Tunísia com diferentes cultivares determinando índice de acidez, índice de peróxido, índice de p-anisidina, coeficientes de extinção específica em

232 nm e 270 nm. Miniotti e Georgiou (2010) determinaram a capacidade antioxidante de 50 azeite de oliva produzidos na Grécia. Antoniasse et al. (1998) avaliaram a qualidade de 44 amostras de azeite de oliva e de óleo composto de soja/oliva através de determinação de índice de acidez, índice de peróxidos e coeficiente de extinção específica em 232 nm e 270 nm. Por fim, Lavelli (2002) determinou capacidade antioxidante, índice de acidez, índice de peróxidos e coeficiente de extinção específica em 232 nm e 270 nm de 11 amostras de azeites de oliva.

Os cinco parâmetros aprofundados nesse estudo são muito importantes para verificação da qualidade de uma amostra de azeite, já que, como visto acima, cada um está conectado a uma reação de degradação do óleo. A partir do momento que o azeite é produzido todos esses parâmetros se alteram ao longo do tempo, seja devido ao ar, a radiação, ao calor ou ao tipo de embalagem. Assim, esse trabalho propõe determinar e avaliar esses cinco parâmetros nas análises de amostras de azeite.

1.8.Extratos medicinais à base de Cannabis

Extratos medicinais à base de *Cannabis sativa L.* estão sendo utilizados no tratamento de várias condições patológicas. Diversos compostos formados no metabolismo secundário da Cannabis são de interesse farmacológico, como o canabidiol (CBD), o tetrahydrocannabinol (THC) e o canabigerol (CBG) (Figura 20). O THC é um psicoativo com propriedades euforizantes que apresenta efeito antiemético e analgésico, enquanto o CBD é um depressor com propriedades anticonvulsivante e ansiolítica (HONÓRIO et al, 2006) e possui efeito antipsicótico e anti-inflamatório (HILL, 2015). Este composto tem sido bastante utilizado em tratamentos para epilepsias (REIS, PANOIRO, 2022) na infância e na adolescência que não respondem a outras terapias disponíveis, principalmente a síndrome de Lennox-Gastaut e a síndrome de Dravet. Estudos têm sido realizados sobre o benefício desse medicamento em doenças de Parkinson e Alzheimer, tratamento de câncer, dor crônica e ansiedade, ainda não havendo comprovação suficiente para recomendar o uso do canabidiol nessas ocasiões (MEISSNER, CASCELLA, 2022). O CBG está presente em apenas 1% da planta, mas com um efeito extremamente potente nos receptores que estão relacionados ao funcionamento do sistema imunológico e dos nervos periféricos. Essa molécula tem efeito anti-inflamatório, antitumoral e reduz a pressão intraocular (ABOUTFARMA, 2021).

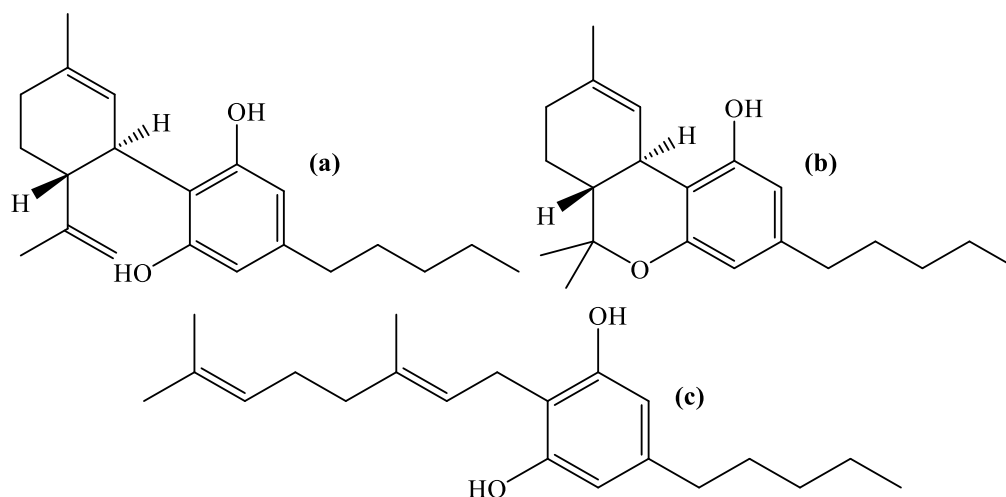


Figura 20 - Estrutura do Canabidiol (a), do Tetrahydrocannabinol (b) e do Canabigerol (c)

No Brasil a importação de extratos medicinais de Cannabis foi regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2015 para tratamento de epilepsias refratárias aos tratamentos convencionais. Um ano depois, incluiu-se na autorização de importação para uso médico pessoal. No ano seguinte, foi registrado no Brasil o medicamento Mevatyl®, indicado para controle da espasticidade na esclerose múltipla, constituído por extrato hidroalcoólico de *Cannabis sativa L.* Em 2022, a ANVISA permitiu que pessoas físicas solicitassem uma autorização, válida por dois anos, para importar produtos derivados de Cannabis.

Segundo os rótulos dos produtos importados de extrato de Cannabis, o veículo mais empregado é o TCM (triglicerídeos de cadeia média), enquanto na preparação artesanal, o óleo de oliva, de coco, de soja ou de girassol (CARVALHO et al, 2020) são os diluentes mais utilizados. A APEPI (Apoio à Pesquisa e Pacientes de Cannabis Medicinal) é uma associação brasileira, fundada em 2014, de pacientes e familiares que fazem uso medicinal da Cannabis. Essa associação tem como missão promover o acesso ao uso medicinal de óleos à base de canabinóides, à pesquisa, aos canais informativos e educacionais com o intuito de desmistificar e conscientizar a sociedade sobre os benefícios dessa planta. A Associação produz extrato medicinal rico em CBD, CBG, THC ou balanceado tendo como veículo de diluição o azeite extra virgem. Esses extratos são derivados das plantas cultivadas de forma orgânica, e a extração é alcoólica.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como foco determinar e avaliar os parâmetros de qualidade do azeite de oliva que será utilizado como diluente de extratos medicinais à base de canabinóides pela APEPI. O azeite de oliva extravirgem foi

selecionado como diluente devido, às suas características antioxidantes, a sua validade e a seu processo de produção não interferir na estrutura dos ácidos graxos e compostos fenólicos.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como principal objetivo determinar e avaliar os parâmetros Índice de Peróxidos, Índice de p-Anisidina, Índice de Acidez, Capacidade Antioxidante e Extinção Específica no Ultravioleta em 15 amostras de azeite de oliva a fim de determinar os parâmetros que possuem uma diferença significativa entre as amostras. Além de averiguar a qualidade de azeite de oliva a ser utilizado como diluente de medicamento a base de compostos extraídos da Cannabis. Futuramente, pretende-se adicionar óleo essencial de alecrim, que possui propriedade antioxidante, como conservante natural para aumentar a validade da solução.

Para que o objetivo principal seja alcançado, é necessário:

- Otimizar alguns parâmetros do método DPPH
- Verificar se os parâmetros Índice de Peróxidos, Índice de Acidez, Índice de p-Anisidina e Coeficientes de Extinção Específica das amostras de azeite estão em concordância com os dados dos rótulos e com os intervalos dos padrões exigidos pela ANVISA e sugerido pela IUPAC.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

- Tiosulfato de sódio penta-hidratado P.A. ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)
- Iodato de potássio P.A. (KIO_3)
- Iodeto de potássio P. A. (KI)
- Amido solúvel P.A.
- Clorofórmio P.A. ($CHCl_3$)
- Ácido acético glacial P.A. (CH_3COOH)
- Ácido sulfúrico P.A. (H_2SO_4)

- Água destilada (H_2O)
- Isoctano P.A. (C_8H_{18})
- p-Anisidina P.A. (C_7H_9NO)
- Hidróxido de sódio P.A. ($NaOH$)
- Hidrogenoftalato de potássio P.A. ($C_8H_5KO_4$)
- Fenolftaleína P.A. ($C_{20}H_{14}O_4$)
- Éter etílico P.A. ($(C_2H_5)_2O$)
- Etanol P.A. (C_2H_5OH)
- DPPH P.A. ($C_{18}H_{12}N_5O_6$)
- Acetato de etila P.A. ($C_4H_8O_2$)

3.2. Materiais

- Cubeta de quartzo 1cm
- Buretas de 25 mL
- Balões volumétricos de 10, 100 e 250 mL
- Erlenmeyers 125 mL
- Béqueres
- Tubos de ensaio com tampas
- Proveta 50 mL
- Frascos âmbar
- Micropipeta
- Conta-gotas
- Espátula

3.3. Equipamentos

- Estufa
- Capela
- Espectrofotômetro UV-Vis
- Chapa de aquecimento
- Balança analítica

3.4.Preparo de Soluções

Solução de tiosulfato de sódio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$

Pesou-se 0,6203 g de tiosulfato de sódio penta-hidratado. Em um balão volumétrico de 250 mL, adicionou-se essa massa e água destilada até atingido o menisco.

