

## **TIPIFICAÇÃO DE AZEITES EXTRA VIRGEM MONOVARIETAIS PRODUZIDOS NO SUL DO RS**

**Eliane Lemke Figueiredo\*;** Rosane Lopes Crizel; Giovana Paula Zandoná; Marina Franco Galli; 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: elianelemke@outlook.com.br*

**RESUMO** – Azeites extra virgem são óleos vegetais extraídos de azeitonas exclusivamente por processos mecânicos ou físicos e devem apresentar acidez máxima de 0,8%. O Brasil é o terceiro maior importador de azeite e a produção nacional é recente, pouco se conhecendo da composição, perfil de compostos bioativos e potencial antioxidante dos azeites aqui produzidos. Logo, o objetivo deste estudo foi avaliar o teor de compostos bioativos e a atividade antioxidante de seis cultivares de azeite de oliva extra virgem monovarietais produzidos no Sul do Rio Grande do Sul. Os azeites das cultivares Arbequina e Coratina apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos, havendo moderada correlação entre esses compostos e a capacidade de captura dos radicais ABTS e DPPH. O azeite da cultivar Arbosana foi o que apresentou maior capacidade antioxidante e os maiores teores de carotenoides. A coloração dos azeites de oliva das diferentes cultivares variou entre verde amarelado e amarelo esverdeado, condizente com as diferentes concentrações dos pigmentos carotenoides e clorofilas encontrados. Diante disso, pode-se concluir que há variabilidade de composição dos azeites conforme a cultivar. Pode ser que o local de cultivo das mesmas também contribua para a qualidade composicional do azeite de oliva obtido.

**Palavras-chave:** *Olea europaea* L.; clorofilas; carotenoides; compostos fenólicos; capacidade antioxidante.

### **1 INTRODUÇÃO**

O óleo vegetal extraído dos frutos da oliveira (*Olea europaea* L.) exclusivamente por processos mecânicos ou físicos, sob controle de temperatura e possuindo acidez expressa em ácido oleico de até 0,8% é denominado de azeite (de oliva) extra virgem. Diferentemente, a maioria dos óleos vegetais comestíveis são extraídos com solventes e passam por processo de refino (BRASIL, 2012).

O azeite é consumido em mais de 160 países, sua produção mundial ultrapassa 3,1 milhões de toneladas, o que representa 1,7 por cento da produção total de gorduras vegetais e animais comestíveis (184 milhões de toneladas). Esses números mostram a importância econômica do setor oleícola e sua posição relevante no cenário internacional (COI, 2016).

No Brasil, atualmente estão sendo cultivados cerca de 3.000 hectares com oliveiras, divididas em áreas localizadas nas regiões sul e sudeste do país. Dois terços dessa área fica no Rio Grande do Sul, especialmente em municípios da metade Sul. No entanto, essa produção ainda representa pouco perto da demanda existente no mercado brasileiro, visto que o Brasil se encontra como terceiro maior importador de azeites, importando cerca de 60 mil toneladas (Pró-oliva, 2016).

O azeite de oliva apresenta em sua composição ácido oleico, ácido  $\alpha$ -linolênico e compostos fenólicos, que apresentam capacidade antioxidante e aos quais são atribuídos vários benefícios à saúde dos consumidores (BECCARIA et al., 2016). Dentre esses benefícios, destacam-se o combate a tipos de câncer, ao envelhecimento, ao mau colesterol e a doenças cardíacas (CASABURI, et al., 2013).

A composição química de azeites de oliva depende de fatores agrônômicos, condições edafo-climáticas, variedade, estágio de maturação da azeitona, fatores tecnológicos relacionados com a extração, como o método e tipo de equipamentos utilizados, bem como das condições de colheita, armazenamento e transporte do produto (ROMERO et al., 2016). Os azeites produzidos na Europa, principalmente na Espanha e na Grécia são considerados referência no setor oleícola. Os parâmetros de qualidade que trazem distinção a esses azeites são: acidez, índice de peróxidos, absorção de luz ultravioleta (K270 e K232), análise sensorial, conteúdo de tocoferóis e fenóis, pigmentos, composição de ácidos graxos, esteróis, ceras, trilinoleína, triglicerídeos, estigmastadienos e esterenos (QUIRANTES-PINÉ et al., 2013).

