

**Área: Ciência de Alimentos**

## **PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE AZEITES EXTRA VIRGEM MONOVARIETAIS PRODUZIDOS NO SUL DO RS**

**Rosane Lopes Crizel\*; Eliane Lemke Figueiredo; Giovana Paula Zandoná; Paula Mendonça Shild; Rogerio Oliveira Jorge; Fábio Clasen Chaves**

*Laboratório de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças,, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia 'Eliseu Maciel', Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS*

*\*E-mail: rosanecrizel1@hotmail.com*

**RESUMO** – Aos compostos fenólicos do azeite de oliva são atribuídos benefícios à saúde como prevenção de diversas doenças, além de estarem relacionados às características sensoriais do produto. Como a produção de azeites de oliva é recente no Brasil ainda não se têm um perfil de qualidade definido, logo o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de compostos fenólicos por LC-MS/MS em azeites de oliva extra virgem monovarietais produzidos no sul do Rio Grande do Sul. Foram identificados oito compostos fenólicos, sendo os flavonoides o grupo mais abundante em todas as espécies avaliadas. A apigenina representa 75% do total dos compostos fenólicos avaliados na cultivar Arbosana e a luteolina foi o segundo composto mais abundante nas amostras de azeites. O hidroxitirosol foi único composto identificado abaixo do limite de quantificação. A cultivar Arbequina apresentou maior teor de ácidos fenólicos, com exceção do ácido vinílico, onde o maior teor foi observado na cultivar Arbosana. O flavonoide apigenina foi encontrado em maior concentração na cultivar Arbosana, enquanto que a luteolina e o tirosol predominaram na cultivar Arbequina.

**Palavras-chave:** azeite de oliva, compostos fenólicos, cromatografia líquida, espectrometria de massas

### **1 INTRODUÇÃO**

O azeite de oliva é o produto da extração de frutos de azeitona e é considerado uma das melhores fontes de ácidos graxos e antioxidantes naturais, como compostos fenólicos e tocoferóis. Sua composição se divide em duas frações: a fração saponificável (98-99%) e a fração não saponificável (1-2%). A primeira consiste em triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos livres, enquanto que a fração não saponificável é formada por pigmentos, compostos voláteis, polifenóis, tocoferóis e esteróis. Dentre esses últimos, os compostos fenólicos têm despertado interesse devido às suas propriedades antioxidantes e vários estudos têm sido realizados demonstrando seus efeitos benéficos (BALLUS et al., 2014; TORRECILLA et al., 2015).

Os compostos fenólicos de azeites de oliva extra virgem (sigla do inglês EVOO) são metabólitos especializados aos quais são atribuídos diversos benefícios como prevenção de doença cardíaca coronária, doenças crônicas, câncer, inflamação crônica, derrames e outras doenças degenerativas (SERVILI et al., 2014;

FUENTES et al., 2018). Além disso, contribuem nas propriedades sensoriais como sabor e aroma, visto que estão relacionados à adstringência e ao amargor (FUENTES et al., 2018).

Os polifenóis são os principais compostos responsáveis pela atividade antioxidante em EVOO onde oleuropeína e derivados ligstrosídicos são os mais abundantes. A presença destes antioxidantes no EVOO dependem de fatores agrônômicos e climáticos (FUENTES et al., 2018). Os antioxidantes presentes no EVOO atrasam a reação de auto-oxidação, inibindo a formação de radicais livres ou interrompendo a propagação dos mesmos (FUENTES et al., 2018).

A produção de EVOO está concentrada nos países Mediterrânicos, como a Espanha, Itália e a Grécia, onde se encontra o maior volume de produção. Recentemente, países fora do Mediterrâneo iniciaram produção de azeite de oliva. Seguindo essa tendência, o Brasil começou sua produção, atualmente são cultivados cerca de 3000 hectares, divididas em áreas localizadas nas regiões sul e sudeste do país. Porém, os azeites produzidos no país ainda não têm um perfil de qualidade estabelecido. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de compostos fenólicos por LC-MS/MS em azeites de oliva extra virgem monovarietais produzidos no sul do Rio Grande do Sul.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados azeites de oliva monovarietais das variedades Frantoio, Koroneike e Picual da safra de 2017, cultivadas no município de Pinheiro Machado, RS (coordenadas geográficas: 31° 34' 42" S e 53° 22' 52" W; 439 m de altitude). A extração dos azeites foi realizada no laboratório de azeites da Embrapa Clima Temperado, utilizando o sistema Abencor, através da ruptura e centrifugação dos frutos, constituído de um moinho MM-100, um termobater TB 100 e uma centrífuga CF-100 (MC2, Ingenieria y Sistemas, Sevilha, Espanha) com posterior decantação e filtração. Após as amostras foram embaladas em fracos âmbar e transportadas até o Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LaCEM).