Solução de iodato de potássio $0,005 \text{ mol L}^{-1}$

Pesou-se 0,107 g de iodato de potássio seco em estufa. Em um balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se essa massa e água destilada até atingido o menisco.

Solução de amido $0,7\% \text{ m/v}$

Pesou-se 0,7 g de amido solúvel. Adicionou-se um pouco de água destilada até homogeneizar. Adicionou-se à suspensão 100 mL de água quente. Prosseguiu-se o aquecimento sob agitação até que se obteve uma solução clara.

Solução de p-anisidina em ácido acético glacial

Pesou-se 0,025 g de p-anisidina, em um balão volumétrico de 10 mL, dissolveu-se e acertou-se o menisco com ácido acético glacial.

Solução de azeite em isoctano

Pesou-se 1,2 g da amostra em um balão volumétrico de 10 mL, dissolveu-se e acertou-se o menisco com isoctano.

Solução de hidróxido de sódio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$

Pesou-se 0,1 g de hidróxido de sódio. Transferiu-se a para um balão volumétrico de 250 mL e preencheu-se com água destilada até o menisco.

Solução de DPPH $9,35 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em acetato de etila

Pesou-se 3,6869 mg de DPPH. Em um balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se essa massa e acetato de etila até atingir o menisco. (Solução de DPPH válida por 2 semanas).

3.5.Métodos

3.5.1. Determinação de Índice de Peróxido

Padronização da solução de tiosulfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$

Adicionou-se em um Erlenmeyer de 125 mL, 10 mL da solução de iodato de potássio, 1g de iodeto de potássio e 5 mL de solução de ácido sulfúrico 0,5 M (solução formada apresenta cor vinho). Titulou-se imediatamente com a solução de tiosulfato de sódio até que a solução ficou levemente amarelada. Adicionou-se 6 gotas da solução de amido (solução resultante azul esverdeada com a presença de sobrenadante). Continuou-se a titulação até que a solução ficou incolor.

Determinação do índice de peróxidos

Pesou-se 5 g de azeite em um Erlenmeyer de 125 mL. Adicionou-se 15 mL de uma solução 3:2 de ácido acético glacial/clorofórmio. Adicionou-se 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio e repousou-a por 1 minuto no escuro (solução fica levemente alaranjada). Imediatamente adicionou-se 15 mL de água destilada (formação de duas fases). Adicionou-se 6 gotas da solução de amido (solução resultante azul com sobrenadante). Titulou-se até que a solução superior ficou incolor.

3.5.2. Método da p-Anisidina

Determinação do índice de p-anisidina

Em um espectrofotômetro UV, mediu-se a absorvância da solução de azeite em isoctano em 350 nm. Pipetou-se 5 mL da solução da amostra em um tubo de ensaio e 5mL do solvente (isoctano) em outro tubo. Adicionou-se 1 mL da solução de p-anisidina em cada tubo, agitou-se minimamente até completa homogeneização e deixou-se as misturas reagirem por 10 minutos. Após esse tempo, mediu-se a absorvância em 350 nm do primeiro tubo usando o segundo como branco.

3.5.3. Titulação Ácido-Base

Padronização da solução de hidróxido de sódio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$

Pesou-se 0,02 g de hidrogenoftalato de potássio previamente seco em estufa. Transferiu-se a massa para um Erlenmeyer e adicione 50 mL de água destilada. Adicionou-se 3 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína e titulou-se com a solução de hidróxido de sódio até coloração levemente rosa.

Determinação do índice de acidez

Pesou-se 5,0 g da amostra de azeite em um Erlenmeyer de 125 mL e adicione 10 mL de solução 2:1 de éter-etanol. Adicionou-se 3 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína (indicador) e titulou-se com a solução de hidróxido de sódio até atingir coloração levemente rosa.

3.5.4. Capacidade Antioxidante

Determinação da Capacidade Antioxidante

Adicionou-se 4 gotas da amostra de azeite de oliva com uma micropipeta de 20 µL em um frasco âmbar. Utilizando outra micropipeta, pipetou-se 4 mL da solução de DPPH. Em seguida, armazenou-se o frasco em um lugar escuro e esperou-se 2 horas. No espectrofotômetro UV-Vis, mediu-se o branco (acetato de etila) e determinou-se a absorção da solução de DPPH em 515 nm. Após 2 horas, determinou-se a absorção da amostra em 515 nm. Entre cada medida, lavou-se a cubeta de quartzo 2 vezes com acetato de etila para limpá-la muito bem, diminuindo o erro das medidas. Após a lavagem, sempre se ambientou a cubeta.

3.5.5. Extinção Específica no Ultravioleta

Determinação dos coeficientes de extinção específica

Preparou-se uma solução a 1% m/v de azeite de oliva em 10 mL de isoctano. No espectrofotômetro UV, mediu-se o branco (isoctano) e determinou-se a absorção dessa solução em 232 e 270 nm.

3.6. Amostras

Para realizar os testes prévios e otimizar os métodos de análise, 3 amostras de azeite foram adquiridas no comércio local de Brasília-DF (Tabela 4).

Marca	Origem	Composição	Volume	Embalagem	Validade
Andorinha	Portugal	Azeite de oliva extra virgem	500 mL	Vidro Marrom Escuro	30/07/2021 (embalado) a 27/01/2023
Gallo	Portugal	Azeite de oliva extra virgem	500 mL	Vidro Marrom Escuro	06/2021 a 12/2022
Barcelona	Brasil	Azeite de oliva extra virgem	500 mL	Vidro Verde Escuro	09/2021 a 12/2022

Tabela 4 – Amostras de Azeite para Testes Prévios

As 15 amostras a serem analisadas com os parâmetros otimizados foram adquiridas em supermercados de Brasília produzidos em várias regiões, apresentando preços variados, diferentes volumes e embalagens (Tabela 5).

Nº	Marca	Origem	Composição	Preço	Volume	Embalagem	Validade
1	Nova Oliva	Chile	Azeite de oliva extravirgem	28,80	500 mL	Vidro Verde Escuro	26/03/2022 (envasado) a 26/03/2025
2	Vila Flor	Portugal	Azeite de oliva extravirgem	53,90	500 mL	Vidro Marrom Escuro	06/01/2022 (envase) a 06/01/2024
3	Andorinha	Portugal	Azeite de oliva refinado e azeite de oliva virgem	23,19	500 mL	Vidro Marrom Escuro	11/02/2022 (embalado) a 04/08/2023
4	D'Aguirre	Argentina	Azeite de oliva extravirgem	94,49	2 L	Plástico transparente	01/07/2021 (envase) a 01/07/2023
5	Allegro	Tunísia	Azeite de oliva extravirgem	16,59	500 mL	Vidro Verde Escuro	14/01/2022 (envase) a 13/01/2024
6	O-live	Chile	Azeite de oliva extravirgem	22,19	500 mL	Vidro Verde Escuro	11/03/2022 (envase) a 11/03/2025
7	Alva Oliva	Espanha	Azeite de oliva extravirgem	159,90	3 L	Plástico Verde Escuro	07/2021 a 07/2023
8	Terras de Camões	Portugal	Azeite de oliva extravirgem	19,99	500 mL	Vidro transparente	21/01/2022 (envase) a 07/2023
9	Rahma	Tunísia	Azeite de oliva extravirgem	78,00	1 L	Vidro Marrom Escuro	25/01/2022 (envase) a 24/01/2024
10	Rahma	Tunísia	Azeite de oliva extravirgem	134,00	2 L	Plástico Verde Escuro	07/02/2022 (envase) a 06/02/2024
11	Cocinero	Argentina	Azeite de oliva extravirgem	35,90	500 mL	Plástico Verde Escuro	03/02/2022 (envase) a 03/02/2024
12	Gomes da Costa	Espanha	Azeite de oliva extravirgem	29,99	500 mL	Vidro Verde Escuro	01/02/2022 (embalado) a 01/08/2023
13	Borges	Espanha	Azeite de oliva extravirgem	25,99	500 mL	Vidro Verde Escuro	24/01/2022 (envase) a 24/09/2023
14	Herdade esporão	Portugal	Azeite de oliva extravirgem	42,99	500 mL	Vidro Marrom Escuro	24/05/22 (envase) a 01/2024

15	Quinta do Monte	Portugal	Azeite de oliva extravirgem	22,19	500 mL	Vidro Verde Escuro	18/01/2022 (envase) a 18/01/2024
----	-----------------	----------	-----------------------------	-------	--------	--------------------	----------------------------------

Tabela 5 - Amostras de azeite

Ainda, adquiriu-se uma amostra de TCM e uma de óleo de soja, a fim de comparar os parâmetros do azeite de oliva com outros óleos (Tabela 6).