O azeite produzido no Brasil ainda não tem um perfil de qualidade estabelecido, apesar disso, o produto obtido no país tem se destacado, obtendo resultados superiores aos importados em teste de qualidade realizado recentemente pela Proteste (Associação Brasileira de Defesa do Consumidor) (EPAMIG, 2013). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o teor de compostos bioativos e a atividade antioxidante de seis cultivares de azeite de oliva extra virgem monovariais produzidos no Sul do Rio Grande do Sul.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Azeitonas das variedades Arbequina, Arbosana, Coratina, Koroneiki, Frantoio e Picual cultivadas no município de Pinheiro Machado, RS (coordenadas geográficas: 31° 34' 42" S e 53° 22' 52" W: 439 m de altitude), na safra de 2017, foram colhidas em ponto de maturação comercial e diretamente encaminhadas a Embrapa Clima Temperado, onde foi realizada a extração dos azeites, no Laboratório de Azeites. Para a extração foi utilizado um sistema em batelada, que consiste de três etapas: na primeira, a trituração dos frutos, utilizando um moinho de martelo, seguida pela maceração da pasta de azeitona em um termobatedor por um período de 30 min em temperatura ambiente, e na última, foi efetuada a centrifugação da pasta, a 1300  $\times$  g. A seguir os azeites foram filtrados, envasados e transportados até o Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LaCEM) da UFPel, onde permaneceram sob congelamento em frascos de vidro âmbar até o momento de análise.

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método de Singleton e Rossi (1965) que consiste na reação com o reagente Folin-Ciocalteu. Para a extração pesou-se 2,50 g de azeite e adicionou-se 2,0 mL de solução metanol:água (70:30) e 2,0 mL de hexano. Agitou-se vigorosamente por 1,0 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. A fase hidroalcolica foi coletada e utilizada para reação. A quantificação foi feita a partir

de curva de calibração com padrão de ácido gálico (reagido com o Folin-Ciocalteu) analisada em espectrofotômetro a 725 nm, sendo os resultados expressos em mg equivalente de ácido gálico (EAG) kg<sup>-1</sup> de amostra.

A capacidade antioxidante foi determinada segundo o método descrito por Brand-Williams et al. (1995), utilizando o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Foram utilizados 100 mL de azeite misturados à 3,9 mL de solução de DPPH em metanol (0,13 mM) (absorbância de 1,100 ± 0,02 à 517 nm). A absorbância foi determinada em espectrofotômetro em 517 nm, após 30 minutos de reação. A quantificação foi feita com base em uma curva de calibração utilizando o Trolox como antioxidante padrão. Os resultados foram expressos mM trolox g<sup>-1</sup>. O potencial antioxidante também foi determinado pelo método que mede a capacidade de inibição do radical livre 2,2-azinobis, 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) (RE et al., 1999). Para esta análise 0,1 mL de azeite foram adicionados à 3,9 mL de solução de ABTS em etanol (7 mM) (com absorbância de 0,700 ± 0,05). A solução foi homogeneizada e após 6 min de reação no escuro, a absorbância foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 734 nm. Os resultados foram expressos mM trolox g<sup>-1</sup> baseado em curva de calibração utilizando padrão de trolox e diferentes concentrações para captura do radical ABTS.

Para determinação do teor de carotenoides totais pesou-se 2,5 gramas de azeite de oliva e dissolveu-se em 10 mL de solução isooctano:etanol (3:1, v/v). Em seguida, foi realizada a leitura em 450 nm, usando como referência o solvente puro, segundo metodologia descrita por Rodrigues-Amaya (2001). O conteúdo total de carotenoides foi determinado pela equação 2:

$$\text{Carotenoides Totais (mg.kg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Abs} \times \text{V (mL)} \times 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100 \times \text{P (g)}}$$

Em que: Abs = absorbância; V = volume da solução (10 mL); A<sub>1cm</sub><sup>1%</sup> = coeficiente de absorção (2500, equivalente ao carotenoide majoritário β-caroteno); P = peso da amostra. Os resultados foram expressos em mg kg<sup>-1</sup> de β-caroteno.

Na determinação do teor de clorofilas totais pesou-se 2,5 gramas de azeite de oliva e dissolveu-se em 10 mL de ciclohexano. A absorção da solução foi determinada a 670 nm, usando como referência o solvente puro, segundo metodologia descrita pela AOCS (1992). Os resultados foram expressos em mg kg<sup>-1</sup>.

