

PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE AZEITES EXTRA VIRGEM MONOVARIETAIS PRODUZIDOS EM PINHEIRO MACHADO - RS

JULIA TORRES RAMALHO; ROSANE LOPES CRIZEL²; BRUNA CARDOZO³;
TANIZE ACUNHA⁴; ROGÉRIO DE OLIVEIRA JORGE⁵; FABIO CLASEN
CHAVES⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – juliaatorresr@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rosanecrizel1@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – brunah.cardozo9@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – tanizeacunha@gmail.com

⁵Embrapa Clima Temperado – rogerio.jorge@embrapa.br

⁶Universidade Federal de Pelotas, – fabio.chaves@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Atualmente são cultivadas em torno de 5.000 hectares de oliveiras no Brasil, sendo estas divididas em áreas localizadas nas regiões Sul e Sudeste. O Rio Grande do Sul, é o principal estado produtor com uma área cultivada de aproximadamente 3.500 hectares (Pró-oliva, 2016).

A produção de azeite nacional apresenta grande potencial de expansão. De acordo com dados estatísticos recentes do Conselho Oleícola Internacional – COI, o Brasil é um dos maiores mercados consumidores de produtos de oliveira (*Olea europaea* L.), o país importou nos últimos 5 anos uma média de mais de 60 mil toneladas/ano e foram produzidos em torno de 2,854 milhões de toneladas do óleo, sendo os países do continente europeu os maiores fornecedores seguidos da Argentina. Contudo a expansão da produção de azeitonas e azeite no país e todos os benefícios que podem ser gerados por esta atividade depende da capacidade de obtenção de azeites de qualidade. A qualidade dos azeites está relacionada a composição química destes produtos, a qual é influenciada pelas condições edafoclimáticas do local de cultivo das oliveiras e cultivar empregada, bem como pelo processamento pós-colheita (MELLO, 2012).

A composição dos azeites é formada majoritariamente por triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos livres, em menor proporção encontram-se pigmentos, compostos voláteis, polifenóis, tocoferóis, ceras e esteróis (BALLUS et al., 2014; DAIS; HATZAKIS, 2013). Entre estes, os compostos fenólicos desempenham um importante papel na qualidade dos azeites de oliva dado que influenciam no sabor e estabilidade oxidativa dos mesmos. Ademais os compostos fenólicos são uma classe de compostos amplamente conhecidos por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, por induzir apoptose em células cancerígenas e inibir a oxidação lipídica e com isso vários benefícios à saúde são atribuídos ao consumo de azeite de oliva (FRANCO et al., 2014; MEZA-MIRANDA et al., 2016). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da cultivar e safra de cultivo sobre a composição fenólica de azeites de oliva extra virgem monovarietais produzidos em Pinheiro Machado.

2. METODOLOGIA

Foram analisados azeites de oliva monovarietais das variedades Arbequina, Arbosana, Coratina, Frantoio, Koroneike e Picual das safras de 2017 e 2018, cultivadas no município de Pinheiro Machado, RS. 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. As amostras foram embaladas em fracos âmbar e transportadas até o Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LaCEM) da UFPEL.

Para a extração dos compostos fenólicos individuais utilizou-se uma técnica tradicionalmente empregada baseada na extração líquido-líquido (LLE). 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 procedeu-se com agitação lenta por mais 20 minutos. Logo após realizou-se a centrifugação do extrato a $7000 \times g$ a 4°C por 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante e submeteu-se ao processo de filtração através de uma membrana de *nylon* de $0,22 \mu\text{m}$ (AllCrom, St. Louis, Mo, EUA).

Para a quantificação dos compostos fenólicos empregou-se a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Dez microlitros do extrato foram injetados em um cromatógrafo a líquido (UFLC, Shimadzu) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução tipo quadrupolo-tempo de voo (Maxis Impact, Bruker Daltonics). Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna Luna C18 (Phenomenex), 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 $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ e a temperatura da coluna de 40°C . Para separação utilizou-se 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, manteve-se por 7 minutos nessa condição.