TCM IAO	Brasil	Triglicerídeos de Cadeia Média do óleo de coco C8 (60%) e C10 (40%).	89,90	250 mL	Vidro Transparente	03/2024
Óleo de Soja	Brasil	Óleo de soja (geneticamente modificada a partir de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> e/ou <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e/ou <i>Bacillus thuringiensis</i>), e antioxidantes: TBHQ e ácido cítrico.	5,79	900 mL	Plástico Transparente	12/05/2023 a 06/02/2024

Tabela 6 - Amostras de TCM e Óleo de soja

4. RESULTADOS

Todos os métodos analíticos descritos abaixo foram avaliados utilizando as 3 amostras comerciais de azeite descritas na Tabela 4. Todas as análises foram feitas em triplicata. Os métodos oficiais foram reproduzidos da forma preestabelecida não havendo a necessidade de estudos de parâmetros. Apenas mudou-se o padrão primário do método iodométrico para iodato de potássio, já que não se obteve sucesso na padronização da solução de tiosulfato de sódio ao utilizar o dicromato de potássio como padrão primário. Como o método de determinação da capacidade antioxidante não se enquadra como oficial pela AOCS, optou-se por realizar a otimização de alguns parâmetros baseados nos trabalhos de DABBOU, S. et al. (2010), LAVELLI V. (2002) e MINIOTIA, K. S.; GEORGIOUA, C. A. (2010).

4.1. Atividade antioxidante

4.1.1. Estabilidade da solução de DPPH

Preparou-se uma solução de concentração $9,35 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de DPPH em acetato de etila e confirmou-se que o seu comprimento de absorção máxima é 515 nm (Figura 21).

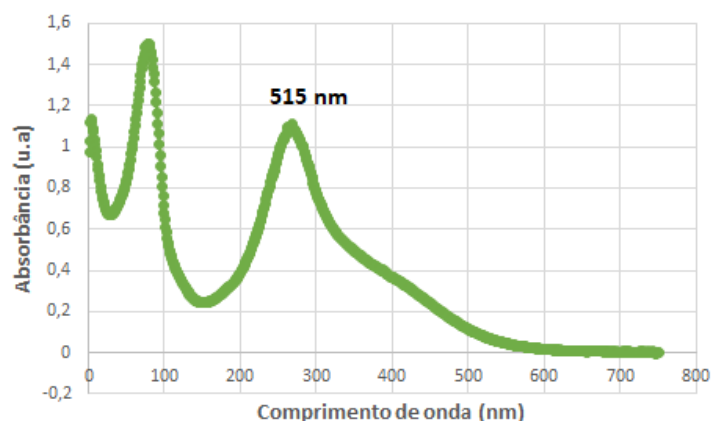


Figura 21 - Espectro UV-Vis do DPPH

Avaliou-se a estabilidade da solução de DPPH, que apesar de ser um radical se mostrou relativamente estável devido a deslocalização do elétron desemparelhado por toda estrutura, ao longo de duas semanas em geladeira. Como os desvios são baixos, conclui-se que a solução pode ser utilizada para as análises durante esse período (Tabela 7).

Dias	Absorbância
0	1,0894
2	1,0983
7	1,0368
14	1,0667
Desvio Padrão	0,0274
Desvio Padrão Relativo	2,5454

Tabela 7 - Solução de DPPH

4.1.2. Precisão das Medidas do Equipamento

Para se determinar a reprodutibilidade da leitura da solução no Espectrofotômetro UV-Vis, mediu-se dez vezes seguida uma solução de DPPH $9,35 \times 10^{-5}M$ em acetato de etila e, também, dez vezes seguida uma solução contendo 2 gotas de azeite em 4 mL de solução de DPPH, em repouso e no escuro por 1 hora. Nesse teste utilizou-se apenas a amostra de azeite Gallo, pois o intuito era observar a reprodutibilidade do equipamento. Observou-se que os desvios são muito pequenos, indicando que as medidas feitas no equipamento são confiáveis (Tabela 8).

	Solução de DPPH	Solução contendo 2 gotas de azeite em 4 mL de solução de DPPH
Desvio Padrão	0,0053	0,0012
Desvio Relativo	0,5133	0,2270

Tabela 8 - Reprodutibilidade do equipamento (n=10)

4.1.3. Número de Gotas

Avaliou-se também qual o número de gotas que fornece uma maior diferença em atividade oxidante entre diferentes azeites com precisão adequada. Com 1 hora de repouso, medindo-se 1, 2 ou 3 gotas com um contador de vidro, a variação da atividade antioxidante entre diferentes azeites é perceptível e todos apresentaram desvios próximos (Figura 22). Porém, percebeu-se que esse tempo não é suficiente para estabilizar as medidas que ainda variam muito em um intervalo pequeno de tempo. Desta forma, acredita-se que esperando mais tempo, 2 gotas será o melhor número para fazer as análises.

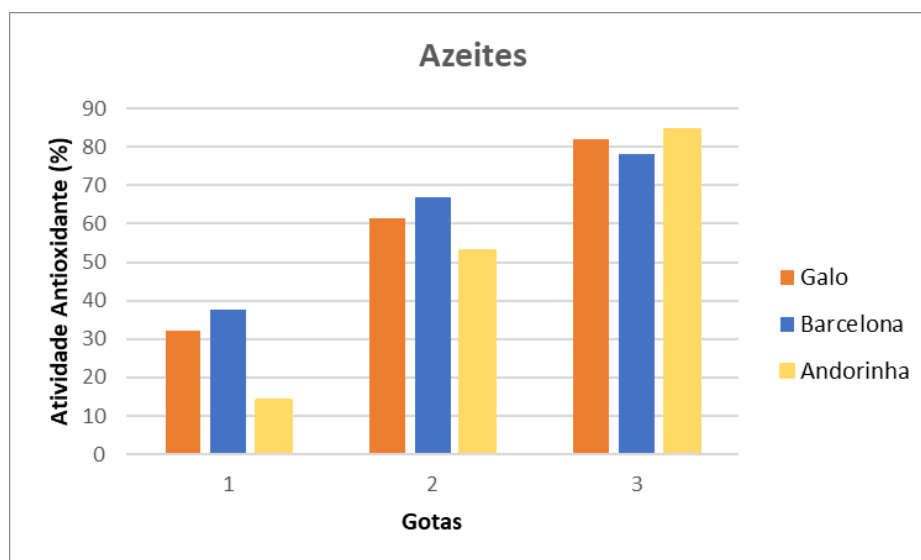


Figura 22 - Gráfico número de gotas

4.1.4. Estudo Cinético

Ainda, foi realizada a curva cinética para averiguação do tempo de equilíbrio da reação. Preparou-se a solução contendo 2 gotas das amostras de azeite e 4 mL de solução de DPPH em acetato de etila e, imediatamente, colocou-a no Espectrofotômetro realizando leituras de intervalo de 1 minuto, com temperatura controlada (23°C) por

12000 segundos. Desta forma foi possível determinar o melhor tempo para deixar a solução reagindo antes da medida, de maneira que a atividade antioxidante varie pouco ao longo do tempo, mas que essa medida seja diferenciável entre as amostras (Figura 23). Assim, com 2 horas (7200 segundos) de repouso se alcança os critérios desejados e um tempo viável para a rotina das análises.