A coloração dos azeites foi determinada utilizando colorímetro (Minolta Chromometer Modelo CR 300) no padrão CIE-L\*a\*b\*. O equipamento fornece os valores a, b e L. Valores L\* representam luminosidade (L\*=0 é preto e L\*=100 é claridade total) e a\* e b\* foram utilizados no cálculo do ângulo Hue [°Hue = tan<sup>-1</sup>(b\*/a\*)].

Os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e quando significativo aplicou-se o teste de média Tukey a 5 % de significância e correlação de Pearson, utilizando o programa SAS.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Azeites das cultivares Arbequina e Coratina apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos 73,6 e 68,2 mg EAG por 100 g<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 1). Segundo Ballus et al., (2014) o teor desses compostos é influenciado pela cultivar, anos de safra, região cultivada, técnicas agrícolas e maturidade do fruto na colheita. Esses compostos estão relacionados com a qualidade nutricional e sensorial do produto, visto que evitam os processos de auto-oxidação e foto-oxidação do azeite, exercendo atividade antioxidante (LARA-ORTEGA et al., 2016).

Tabela 1: Compostos bioativos, capacidade antioxidante e cor de azeites de olivas extra virgem monovarietais produzidos no Sul do RS

Determinações	Arbequina	Coratina	Arbosana	Frantoio	Koroneike	Picual
Comp. Fenólicos <sup>1</sup>	73,6±2,2 <sup>a</sup>	68,2±7,4 <sup>a</sup>	56,0±1,4 <sup>b</sup>	31,0±3,9 <sup>c</sup>	56,3±0,9 <sup>b</sup>	29,0±6,0 <sup>c</sup>
DPPH <sup>2</sup>	14,3±0,8 <sup>c</sup>	18,0±0,5 <sup>b</sup>	22,0±0,3 <sup>a</sup>	9,7±0,9 <sup>d</sup>	16,0±0,5 <sup>bc</sup>	15,3±0,6 <sup>bc</sup>
ABTS <sup>3</sup>	18,0±0,2 <sup>c</sup>	62,3±4,3 <sup>a</sup>	68,6±0,2 <sup>a</sup>	17,0±1,2 <sup>c</sup>	48,8±0,1 <sup>b</sup>	20,1±1,2 <sup>c</sup>
Carotenoides <sup>4</sup>	3,8±0,1 <sup>e</sup>	6,8±0,1 <sup>d</sup>	15,7±0,4 <sup>a</sup>	8,0±0,3 <sup>c</sup>	6,4±0,1 <sup>d</sup>	12,2±0,0 <sup>b</sup>
Clorofilas <sup>5</sup>	0,1±0,1 <sup>c</sup>	0,5±0,1 <sup>bc</sup>	3,1±0,2 <sup>a</sup>	1,0±0,2 <sup>bc</sup>	0,5±0,0 <sup>bc</sup>	1,4±0,1 <sup>b</sup>
L	39,0±0,1 <sup>a</sup>	38,6±0,1 <sup>b</sup>	35,6±0,1 <sup>e</sup>	37,8±0,1 <sup>c</sup>	36,7±0,1 <sup>d</sup>	36,6±0,1 <sup>d</sup>
°Hue	113,0±0,5 <sup>d</sup>	108,0±0,6 <sup>e</sup>	140,3±1,3 <sup>a</sup>	122,4±0,4 <sup>c</sup>	110,9±1,1 <sup>d</sup>	126,6±0,4 <sup>b</sup>

Os resultados expressos em média ± desvio padrão. Medias seguida por letras iguais na mesma linha, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). <sup>1</sup>mg equivalente ácido gálico por kg<sup>-1</sup>; <sup>2,3</sup>mM trolox g<sup>-1</sup>; <sup>4</sup> mg β-caroteno kg<sup>-1</sup>; <sup>5</sup>mg kg<sup>-1</sup>.

Mello e Pinheiro (2012) afirmam que a capacidade antioxidante de azeites de oliva, é influenciada, entre outras classes de compostos, pela fração fenólica. Entretanto essa correlação foi moderada ( $R=0,43$   $p \leq 0,05$ ), visto que as cultivares Arbequina e Coratina que apresentaram maiores concentrações desses compostos, não obtiveram os maiores teores de atividade antioxidante medida pelos radicais ABTS e DPPH.