Para extração dos compostos pesou-se 2,50 g de azeite e adicionou-se 2,0 mL de uma mistura metanol:água (70:30) e 2,0 mL de hexano. Agitou-se vigorosamente por um minuto e manteve-se sob agitação lenta por mais 20 minutos. Após este período realizou-se a centrifugação da amostra a 7000  $\times$  g a 4,0 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e filtrado através de membrana de nylon 0,22  $\mu$ m (AllCrom, St. Louis, Mo, EUA).

Dez microlitros do extrato foram injetados em cromatógrafo a líquido de ultra-alta eficiência (Shimadzu, Prominence) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (tipo quadrupolo-tempo de voo) (Impact HD). Os compostos foram separados em uma coluna Luna C18, utilizando solução de ácido fórmico em água (0,1% v/v, eluente A) e de acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (eluente B) como fase móvel. O fluxo utilizado foi de 0,2 mL min<sup>-1</sup> e a temperatura da coluna foi de 40 °C. Para separação foi utilizado um gradiente: 0,00 min – 10% B, 0,01 – 10,00 min, 75% B, 15,00 – 18,00 min, 90% B, 18,00 – 21,00, 90% B, 21,01- 23,00 min, 10% B, permanecendo por 7 minutos nessa condição.

O espectrômetro de massas foi operado no modo negativo, com espectros adquiridos ao longo de uma faixa de massa de  $m/z$  50 a 1200. Os parâmetros de aquisição foram: voltagem do capilar 4 kV, pressão do gás de nebulização (N<sub>2</sub>) de 2 bar, gás de secagem em 8 L min<sup>-1</sup>, temperatura da fonte de 180°C, colisão de RF de

150 Vpp; transfer 70 mS e armazenamento pré-pulso de 5 mS. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10mM, cobrindo toda a faixa de aquisição de  $m/z$  50 até 1200. Além disso, experimentos automáticos de MS/MS foram realizados ajustando os valores de energia de colisão como se segue:  $m/z$  100, 15 eV;  $m/z$  500, 35 eV;  $m/z$  1000, 50 eV, e usando nitrogênio como gás de colisão.

A identificação dos compostos ácido cafeico, ácido ferulico, ácido hidroxibenzóico, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, ácido siríngico, apigenina, hidrotirosol, luteolina e tirosol foi realizada por comparação com padrões externos (Sigma Aldrich) e curvas de calibração foram utilizadas para quantificação.

Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e quando significativos aplicou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para a comparação de médias utilizando o software Statistic versão 8.0.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada por espectrometria de massas no modo de ionização negativo e padrões comerciais foram utilizados para confirmação dos mesmos. A Tabela 1 apresenta os dados dos 8 compostos identificados nas amostras de azeites de oliva, incluindo tempo de retenção, fórmula molecular,  $m/z$  experimental e teórico, erro e mSigma. Entre os ácidos fenólicos, encontram-se três derivados do ácido hidroxibenzóico (ácido hidroxibenzoico [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  137,0248, ácido vanílico [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  167,0357, ácido siríngico [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  197,0450) e três derivados do ácido hidrocinâmico (ácido cafeico [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  179,0352, ácido *p*-coumarico [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  163,0411 e ácido ferulico [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  193,0515). No grupo dos flavonoides, foram identificados duas flavonas (apigenina [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  269,0455 e luteolina [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  285,0426). Além disso, dois álcoois fenólicos foram encontrados (hidroxitirosol [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  153,0560 e tirosol [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  137,0608).