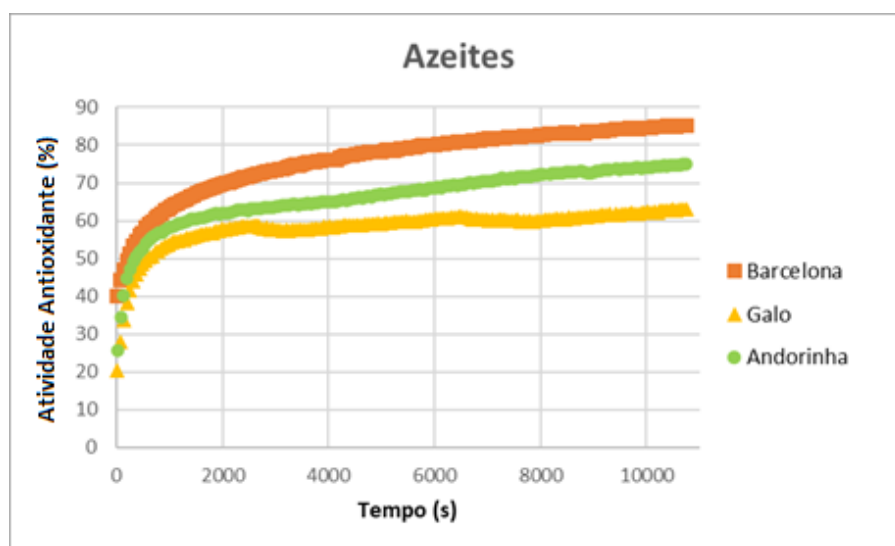


Figura 23 - Gráfico cinética

4.1.5. Precisão da Amostragem

Por fim, para averiguar a precisão na pesagem do azeite em comparação com instrumentos distintos, preparou-se 10 replicatas de azeite para cada medidor diferente de maneira que a massa de amostra coletada fosse o mais próximo possível a duas gotas com o contador de gotas, quantidade de amostra ideal determinada anteriormente. Os medidores analisados foram pipeta de Pasteur (2 gotas), micropipeta (60 μL), contador de gotas de vidro (2 gotas) e micropipeta de 20 μL (4 gotas). Novamente, para esse teste utilizou-se apenas a amostra de azeite Gallo, já que o objetivo era diferenciar a precisão dos instrumentos. Percebe-se que o instrumento de coleta de amostra interfere bastante na precisão do método (Tabela 9), sendo 4 gotas da micropipeta de 20 μL a maneira mais precisa de adicionar as amostras de azeite. Isso se deve a viscosidade do azeite ser superior à da água, o que dificulta os instrumentos aspirarem e expelirem um volume preciso, sendo mais eficiente adicionar pequenas gotas. A precisão da micropipeta de 20 μL (4 gotas) é aproximadamente 1,5; 3,4 e 7,5 vezes maior do que o contador de vidro, a pipeta de Pasteur e a micropipeta de 60 μL , respectivamente. Assim, todas as análises subsequentes para determinação da capacidade antioxidante serão realizadas adicionando-se 4 gotas das amostras de azeite com uma micropipeta de 20 μL e 4 mL de

solução de DPPH em acetato de etila em um frasco âmbar que será deixado em repouso por 2h, no escuro.

	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo
Pipeta de Pasteur (2 gotas)	0,0028	5,9161
Micropipeta (60 µL)	0,0056	13,1751
Contador de Gotas de Vidro (2 gotas)	0,0017	2,6172
Micropipeta de 20 µL (4 gotas)	0,0012	1,7548

Tabela 9 - Amostragem

4.2. Análises dos Azeites

Após a definição das melhores condições experimentais dos cinco métodos a serem aplicados, as 15 amostras da Tabela 5 foram analisadas. As análises das amostras de azeite foram realizadas em quintuplicata e no mesmo dia de abertura da embalagem para evitar alteração dos resultados devido o contato com o ar. A padronização dos titulantes foi feita em triplicata. Os resultados estão apresentados na Tabela 10 e os desvios nas Tabelas 11 e 12.

	Capacidade Antioxidante (CA)	Índice de p-Anisidina (IPA)	Extinção Específica em 232 nm e 270 nm (EE)	Índice de Peróxidos (IP)	Índice de Acidez (IA)	TOTOX
COCINERO	39,8686	6,0461	2,0019/ 0,1172	10,2337	0,6175	26,5135
D'AGUIRRE	39,6506	7,2191	2,0196/ 0,1976	9,9883	0,6887	27,1957
ALLEGRO	85,8615	7,936	2,1704/ 0,2262	8,4277	0,5014	24,7914
DO MONTE	53,5844	8,0077	1,9240/ 0,2339	4,3985	0,5943	16,8047
TERRA DE CAMÕES	66,3494	3,9562	2,1597/ 0,2978	5,5758	0,4142	15,1078
VILLA FLOR	63,2245	4,7288	2,1337/ 0,3218	9,3702	0,6665	23,4692
NOVA OLIVA	72,1287	3,3883	1,6760/ 0,1438	3,3403	0,3271	10,0689
GOMES	79,1333	7,1798	1,6281/ 0,0257	4,9199	0,5441	17,0196
BORGES	59,2574	3,4472	1,8288/ 0,0980	5,9253	0,5490	15,2978
ALVA OLIVA	71,9823	6,524	1,9480/ 0,2124	5,4977	0,3656	17,5194

RAHMA VIDRO	76,6279	7,9096	2,1194/ 0,1898	5,4305	0,5302	18,7706
RAHMA PLÁSTICO	75,2153	3,9294	2,2782/ 0,2121	5,8714	0,5668	15,6722
ESPORÃO	56,3604	5,2184	1,8303/ 0,1653	4,8109	0,3001	14,8402
O-LIVE	47,6548	5,219	1,7038/0,10	2,4254	0,4864	10,0698
ANDORINHA VERMELHO	40,5258	-0,4112	2,1928/ 0,5586	2,5406	0,488	4,67

Tabela 10 - Valores dos Parâmetros das Amostras

De acordo com a Tabela 10, praticamente todas as amostras apresentaram valores para os cinco parâmetros dentro do limite estabelecido pela ANVISA (para azeite de oliva extravirgem: índice de acidez $\leq 0,8$; índice de peróxidos $\leq 20,0$; extinção específica em 232 nm $\leq 2,5$ e em 270 nm $\leq 0,22$) e com índice de p-anisidina recomendado pela IUPAC menor do que 10. Com exceção das amostras Allegro, Quinta do Monte, Villa Flor e Terra de Camões que apresentaram a extinção específica em 270 nm maior do que o valor permitido, o que poderia indicar a presença de azeite de oliva virgem ou de outro óleo, já que esses produtos apresentam EE mais elevados, porém uma alteração apenas nesse parâmetro é insuficiente para inferir algo desse tipo, podendo ser apenas um erro experimental ou um erro aleatório.

O azeite Andorinha Vermelho apresenta em sua composição azeite de oliva virgem e azeite de oliva refinado, portanto os limites dos parâmetros de qualidade do azeite são diferentes. Para azeite de oliva: índice de acidez $\leq 2,0$; índice de peróxidos $\leq 20,0$; extinção específica em 232 nm $\leq 2,60$ e em 270 $\leq 0,25$ e para azeite refinado: índice de acidez $\leq 0,3$; índice de peróxidos $\leq 5,0$ e extinção específica em 270 $\leq 1,1$. A extinção específica em 232 nm não se aplica para azeites refinados, como também o índice de p-anisidina, o que explica o valor negativo (-0,4112) obtido. Todos os parâmetros que são aplicados para esse tipo de amostra estão dentro do limite estabelecido pela ANVISA, considerando os maiores limites, já que a amostra é uma mistura de dois azeites obtidos por processos diferentes. Esse azeite sofreu diversos processos de extração durante o refinamento para corrigir os parâmetros não atendidos devido a problemas climáticos ou de processo. Apesar dessas técnicas não modificarem sua estrutura química, ainda pode haver resquícios de solventes e a porcentagem de moléculas antioxidantes é muito baixa, assim como se visa um óleo mais natural e que seja capaz de conservar o medicamento, não se considera uma boa opção utilizar azeites que não seja extravirgem como diluentes.

As reações envolvidas nos coeficientes de extinção específica em 232 nm e 270 nm ainda não são muito claras no meio acadêmico. Estudando os trabalhos de COSTA et al. (2018), PAVIA et al. (2016), OETTERER et al. (2006) e SANTOS et al. (2020), acredita-se que a absorção em 232 nm é devida a duplas ligações conjugadas formadas durante a oxidação primária e a absorção em 270 nm é devido aos aldeídos e cetonas formados na oxidação secundária. Assim, o primeiro coeficiente estaria relacionado com o índice de peróxidos e o segundo, com o índice de p-anisidina. Porém, como ainda é necessário um estudo mais aprofundado sobre as reações orgânicas, esses parâmetros não são os mais adequados nesse estudo para determinar a qualidade do azeite.