O espectrômetro de massas foi operado no modo negativo, com espectros adquiridos ao longo de uma faixa de massas de m/z 50 a 1200. Os parâmetros de aquisição foram: voltagem do capilar 4 kV, pressão do gás de nebulização (N_2) de 2 bar, gás de secagem em 8 L min^{-1} , 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 *p*-cumárico, ácido vanílico, ácido sirínico, apigenina, hidrotirosol, luteolina e tirosol foi realizada por comparação com padrões externos (Sigma Aldrich) e curvas de calibração foram utilizadas para quantificação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados nove compostos fenólicos nas amostras de azeites de oliva de ambas safras 2017 e 2018. Entre os ácidos fenólicos, foram identificados dois derivados do ácido hidroxibenzóico (ácido vanílico e ácido sirínico) e três derivados do ácido hidrocínâmico (ácido cafeico, ácido *p*-coumarico e ácido ferulico). No grupo dos flavonoides, foram identificadas duas flavonas, apigenina e luteolina. Além disso, dois álcoois fenólicos foram encontrados (hidroxitirosol e tirosol). Em ambas safras o tirosol foi o composto fenólico predominante em todas as cultivares avaliadas, sendo o azeite da cv. Arbequina o que mais continha este composto. Os flavonoides foram o segundo grupo de compostos mais abundantes e os azeites da cultivar Arbosana, em ambas safras, apresentaram o maior teor

de apigenina. Já para luteolina a maior concentração foi observada na cultivar Arbequina, independente do ano de cultivo.

A cultivar Arbequina apresentou maior teor de ácidos fenólicos em relação as outras cultivares avaliadas na safra de 2017, com exceção do ácido vanílico e ácido *p*-coumárico, os quais se apresentaram em maior concentração nas cultivares Arbosana e Picual, respectivamente. Na safra de 2018, foi observado o mesmo comportamento para o ácido ferúlico e ácido vanílico, quando a cultivar Arbequina apresentou maior concentração desses ácidos. Já os ácidos cafeico e siríngico estiveram em maior concentração na cultivar Koroneike.

O ano de cultivo influenciou a concentração dos compostos fenólicos dos azeites. Azeites produzidos na safra de 2018, independente da cultivar apresentaram maior teor de ácido cafeico, ácido siríngico e hidroxitirosol, em contrapartida azeites da safra de 2017 se destacaram pela maior concentração de tirosol (Tabela 1).

Tabela 1: Quantificação dos compostos fenólicos (mg kg⁻¹) em azeites extra virgem produzidos em Pinheiro Machado

Compostos	Ácido cafeico		Ácido ferúlico		Ácido <i>p</i> -coumárico	
	2017	2018	2017	2018	2017	2018
Arbequina	0,008±0,00Ba	0,95±0,01Ab	0,06±0,00Aa	0,05±0,00Ba	0,24±0,02Bb	0,38±0,00Aa
Arbosana	0,003±0,00Bc	0,55±0,01Ad	0,03±0,00Ab	0,02±0,00Bc	0,05±0,00Acd	0,03±0,00Be
Coratina	0,003±0,00Bc	0,42±0,00Af	0,03±0,00Ab	0,01±0,00Bd	0,08±0,00Ac	0,05±0,00Bd
Frantoio	0,001±0,00Bd	0,46±0,00Ae	0,02±0,00Ad	0,02±0,00Bc	0,02±0,00Ad	0,01±0,00Af
Koroneike	0,001±0,00Bd	2,27±0,00Aa	0,02±0,00Bd	0,04±0,00Ab	0,04±0,00Bd	0,09±0,01Ac
Picual	0,006±0,00Bb	0,62±0,02Ac	0,02±0,00Ad	0,01±0,00Bd	0,30±0,03Aa	0,32±0,00Ab
Compostos	Ácido siríngico		Ácido vanílico		Apigenina	
	2017	2018	2017	2018	2017	2018
Arbequina	0,43±0,03Ba	0,61±0,04Ab	0,20±0,02Bc	0,24±0,00Aa	1,89±0,09Bc	2,98±0,03Ab
Arbosana	0,06±0,00Bc	0,17±0,00Ae	0,25±0,02Ab	0,19±0,00Bc	6,61±0,54Aa	5,83±0,04Ba
Coratina	0,04±0,01Bc	0,37±0,04Ad	0,20±0,01Ac	0,06±0,00Be	0,56±0,02Ad	0,31±0,00Ae
Frantoio	0,09±0,00Bb	0,14±0,00Ae	0,26±0,02Ab	0,12±0,00Bd	0,88±0,08Ad	1,12±0,05Ad
Koroneike	0,06±0,00Bc	0,74±0,01Aa	0,13±0,01Bd	0,22±0,00Ab	3,64±0,37Ab	2,41±0,05Bc
Picual	0,10±0,00Bb	0,48±0,00Ac	0,31±0,05Aa	0,19±0,00Bc	1,08±0,08Ad	1,14±0,06Ad
Compostos	Hidroxitirosol		Luteolina		Tirosol	
	2017	2018	2017	2018	2017	2018
Arbequina	0,45±0,02Bc	1,21±0,03Ac	2,14±0,05Ba	2,39±0,21Aa	330,58±1,15Aa	44,98±0,61Bb
Arbosana	0,59±0,01Ac	0,37±0,00Ae	1,56±0,15Ab	1,32±0,01Bb	65,57±0,64Ad	27,71±0,01Be
Coratina	0,73±0,02Bb	1,74±0,01Ab	0,49±0,02Ae	0,47±0,02Ac	48,25±1,10Ae	33,51±0,25Bd
Frantoio	1,27±0,02Aa	0,38±0,00e	0,85±0,04Ad	0,58±0,02Bc	74,62±4,79Ac	49,63±1,45Ba
Koroneike	0,45±0,01Bc	1,89±0,04Aa	1,39±0,04Ac	1,24±0,01Bb	101,28±1,00Ab	38,50±0,12Bc
Picual	0,49±0,00Bc	0,67±0,01Ad	1,32±0,06Ac	1,29±0,04Ab	51,61±0,91Ae	33,43±0,06Bd