Tabela 1: Compostos fenólicos identificados LC-MS/MS em azeites extra virgem monovarietais

Identificação	TR [min]	Fórmula Molecular	$m/z$ Experimental	$m/z$ Teórica	Erro (ppm)	mSigma
Ácido hidroxibenzóico	7,94	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	137,0248	137,0244	3,0	5,4
Tirosol	8,05	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	137,0616	137,0608	6,1	19,7
Ácido cafeico	8,49	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	179,0352	179,0350	-1,2	24,9
Ácido vanílico	8,60	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	167,0357	167,0350	4,1	14,2
Ácido <i>p</i> -coumarico	9,30	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	163,0411	163,0401	6,2	7,2
Luteolina	10,66	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	285,0426	285,0405	7,3	37,0
Ácido ferulico	9,72	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	193,0515	193,0506	4,3	23,2
Ácido siríngico	9,95	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	197,0450	197,0455	2,0	19,9
Hidroxitirosol	11,19	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>	153,0560	153,0557	1,9	13,5
Apigenina	11,30	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	269,0468	269,0455	4,7	13,2

TR - tempo de retenção

mSigma - semelhança de perfil isotópico – quanto menor o valor maior a similaridade

A quantificação dos compostos fenólicos nas amostras de azeites está apresentada na Tabela 2. Entre os compostos avaliados, os flavonoides foram o grupo mais abundante em todas as espécies avaliadas, apigenina representa 75% do total dos compostos avaliados na cultivar Arbosana. O teor de luteolina variou de 1,2 (Coratina) a 5,4 (Arbequina) mg kg<sup>-1</sup> e foi o segundo composto mais predominante em amostras de azeites. Os outros compostos quantificados representam menos de 30% do conteúdo total em todas espécies. Hidroxitirosol foi único composto identificado abaixo do limite de quantificação.

A cultivar Arbequina apresentou maior teor de ácidos fenólicos em relação as outras cultivares avaliadas, com exceção do ácido vanílico, onde a maior teor foi observado na cultivar Arbosana. O flavonoide apigenina foi encontrado em maior concentração na cultivar Arbosana, enquanto que a luteolina e o tirosol o maior teor foi na cultivar Arbequina.

Tabela 2: Quantificação dos compostos fenólicos (mg kg<sup>-1</sup>) em azeites extra virgem produzidos no Sul do RS

Compostos	Arbequina	Arbosana	Coratina
Ácido cafeico	0,02 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,01 ± 0,00 <sup>b</sup>
Ácido ferulico	0,15 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,07 ± 0,00 <sup>c</sup>
Ácido Hidroxibenzóico	1,77 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,69 ± 0,00 <sup>b</sup>
Ácido p-coumarico	0,61 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>b</sup>
Ácido siringico	1,09 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>b</sup>
Ácido vanílico	0,27 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,44 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>b</sup>
Apigenina	4,8 ± 0,2 <sup>b</sup>	16,8 ± 1,3 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,10 <sup>c</sup>
Hidroxitirosol	NQ	NQ	NQ
Luteolina	5,40 ± 0,12 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,37 <sup>b</sup>	1,22 ± 0,03 <sup>c</sup>
Tirosol	0,83 ± 00 <sup>a</sup>	0,16 ± 00 <sup>b</sup>	0,12 ± 0,00 <sup>c</sup>

\*Médias de três repetições ± desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05). NQ – não detectado, abaixo do limite de detecção.

Os compostos fenólicos são importantes na estabilidade oxidativa dos azeites, além de contribuir nas características sensoriais, visto que são responsáveis pelo amargor dos azeites. Esses compostos são influenciados por vários fatores como cultivar, grau de maturação, condições edafoclimáticas e condições de processamento.

Ballus et al. (2015) avaliaram o perfil de compostos fenólicos de diferentes cultivares (Arbequina, Koroneike, Manzanilha e Coratina) e observaram que a cultivar Coratina cultivada no RS apresentou o maior teor desses compostos. Estes resultados diferem dos encontrados nesse trabalho, onde a cultivar Coratina foi a que apresentou menor teor dos compostos avaliados.

Peres et al. (2016) avaliaram compostos fenólicos individuais em diferentes estádios de maturação e observaram que azeites provenientes de estádios iniciais de maturação apresentam os maiores teores. A análise

de compostos fenólicos também foi utilizada para discriminação de origem de azeites no Marrocos (BAJOUB et al., 2015).