Esperava-se que houvesse uma relação inversa entre os valores dos parâmetros capacidade antioxidante e índice de peróxido das amostras. Pois, como visto na Enciclopédia Mundial da Oliveira os compostos fenólicos responsáveis pela propriedade antioxidante do azeite conseguem neutralizar os radicais gerados na etapa de iniciação da oxidação e seus peróxidos formados são mais estáveis devido a estabilização pela ressonância, atrasando a oxidação em cadeia. Assim, o índice de peróxidos só deveria aumentar consideravelmente quando a capacidade antioxidante estivesse baixa, porém na prática parece que as reações são mais complexas, já que isso não foi observado em todas amostras. As amostras Allegro e Villa Flor, que possuem altos valores de CA, apresentaram o IP maiores do que vários azeites com CA menores. Portanto, os valores de cada parâmetro variaram consideravelmente na amostragem e não foi possível determinar nenhuma relação linear entre eles.

Além dos 5 parâmetros obtidos pelos métodos, calculou-se o valor Totox ($2IP + IPA$), o qual deve ser inferior a 10 para considerar que um corpo graxo do óleo está bem conservado. Seis amostras apresentaram capacidade antioxidante maior do que 70%, quatro amostras tiveram índice de p-anisidina menor do que 4, outras cinco amostras apresentaram acidez menor do que 0,5% e outras cinco amostras tiveram índice de peróxido menor do que 5 meq/kg. Apenas uma das amostras, Nova Oliva, se destacou nos quatro parâmetros, apresentando alta CA (72,1287), baixo IPA (3,3883), baixo IP (3,3403), baixo IA (0,3271) e um valor Totox de 10,0689. A amostra O-live também apresentou um valor Totox de 10,0698, logo seus ácidos graxos estão bem conservados. No entanto, a capacidade antioxidante dessa amostra é muito inferior comparando com a amostragem. Esse parâmetro é muito importante e decisivo ao escolher um azeite, pois se espera que quanto maior a quantidade de compostos fenólicos, maior a capacidade do

azeite preservar os componentes e as propriedades do medicamento, já que se espera que esses compostos possam impedir ou atrasar a oxidação do remédio, aumentando a qualidade e a validade deste. As demais amostras apresentaram valores Totox maiores do que 14,5. Assim, apesar desses quatro parâmetros em todas as amostras estarem abaixo dos valores máximos estabelecidos pela ANVISA, considerando o valor Totox, essas não possuem ácidos graxos bem conservados. No entanto, ainda se considera viável utilizar esses azeites como diluentes. Nas Tabelas 11 e 12, encontram-se os desvios padrão e padrão relativo para cada parâmetro em cada amostra.

	Desvio Padrão CA	Desvio Padrão Relativo CA	Desvio Padrão IPA	Desvio Padrão Relativo IPA	Desvio Padrão EE em 232 nm e 270 nm	Desvio Padrão Relativo EE em 232 nm e 270 nm
Cocinero	1,9564	4,9072	0,2607	4,3122	0,0597/ 0,0227	2,9826/ 19,3356
D'Aguirre	1,8784	4,7374	0,8503	11,7781	0,0178/ 0,01943	0,8822/ 9,8296
Alegro	3,8387	4,4708	1,0129	12,7627	0,1156/ 0,0504	5,3274/ 22,2802
Quinta do Monte	1,0930	2,0397	1,1170	13,9486	0,0879 /0,0738	4,5711 /31,5499
Terra de Camões	3,7647	5,6740	0,2706	6,8397	0,0473 /0,0354	2,1892 /11,8989
Villa Flor	2,2646	3,5818	0,3924	8,2993	0,0804 /0,07732	3,7693/ 24,0277
Nova Oliva	0,7892	1,0942	0,4593	13,5565	0,0340 /0,0292	2,0256/ 20,3059
Gomes	4,1318	5,2213	0,4061	5,6563	0,0249/ 0,0072	1,5278/ 27,8857
Borges	3,7264	6,2885	1,3169	38,2030	0,0453/ 0,0381	2,4758/ 38,8227
Alva Oliva	2,0687	2,8739	0,6513	9,9837	0,0276/ 0,0272	1,4173/ 12,7969
Rahma Vidro	1,9681	2,5684	0,6240	7,8891	0,0088/ 0,0106	0,4140/ 5,5878
Rahma Plástico	5,6201	7,4719	0,9926	25,2605	0,0465/ 0,0758	2,0400/ 35,7343
Esporão	2,3601	4,18762	1,4326	27,4534	0,0377/ 0,0194	2,0614/ 11,7435
O-live	1,0076	2,1143	0,5821	11,1524	0,0395/ 0,0410	2,4081/ 39,5
Andorinha Vermelho	1,2255	3,0240	0,4877	-118,6074	0,0271/ 0,0271	1,2347/ 4,8598

Tabela 11 - Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo dos Parâmetros CA, IPA e EE

	Desvio Padrão IP	Desvio Padrão Relativo IP	Desvio Padrão IA	Desvio Padrão Relativo IA
Cocinero	4,1102	40,1637	0,0982	15,9076
D'Aguires	2,8834	28,8683	0,0488	7,0909
Alegro	0,2331	2,7662	0,0088	1,7507
Quinta do Monte	0,8019	18,2314	0,0615	10,3475
Terra de Camões	1,5863	28,4504	0,0210	5,0732
Villa Flor	1,9685	21,0075	0,6569	2,0682
Nova Oliva	0,4569	13,6793	0,0121	3,7101
Gomes	0,5164	10,4952	0,0405	7,4488
Borges	0,5257	8,8730	0,0176	3,2007
Alva Oliva	1,8874	34,3307	0,0661	18,0769
Rahma Vidro	1,4738	27,1402	0,0133	2,5147
Rahma Plástico	0,6148	10,4717	0,0244	4,2987
Esporão	1,0205	21,2129	0,0280	9,3240
O-live	0,7027	28,9715	0,0129	2,6533
Andorinha Vermelho	0,3932	15,4759	0,0385	7,9016

Tabela 12 - Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo dos Parâmetros IP e IA

Percebe-se que os desvios variam bastante para cada parâmetros na amostragem (Tabelas 11 e 12). Além disso, não existe uma relação entre os desvios dos diferentes parâmetros para cada amostra, podendo variar entre baixos e altos valores. Isto mostra a complexidade das reações relacionadas a cada um dos cinco experimentos e a complexidade das amostras. Apesar disso, a extinção específica em 232 nm, a capacidade antioxidante, e o índice de acidez foram os parâmetros que apresentaram os menores desvios padrão relativo (média de 2,3551 para a EE em 232 nm, média de 4,0170 para a CA e 6,7578 para o IA), sendo os métodos mais precisos. Enquanto que os outros parâmetros apresentaram uma média dos desvios padrão relativo maior do que 20.

4.3. Análise do TCM e Óleo de Soja

Foram realizadas em quintuplicata as análises dos cinco métodos nas amostras de triglicerídeos de cadeia média (TCM) e óleo de soja a fim de comparar os resultados com as amostras de azeite. Já que os produtos importados de extrato de *Cannabis* costumam utilizar TCM e algumas preparações artesanais utilizam óleo de soja como diluente. Os resultados estão apresentados na Tabela 13 a seguir.