Além dos polifenóis e tocoferóis, os carotenoides fornecem estabilidade oxidativa ao azeite e também atuam como antioxidantes (FUENTESA, 2018). Foi observada correlação moderada ( $R=0,53$   $p \leq 0,05$ , carotenoides x DPPH) para a cultivar Arbosana a qual apresentou os maiores teores de carotenoides (15,7 mg β-caroteno kg<sup>-1</sup>). Esses resultados estão correlacionados à luminosidade ( $R= 0,85$   $p \leq 0,05$ , carotenoides x L) e ao ângulo Hue ( $R= 0,91$   $p \leq 0,05$ , Carotenoides x °Hue), obtendo tonalidade verde amarelado. Em contrapartida, a cultivar Arbequina apresentou os menores teores de carotenoides (3,8 mg de β-caroteno kg<sup>-1</sup>) e clorofilas (0,1 mg kg<sup>-1</sup>), obtendo luminosidade maior (39,0), porém °Hue menor (113,0), apresentando tonalidade amarelo esverdeado. Observou-se também forte correlação entre clorofilas, luminosidade e ° Hue, com valores de  $R= 0,80$  (clorofilas x L) e  $R= 0,91$  (clorofilas x °Hue).

A clorofila é fotossensibilizadora, podendo participar da fotoxidação e ocasionar a degradação do azeite se exposto à luz e oxigênio (TORRECILLA et al., 2015). Giuffrida et al. (2011) atribuíram as diferenças quantitativas de pigmentos entre as amostras de azeite às diferenças varietais, geográficas, índice de maturação, zona de produção, sistema de extração, e condições de armazenamento.

Borges et al. (2017) ao caracterizarem azeites de oliva extra virgem da cultivar Arbequina provenientes de nove regiões da Espanha e duas do Brasil (Rio Grande do Sul e Minas Gerais), relataram que os parâmetros de cor de azeites de oliva virgem estão fortemente correlacionados com os altos índices de precipitação, como ocorre no Brasil, o que propicia a produção de óleos de coloração menos esverdeada e amarelo pálido, diferentemente dos azeites espanhóis, produzidos em regiões mais secas. A diferença na composição fitoquímica dos azeites brasileiros pode ser explicado, entre outros fatores, pelas características geográficas e climáticas das áreas de produção, entre elas: latitude e longitude, altitude (m), temperaturas médias anuais (°C), chuvas anuais (mm) e temperaturas médias mínimas e máximas (°C). Dentre essas, as que mais se diferenciaram entre esses dois países foram a latitude variando de 37 – 41° (Espanha) e 22 e 30° (Brasil), longitude 0 – 6° (Espanha) e 42 e

52° (Brasil), altitude 47 – 905 (Espanha) e 88 e 1310 (Brasil) e chuvas anuais 293 – 677 (Espanha) e 1691 e 1330 (Brasil).

Giuffrida et al. (2011) estudaram a composição de clorofila e carotenoides em azeites de oliva virgem monovarietais cultivados em diferentes localidades da Itália (Sul e Centro). As variedades de azeites do Sul apresentaram alto teor de pigmentos, com tonalidade verde predominante.

Bruscatto et al. (2017) caracterizaram a composição química de azeites de oliva das variedades Arbequina, Coratina, Frantoio e Koroneiki produzidas no Sul do Brasil. A cultivar Coratina apresentou os maiores teores de compostos fenólicos (1,725.53 mg kg<sup>-1</sup> ácido gálico) e de carotenoides e clorofilas, 9.39 mg kg<sup>-1</sup> β-caroteno e 1.94 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, com valores superiores aos obtidos neste estudo.

#### 4 CONCLUSÃO

As cultivares Arbequina e Coratina apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos, havendo moderada correlação entre esses compostos e a atividade antioxidante, já a cultivar Arbosana apresentou os maiores índices de carotenoides, os quais foram correlacionados à atividade antioxidante. Carotenoides e clorofilas apresentaram forte correlação com o °Hue e a luminosidade. Diante disso, como todas cultivares foram produzidas nas mesmas condições edafoclimáticas pode-se concluir que há variabilidade nos azeites em função do seu genótipo que determinam a qualidade do azeite de oliva obtido.