Romero et al. (2016) ao avaliarem a influência da cultivar, estágio de maturação e origem geográfica sobre o teor de compostos fenólicos de azeites chilenos observaram que a origem geográfica (clima) foi o que mais influenciou na concentração dos compostos. Esses resultados são o oposto de azeites produzidos na bacia do Mediterrâneo, onde as cultivares e não a proveniência geográfica explica a grande variabilidade dos compostos (SERVILI et al., 2014).

Franco et al. (2014) avaliaram azeites espanhóis de diferentes cultivares e observaram para cultivar Arbequina 1,34 e 1,95 mg kg<sup>-1</sup> de hidroxitirosol e tirosol, respectivamente. No presente trabalho, foram observados valores inferiores de hidroxitirosol e tirosol para cultivar arbequina. Dentre vários fatores que influenciam o perfil de compostos fenólicos destaca-se a precipitação pluvial, onde na Espanha é de 293 a 677 e no Brasil de 1330 a 1691 mm. Com isso, o maior conteúdo de água nas azeitonas, diminuem a concentração de compostos fenólicos no azeite, devido esses compostos apresentarem maior afinidade com a água em relação ao óleo.

## 4 CONCLUSÃO

Foram identificados e quantificados por LC-MS oito compostos fenólicos e dentre eles os flavonoides apigenina e luteolina foram os compostos predominantes nos azeites independente da cultivar. A cultivar Arbequina apresentou maior teor de compostos fenólicos comparado as outras espécies avaliadas. Estes resultados demonstram que além do fator ambiental há contribuição genética para variabilidade de composição fenólica em azeites.

## 5 AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas, ao CNPq e a Capes pela concessão de bolsas.

## 6 REFERÊNCIAS

BAJOUB, A., PANCORBO, A. C., AJAL, E. A., OUAZZANI, N., GUTIÉRREZ, A. F. Potential of LC-MS phenolic profiling combined with multivariate analysis as an approach for the determination of the geographical origin of north Moroccan virgin olive oils. **Food Chemistry**, v.166, p.292-300, 2015.

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.

BALLUS, C. A., QUIRANTES-PINÉ, R., BAKHOUCHE, A., DA SILVA, L. F. D. O., DE OLIVEIRA, A. F., COUTINHO, E. F., CROCE, D. M., SEGURA-CARRETERO, A & GODOY, H. T. Profile of phenolic compounds of Brazilian virgin olive oils by rapid resolution liquid chromatography coupled to

electrospray ionisation time-of-flight mass spectrometry (RRLC-ESI-TOF-MS). **Food Chemistry**, v.170, p.366–377, 2015.

SERVILI, M., SORDINI, B., ESPOSTO, S., URBANI, S., VENEZIANI, G., DI MAIO, I., SELVAGGINI, R., TATICCHI, A. Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. **Antioxidants**, v.3, p.1-23, 2014.

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.

FRANCO, N., GALEANO-DÍAZ, T., LÓPEZ, O., FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J., SÁNCHEZA, J., DE MIGUEL, C., GILE, V., MARTÍN-VERTEDOR, D. Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. **Food Chemistry**, v.163, p. 289-298, 2014.

PERES, F., MARTINS, L. L., MOURATOB, M., VITORINO, C., ANTUNES, P., FERREIRA-DIAS, S. Phenolic compounds of ‘Galega Vulgar’ and ‘Cobrançosa’ olive oils along early ripening stages. **Food Chemistry**, v.211 p. 51–58, 2016.

ROMERO, N., SAAVEDRA, J., TAPIA, F., SEPÚLVEDAA, B., APARICIO, R. Influence of agroclimatic parameters on phenolic and volatile compounds of Chilean virgin olive oils and characterization based on geographical origin, cultivar and ripening stage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.96, p.583–592, 2016.

SERVILI, M., SORDINI, B., ESPOSTO, S., URBANI, S., VENEZIANI, G., DI MAIO, I., SELVAGGINI, R., TATICCHI, A. Atividades biológicas de compostos fenólicos de azeite extra-virgem. **Antioxidants**, v. 3, p. 1-23, 2014.

TORRECILLA, J. S., VIDAL, S., AROCA-SANTOS, R., WANG, S. C., CANCELLA, J. C. Spectroscopic determination of the photo degradation of monovarietal extra virgin olive oils and their binary mixtures through intelligent systems. **Talanta**, v.144, p.363-368, 2015.