	Capacidade Antioxidante (CA)	Índice de p-Anisidina (IPA)	Extinção Específica em 232 nm e 270 nm (EE)	Índice de Peróxidos (IP)	Índice de Acidez (IA)	TOTOX
TCM	3,8073	-1,749	1,8008/ 0,0592	0,0378	0,0407	-1,6734
ÓLEO DE SOJA	87,2265	0,4944	0,7932/ 1,35	1,2499	0,0748	2,9942

Tabela 13 - Valores dos Parâmetros para o TCM e o Óleo de Soja

Os triglicerídeos de cadeia média são ésteres de ácidos graxos de glicerol que contêm de 6 a 12 carbonos sem ligações insaturadas (TURPEINEN, MERIMAA, 2011). Assim, a ausência de ligações duplas, a homogeneidade, estabilidade e simplicidade da mistura, comparada com o azeite, são responsáveis pelos baixos valores de IP, IA e EE. O IPA não se aplica a esse produto. Em contrapartida, o TCM não apresenta moléculas antioxidantes e o seu preço de mercado é muito caro, chegando a ser mais de 6 vezes maior do que o preço do azeite Nova Oliva no mesmo volume, tornando-o inviável para utilizá-lo como diluente. O óleo de soja, apesar de ter um valor muito menor do que o azeite, sendo quase 9 vezes mais barato que o azeite Nova Oliva, e possuir valores de CA, IPA, IP e IA excelentes é um produto com uma validade muito baixa, de 5 a 8 meses, e que sofreu diversos processos, principalmente de extração, filtração com solventes, durante o refinamento. Além de conter em sua composição antioxidantes TBHQ e ácido cítrico, produtos sintéticos adicionados para impedir a oxidação do óleo de soja, provavelmente responsáveis pelos valores dos parâmetros, que esse estudo prefere optar por evitá-los. Assim, devido a essas características do óleo de soja, prefere-se escolher um diluente mais natural. Portanto, optou-se por utilizar o azeite de oliva extravirgem como diluente já que é um óleo natural produzido por um processo de extração a frio que preserva suas moléculas com propriedades antioxidantes. Além disso, as marcas desse tipo de azeite costumam apresentar uma validade de 1 ano e meio a 3 anos e várias marcas apresentam valores adequados para os 5 parâmetros estudados.

4.4. Análise de Componentes Principais (PCA)

Análise de Componentes Principais (PCA) é uma técnica quimiométrica de análise multivariada que pode ser usada para analisar inter-relações entre um grande número de variáveis, explicando-as em termos de suas dimensões inerentes (componentes), além de reconhecer padrões não supervisionado transformando tabela

de dados experimentais em gráficos informativos acerca da similaridade entre as amostras com relação aos resultados dos parâmetros analisados (BEEBE et al, 1998). Como este trabalho envolveu cinco parâmetros diferentes que foram analisados em 15 amostras, utilizou-se o Software Matlab aplicação do PCA com o objetivo de condensar os parâmetros mais relevantes em um número reduzido de novas variáveis. No dendrograma (Figura 24), observou-se que as amostras se agruparam em três grupos (1º grupo: Gomes, Borges, Esporão, Alva Oliva e Nova Oliva; 2º grupo: Villa Flor, Rahma Plástico, Camões, Do Monte, Rahma Vidro e Allegro; 3º grupo: D’Aguirre e Cocinero).

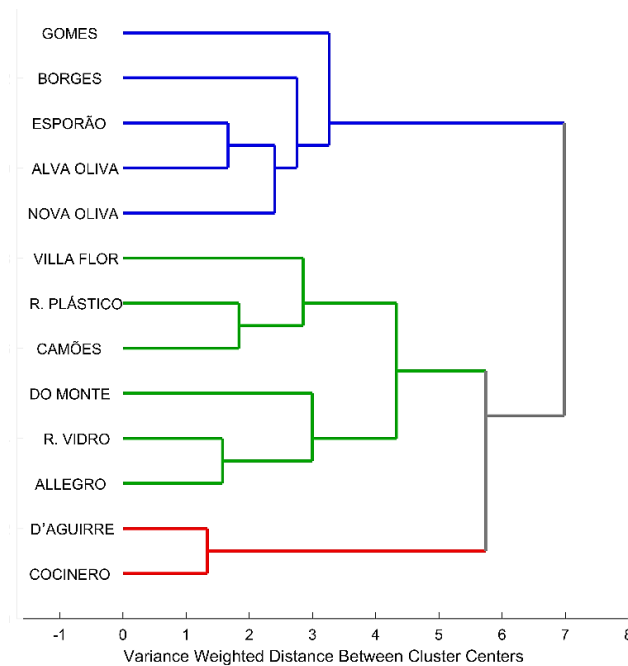


Figura 24 - Dendrograma para amostras de Azeite

No Biplot dos dados (Figura 25), com as componentes principais 1 e 2 (PC1 e PC2), percebe-se que a amostra Nova Oliva se destaca por ser a que apresenta o score mais negativo em PC1, provavelmente, devido à alta CA e aos baixos valores IPA, IP e IA.

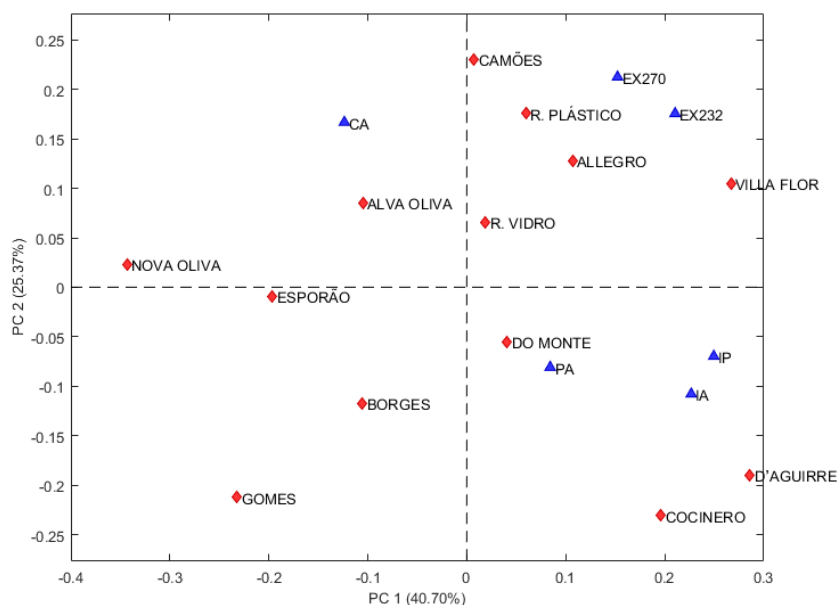


Figura 25 - Biplot dos dados: Amostras de Azeite

Apesar das PC1 e PC2 só representarem 66,07% (Tabela 14) da variância acumulada, o gráfico de escores da informação apenas dessas componentes apresenta uma distribuição das amostras que é condizente com o observado no dendograma (Figura 24). Essa concordância mostra que a informação presente nas outras componentes não influencia significativamente na distribuição das amostras de acordo com os parâmetros estudados.

	% variância explicada	% variância acumulada
PC 1	40.70	40.70
PC 2	25.37	66.07
PC 3	17.37	83.44
PC 4	8.84	92.28
PC 5	4.96	97.24
PC 6	2.76	100.00

Tabela 14 - Percentagem de variância capturada pelo modelo PCA

Os pesos apresentados na Figura 26 mostram qual a importância dos parâmetros CA, IP, IPA, IA, EE 232 e 270 na componente principal 1, sendo o índice de peróxidos, o índice de acidez, o coeficiente de extinção específica em 232 nm e a capacidade antioxidante os mais influentes nos escores dessa componente.

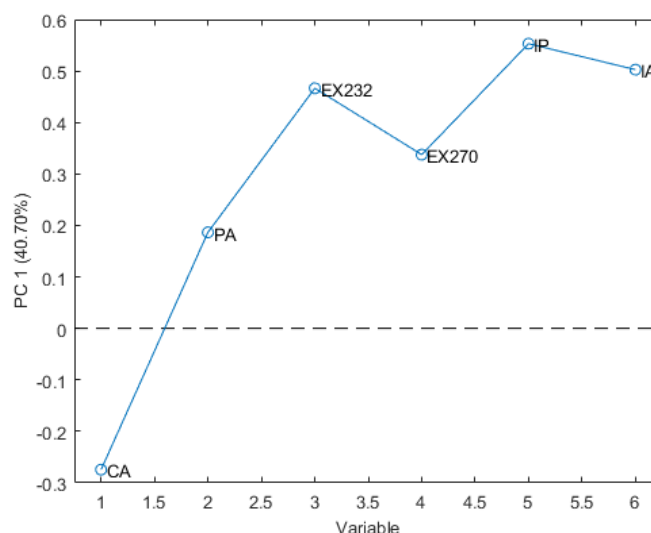


Figura 26 - Componente Principal 1

4.5. ANOVA e Teste Tukey

A Análise de Variância (ANOVA) é um teste de significância utilizado para comparar mais de duas médias de populações e determinar se existe ou não diferenças entre essas médias (SKOOG et al, 2004). Assim, foi realizada a ANOVA no Excel para comparar se os valores para cada amostra de azeite são realmente diferentes para cada parâmetro estudado. O princípio da ANOVA é comparar as variações entre os diferentes níveis dos fatores (marcas de azeite) com aqueles dentro dos níveis do fator (replicatas para cada azeite). A ANOVA mostra que os parâmetros de cada amostra são significativamente diferentes entre as amostras, já que todas apresentaram F maior do que F crítico (1,8993) e valor-p menor do que 0,05 (Tabela 15).