Resultados expressos em média ± desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na mesma linha são indicadas por letras maiúsculas diferentes. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na mesma coluna são indicadas por letras minúsculas diferentes.

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 (MELLO, 2012).

Conforme os dados, o tirosol obteve maior concentração em todas as cultivares estudadas possuindo maior teor na safra no ano 2017 em relação a safra seguinte. Os flavonóides é segundo grupo mais abundante no teor de compostos fenólicos. Os compostos fenólicos de azeites de oliva extra virgem (sigla do inglês EVOO) da cultivar arbequina de azeitonas de nove regiões da

Espanha (Granada, Jaén, Málaga, Cádiz, Sevilha, Albacete, Toledo, Valladolid e Lérida) e duas regiões do Brasil (Rio Grande do Sul e Minas Gerais) os flavonóides foram o principal grupo, apresentando variação de 93 a 36% do total (Borges et al., 2017).

O perfil de compostos fenólicos de diferentes cultivares (Arbequina, Koroneike, Manzanilha e Coratina), a cultivar Coratina cultivada no RS se destacou pela maior concentração de compostos fenólicos em relação as outras cultivares avaliadas (Ballus et al., 2015).

Neste estudo a cultivar Arbequina cultivada no RS apresentou maior concentração de tirosol que hidroxitirosol. O aumento de compostos fenólicos, dentre eles da oleuropeína e de hidroxitirosol têm como consequência o aumento da capacidade antioxidante em cultivares submetidas a algum tipo de estresse (Romani et al., 1999).

4. CONCLUSÕES

Foram identificados e quantificados por LC-MS nove compostos fenólicos no qual o composto predominante em todas as espécies avaliadas foi o álcool fenólico tirosol. A cultivar Arbequina foi a que apresentou maior teor de ácidos fenólicos. Estes resultados demonstram que a além do fator ambiental há contribuição genética para variabilidade de composição fenólica em azeites.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, BRUSCATTO, M. H., ZAMBIASI, 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. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.52, n.12, p.1231–1240, 2017.
- 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.
- FRANCO, N., GALEANO-DÍAZ, T., LÓPEZ, O., FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J., SÁNCHEZ, 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.
- MELLO, L. D., PINHEIRO, M. F. Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. **Alimentos e nutrição**, 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.
- ROMANI, A., MULINACCI, N., PINELLI, P., VINCIERI, F. F., CIMATO, A. Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.964–967, 1999.