#### 5 REFERÊNCIAS

AOCS. American Oil Chemists Society. Official and tentative methods of the American Oils Chemists Society, **Champaign**, Illinois, 1992.

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**, 62, p. 74-83, 2014.

BECCARIA, M., MORET, E., PURCARO, G., PIZZALE, L., COTRONEO, A., DUGO, P., MONDELLO, L., CONTE, L. S. Reliability of the ΔECN42 limit and global method for extra virgin olive oil purity assessment using different analytical approaches. **Food Chemistry**, v. 190, p. 216-225, 2016.

BORGES, T. H., PEREIRA, J. A., CABRERA-VIQUE, C., LARA, L., OLIVEIRA, A. F., & SEIQUER, I. Characterization of Arbequina virgin olive oils produced in different regions of Brazil and Spain: Physicochemical properties, oxidative stability and fatty acid profile. **Food Chemistry**, v. 215, p. 454-462, 2017.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M., BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 1, 30 de janeiro de 2012. Regulamento técnico do azeite de oliva e do óleo de bagaço de oliva. **Diário Oficial da União, Brasília**, DF, 01 fev. 2012, Seção 1, p. 5-8.

BRUSCATTO, M. H., ZAMBIAZI, R. C., CARDOSO, M. C., PIATNICKI, C. M.S., MENDONÇA, C. R. B. DUTRA, F. L. G., COUTINHO, E. F. Chemical characterization and oxidative stability of olive oils extracted from olive trees of Southern Brazil. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.52, n.12, p.1231-1240, dez. 2017.

CASABURI, I., PUOCI, F., CHIMENTO, A., SIRIANNI, R., RUGGIERO, C., AVENA, P., PEZZI, V. Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: A review of in vitro studies. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57 n.1, pp. 71 – 83, 2013.

CONSELHO INTERNACIONAL DE AZEITONA (COI). Norma comercial aplicável aos óleos de oliva e aos óleos de bagaço de azeitona. COI / T.15 / NC No. 3 / Rev. 11. 2016.

EPAMIG. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. **Azeite brasileiro tenta se impor em mercado dominado por importados**, Clipping. 2013. Disponível em: <<http://economia.uol.com.br/agronegocio/noticias/redacao/2013/12/19/azeite-brasileiro-tenta-se-impor-em-mercado-dominado-por-importados.htm>>. Acesso em: 06 de mar. 2018.

FUENTESA, E., PAUCARB, F., TAPIAC, F., ORTIZB, J., JIMENEZD, P., ROMEROB, 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.

GIUFFRIDA, D., SALVO, F., SALVO, A., COSSIGNANI, L., DUGO, G. Pigments profile in monovarietal virgin olive oils from various Italian olive varieties. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1119-1123, 2011.

LARA-ORTEGA, F. J., SAINZ-GONZALO, F. J., GILBERT-LÓPEZ, B., GARCIA-REVES, J. F., MOLINA-DÍAZ, A. Multicommuted flow injection method for fast photometric determination of phenolic compounds in commercial virgin olive oil samples. **Talanta**, v. 147, p. 531-536, 2016.

MELLO, L. D., PINHEIRO, M. F. Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. **Alim. Nutr.**, v. 23, n.4, p. 537-548, 2012.

PRÓ-OLIVA (2016). Políticas Públicas para Olivicultura no Rio Grande do Sul. **II Encontro Estadual e 2ª Reunião Técnica de Olivicultura**, 2016.

QUIRANTES-PINE, R., ZUREK, G., BARRAJON-CATALAN, E., BASMANN, C., MICOL, V., SEGURA-CARRETERO, A., FERNANDEZ-GUTIERREZ, A., A. metabolite-profiling approach to assess the uptake and metabolism of phenolic compounds from olive leaves in SKBR3 cells by HPLC–ESI/TOF- MS, **J. Pharmaceut. Biomed.**, 2013, 72, 121-126.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

RODRIGUES-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington: ILSI Press, 2001. 64p.

SINGLETON, V. L., ROSSI, J.A.JR. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.

ROMERO, N., SAAVEDRA, J., TAPIA, F., SEPÚLVEDA, B., APARICIO, R. Aparicio 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 n.2, pp. 583 – 592, 2016.

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.