	F	Valor-p	Fator explica % da variação do parâmetro
Capacidade Antioxidante	123,0682	$3,14 \cdot 10^{-36}$	96,62
Índice de p-Anisidina	21,58224	$3,41 \cdot 10^{-17}$	83,36
Extinção Específica em 232 nm	66,42859	$3,83 \cdot 10^{-29}$	70,15
Extinção Específica em 270 nm	16,72847	$8,9 \cdot 10^{-15}$	90,43
Índice de Peróxidos	10,12298	$1,77 \cdot 10^{-10}$	93,91
Índice de Acidez	40,6855	$9,97 \cdot 10^{-24}$	79,52

Tabela 15 - F, valor-p e % que a marca do azeite explica a variação do parâmetro

Portanto, como a ANOVA indicou uma diferença significativa, procedimento de comparação múltipla deve ser empregado para identificar quais médias específicas são diferentes. O procedimento escolhido foi o teste Tukey, que consiste em comparar todos

os possíveis pares de médias e baseia-se na diferença mínima significativa, levando em conta os percentis do grupo (Tukey, 1949). Ao realizar o teste Tukey, utilizando o programa Jamovi, percebe-se na análise da capacidade antioxidante que 56 pares de amostras são significativamente diferentes entre si dos 81 pares existentes. Já na análise do índice de p-anisidina, 25 pares de amostras são significativamente diferentes entre si. Na análise do índice de peróxido, apenas 11 pares de amostras são diferentes entre si. Na análise do índice de acidez, 44 pares de amostras são significativamente diferentes entre si. Na análise da extinção específica em 232 nm, 45 pares de amostras são significativamente diferentes entre si. Por fim, na análise da extinção específica em 270 nm, 20 pares de amostras são significativamente diferentes entre si. Sabendo-se dessas informações, considera-se que as análises da capacidade antioxidante, índice de acidez e extinção específica em 232 nm, que possuem mais da metade dos pares de amostras significativamente diferentes, são as mais adequadas a serem realizadas. Esse resultado corrobora com o resultado de variância acumulado do PCA. Porém, como discutido anteriormente é preciso compreender melhor as reações envolvidas no coeficiente de extinção específica, logo, o parâmetro EE em 232 nm não será utilizado.

5. CONCLUSÃO

Os métodos analíticos oficiais foram aplicados nas 15 amostras de azeite de oliva, na amostra de TCM e na amostra de óleo de soja. Com a otimização de alguns parâmetros do método do DPPH para determinação da capacidade antioxidante, obteve-se resultados precisos. Os valores dos parâmetros avaliados CA, IPA, EE em 232 nm e 270 nm, IP e IA variaram consideravelmente na amostragem e não foi possível determinar nenhuma relação linear entre eles. Praticamente todas as amostras apresentaram valores para os cinco parâmetros dentro do limite estabelecido pela ANVISA, com exceção de quatro amostras que apresentaram a extinção específica em 270 nm maior do que o valor permitido, o que pode ser apenas um erro experimental ou um erro aleatório. Porém, os valores de Totox foram muito acima do indicado, na maioria das amostras, para que o óleo possua ácidos graxos bem conservados, com exceção de duas amostras.

Apesar do TCM ser muito utilizado como diluente devido a sua estabilidade e seus baixos valores de IP, IA e EE, esse produto não apresenta moléculas antioxidantes e o seu

preço de mercado é muito caro comparado com o azeite de oliva, tornando-o inviável para utilizá-lo como diluente. O óleo de soja, mesmo possuindo valor de mercado muito menor do que o azeite e possuir valores de CA, IPA, IP e IA excelentes, é um produto com uma validade muito baixa, de 5 a 8 meses, e que sofreu diversos processos agressivos durante o refinamento, além de conter em sua composição antioxidantes sintéticos. Portanto, o trabalho opta por escolher um diluente mais natural, o azeite de oliva extravirgem, já que é um óleo produzido por um processo de extração a frio que preserva suas moléculas com propriedades antioxidantes. Além de que as marcas de azeite costumam apresentar uma validade de 1 ano e meio a 3 anos e várias marcas apresentam valores adequados para os parâmetros estudados.

A PCA realizada transformou a tabela de dados experimentais dos parâmetros em gráficos informativos acerca da similaridade entre as amostras e as respectivas variáveis responsáveis por isso. Os parâmetros foram condensados em PC 1 e PC 2 que são suficientes para o estudo. As amostras de azeite foram agrupadas em 3 grupos, onde a amostra Nova Oliva se destaca das outras, provavelmente, devido à alta CA e aos baixos IPA, IP e IA.

A ANOVA mostra que a diferença entre todos os parâmetros das amostras é significativa, já que todas apresentaram F maior do que F crítico (1,8993). O teste Tukey realizado em sequência determinou que as análises do índice de p-anisidina, do índice de peróxidos e da extinção específica em 270 nm apresentam menos da metade dos pares de amostras significativamente diferentes, enquanto que as análises da capacidade antioxidante, do índice de acidez e da extinção específica em 232 nm apresentam mais da metade dos pares de amostras significativamente diferentes. Logo, esses três últimos parâmetros são os mais adequados a serem determinados. No entanto, conforme discutido, é preciso compreender melhor as reações envolvidas no coeficiente de extinção específica, logo, este parâmetro não será utilizado.

Então, em estudos futuros, conclui-se que se pode realizar apenas as análises da Titulação Ácido-Base para determinação do Índice de Acidez e o Método do DPPH para a determinação de Capacidade Antioxidante para se obter resultados que diferenciam sistematicamente entre as amostras. Com isso, realiza-se um menor número de análises para averiguação do melhor azeite extra virgem para ser usado como diluente em extrato medicinal de CBD, THC ou CBG.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AboutFarma. **Canabigerol mostra efeito terapêutico para doenças inflamatórias**. 12 de maio de 2021. Disponível em: <https://www.aboutfarma.com.br/secaomobile/medicamentos/3342/canabigerol-mostra-efeito-terapeutico-para-doencas-inflamatorias>. Acesso em: 04 de julho de 2023.

ALVES, C. Q. et al. **Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos**. Quim. Nova, Vol. 33, No. 10, 2202-2210, 2010

ALVES, G. A. **Conheça a olivicultura brasileira, um mercado de expansão promissora**. maio 31, 2021. Disponível em: <https://blog.verde.ag/consultores-do-agro/conheca-a-olivicultura-brasileira-um-mercado-de-expansao-promissora/>. Acesso em: 20 de agosto de 2022.

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY (AOCS). **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**, 5. Ed. Champaign: AOCS, 2004

ANDRADE, J. C. **Determinações Iodométricas**. Chemkeys. Licenciado sob Creative Commons (BY-NC-SA), 2001

ANTONIASSI, R.; PEREIRA, D. A.; SZPIZ, R. R.; JABLONSKA, F. H.; LAGO, R. C. A. **Avaliação das Características de Identidade e Qualidade de Amostras de Azeite de Oliva**. Braz. J. Food Technol., Campinas, 1(1,2): 32-43, jan/dez.1998

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada- RDC N° 327**, de 9 de dezembro de 2019.

AUED-PIMENTEL, S. et al. - **Azeite de oliva: incidência de adulterações entre os anos de 1993 a 2000**. Rev. Inst. Adolfo Lutz, Rev. Inst. Adolfo Lutz, 61(2):69-75, 2002

BALLUS, C. A., MEINHART, A. D., DE SOUZA CAMPOS, F. A., DA SILVA, L. F. D. O., DE OLIVEIRA, A. F., & GODOY, H. T. **A quantitative study on the phenolic compound, tocopherol and fatty acid contents of monovarietal virgin olive oils produced in the southeast region of Brazil**. Food Research International, v.62, p.74–83, 2014

BARONI, N. F.; MARTINS, I. M.; MACEDO, J. A. **Potencial bioativo de azeites de oliva extra virgem produzidos no Brasil**. UNICAMP, Tecnologia de Alimentos: Tópicos Físicos, Químicos e Biológicos - Volume 3, 2020

Beebe, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B.; **Chemometrics: a practical guide**, Wiley: Weinheim, 1998.

CARDOSO, C. S.; DIAS, M. F. P. **Série Agronegócios do Sul, Cadeia da Olivicultura**, 2018.

Carvalho, V. M.; Aguiar, A. F. L.; Baratto, L. C.; Souza, F. L. C.; Rocha, E. D. **QUANTIFICAÇÃO DE CANABINOIDES EM EXTRATOS MEDICINAIS DE Cannabis POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**. Quim. Nova, Vol. 43, No. 1, 90-97, 2020

CHAGAS, C. **Como é Produzido o Azeite de Oliva?** 2021. Disponível em: <https://www.emporiodoazeite.com.br/blog/saiba-o-processo-de-elaboracao-azeite-oliva-extra-virgem>. Acesso em: 12 de agosto de 2022.

COSTA, L. V. et al. **Pigmentos e Extinção Específica em Óleos de Abacate e Azeite de Oliva**. UPF. X Simpósio de Alimentos. Refinaria de Alimentos Indústrias Sustentáveis. v.10 (2018)

COUTINHO, E. F.; RIBEIRO, F. C.; CAPPELLARO, T. H. (Ed.). **Cultivo de Oliveira (Olea europaea L.)** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009

DABBOU, S.; BRAHMI, F.; TAAMALI, A.; ISSAOUI, M.; OUNI, Y.; BRAHAM, M.; ZARROUK, M.; HAMMAMI, M. **Extra Virgin Olive Oil Components and Oxidative Stability from Olives Grown in Tunisia**. J Am Oil Chem Soc (2010) 87:1199–1209

ENCICLOPÉDIA MUNDIAL DA OLIVEIRA. **Conselho Oleícola Internacional**. Plaza & Janés Editores, S. A. Edição em língua portuguesa, junho de 1998

EUROPEAN COMMISSION. **Olive Oil**. 2022

FELLOWS, P. J. Embalagem. In: FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos**. São Paulo: Artmed, 2006. p. 473-521.

FONSECA, H.; GUTIERRE, L. E. **Composição em Ácidos Graxos de Óleos Vegetais e Gorduras Animais**. Anais da E. S. A. Luiz de Queiroz, volume XXXI, 1974

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Os tipos e os efeitos da rancidez oxidativa em alimentos.** Food Ingredients Brasil, [s.i], v. 29, n. [], p.38-45, mar. 2014

FREIRE, P. C. M.; MANCINI-FILHO, J.; FERREIRA, T. A. P. C. **Principais alterações físico-químicas em óleos e gorduras submetidos ao processo de fritura por imersão: regulamentação e efeitos na saúde.** Revista de Nutrição, [s.l.], v. 26, n. 3, p.353-358, jun. 2013

FUENTES, E., PAUCAR, F., TAPIA, F., ORTIZ, J., JIMENEZ, P., & ROMERO, N. **Effect of the composition of extra virgin olive oils on the differentiation and antioxidant capacities of twelve monovarietals.** Food Chemistry, v.243, p.285-294, 2018.

Hill, K. P. **Medical Marijuana for Treatment of Chronic Pain and Other Medical and Psychiatric Problems: A Clinical Review.** JAMA - J. Am. Med. Assoc. 2015, 313, 2474

Honório, K. M.; Arroio, A.; Silva, A. B. F. **ASPECTOS TERAPÊUTICOS DE COMPOSTOS DA PLANTA Cannabis sativa.** Quim. Nova 2006, 29, 318.

INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL. **World Trade in Olive Oil.** Madrid/27.01.2022 Disponível em: <https://www.internationaloliveoil.org/world-trade-in-olive-oil-2/>. Acesso em: 20 de agosto de 2022.

JOÃO, P. L. **Nota Técnica: Evolução da Produção de Azeite de Oliva no RS: 2010 – 2022.** Estado do Rio Grande do Sul, Seapdr/RS, Programa Estadual de Desenvolvimento da Olivicultura, 2022

LAVELLI, V. **Comparison of the Antioxidant Activities of Extra Virgin Olive Oils.** J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 7704–7708

LIMA, J. C. R. **Efeitos dos Parâmetros da Extração e Avaliação da Qualidade Física e Química dos Óleos de Baru e Amendoim.** Universidade Federal de Goiás Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 2012

MEISSNER, H.; CASCELLA, M. **Cannabidiol (CBD).** Julho, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556048/>. Acesso em: 25 de agosto de 2022.

MELLO, L. D.; PINHEIRO, M. F. **Aspectos de azeites de oliva e de folhas de oliveira.** Alim, Nutr., Araraquara, v.23, n.4, p. 537-548, out./dez. 2012

MINIOTI, K. S.; GEORGIU, C. A. **Comparison of different tests used in mapping the Greek virgin olive oil production for the determination of its total antioxidant capacity.** GRASAS Y ACEITES, 61 (1), ENERO-MARZO, 45-51, 2010

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Instrução Normativa 1/2012. Sistema Integrado de Legislação.** 01/02/2012. Disponível em: <https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=629707739#:~:text=MODO>. Acesso em: 02 de setembro de 2022.

Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO-RDC Nº 270.** 22 de setembro de 2005. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0270_22_09_2005.html. Acesso em: 03 de julho de 2023.

MUCCIOLO, P.; RIBEIRO, P. A.; BONOLDI, V. **Determinação Iodométrica do Índice de Peróxidos e Óleo de Caroço de Algodão, Banha e Manteiga.** Rev. Fac. Med. Vet. S. Paulo — Vol. 3, fase. 4, 1948

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** 1ª ed. São Paulo: Manole, 2006. 664p.

OLIVEIRA da Silva, L. F. O.; OLIVEIRA, A. F.; Pio, R.; ALVES, T. C.; ZAMBON, C. R. **Variação na qualidade do azeite em cultivares de oliveira.** Bragantia, Campinas, v. 71, n. 2, p.202-209, 2012

PAVIA, Donald, L. et al. **Introdução à espectroscopia.** Disponível em: Minha Biblioteca, (2nd edição). Cengage Learning Brasil, 2016.

REIS, M.; PANOEIRO, J. **Canabidiol (CBD): o que é, para que serve e efeitos colaterais.** Julho, 2022. Disponível em: <https://www.tuasaude.com/canabidiol/>. Acesso em 20 de agosto de 2022.

RODRIGUES, G. M. **DETERMINAÇÃO DE ÍNDICES DE ACIDEZ E DE PERÓXIDO EM AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM ACONDICIONADO EM EMBALAGENS PLÁSTICAS SOB DIFERENTES EXPOSIÇÕES À LUZ.** Trabalho de conclusão de curso – Instituto Federal de São Paulo, Barretos, 2016

SANTOS, G.M.; BRITO, M. M.; SOUZA, P. V. L.; BARROS, N. V. A. **Determinação do índice de Acidez em Óleos de Soja Comercializados em Supermercados Varejistas**. Rev Ciên Saúde, 2017;2(2):11-14

SANTOS, I. C. et al. **Acidez, Índice de Iodo e Coeficiente de Extinção Específica em Azeites de Oliva Produzidos no Sul do Brasil**. XXVII Congresso de Iniciação Científica, UFPEL, 2018.

SANTOS, P. C.; TOSATO, F.; CESCO NETTO, M.; CORREÂ, T.; SANTOS, F. D.; LACERDA Jr, V.; PIRES, A. A.; RIBEIRO, A. V. F. N.; FILGUEIRAS, P. R.; ROMÃO, W. **Determinação da autenticidade de amostras de azeite comerciais apreendidas no estado do espírito santo usando um espectrofotômetro portátil na região do NIR**. Quim. Nova, Vol. 43, No. 7, 891-900, 2020

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. **Métodos para Avaliação do Grau de Oxidação Lipídica e da Capacidade Antioxidante**. QUÍMICA NOVA, 22(1) (1999)

Skoog, Douglas A; West, Donald M.; Holler F. James. **Fundamentos de Química Analítica**; 8ª ed. (2004), Cap7, p 148-152.

STEELE, R. **Understanding and Measuring the Shelf-Life of Food**. Woodhead Publishing in Food Science and Technology Series. Woodhead Publishing. p. 136, 2004

Tukey, J. W. **Comparing Individual Means in the Analysis of Variance**. Biometrics. Vol. 5, No. 2 (Jun., 1949), pp. 99-114

Turpeinen, A.; Merimaa, P. **Functional Foods - Concept to Product**. 16 - Functional fats and spreads (Second edition). Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 2011, Pages 383-400

VOSSSEN, P. **Olive Oil: History, Production, and Characteristics of the World's Classic Oils**. HORTSCIENCE VOL. 42(5) AUGUST 2007