



DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM AZEITE DE OLIVA

DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN OLIVE OIL

**FARIA-MACHADO, Adelia F.¹; WILHELM, Allan E.¹; ANTONIASSI,
Rosemar¹; SILVA, Rafaela P. D.²; BIZZO, Humberto R.¹**

¹ Embrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas, 29501 - Guaratiba. CEP: 23020-470, Rio de Janeiro-RJ, Brasil. E-mail: faria-machado@embrapa.br

² Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Rodovia BR 465 - Km 7 - Campus Universitário. CEP 23851-970, Seropédica-RJ, Brasil.

Resumo: Os compostos fenólicos presentes em azeite de oliva têm sido associados tanto às propriedades benéficas a saúde proporcionadas pelo consumo de azeite, como à estabilidade oxidativa e características sensoriais do azeite de oliva virgem, sendo que o conteúdo desses compostos em azeite sofre influência de fatores genéticos e agronômicos. Assim, a quantificação desses compostos em azeites de oliva virgem é importante para caracterização de azeites monovarietais e para dar suporte a estudos agronômicos relacionados à olivicultura. O presente trabalho teve como objetivo verificar se a etapa de extração de compostos fenólicos de azeite de oliva como descrita pelo método recomendado pelo International Olive Council (IOC) é suficiente para a recuperação desses compostos em azeite de oliva extra virgem. Os resultados obtidos mostraram que foi necessário adaptar o método de extração recomendado pelo IOC, com o aumento do tempo de agitação em vórtex e inclusão de uma segunda etapa de extração. O conteúdo total de compostos fenólicos encontrado no azeite analisado foi de 601 mg/kg, o que está de acordo com os resultados apresentados na literatura científica.

Palavras chave: azeite de oliva, biofenóis, método de extração, CLAE-DAD.

Abstract: Phenolic compounds present in olive oil have been associated to the healthy properties promoted by olive oil consumption, as well as to oxidative stability and sensorial characteristics of virgin olive oil, being the content of these compounds affected by genetic and agronomic factors. Therefore, phenolic compounds quantification is important both for monovarietal olive oil characterization and as support for agronomical studies related to olive culture. The objective of this study was verify if the extraction step of olive oil phenolic compounds, as described by International Olive Council (IOC) in its recommended method, is sufficient to recover these compounds from extra-virgin olive oil. The obtained results showed that the IOC extraction method needed to be adapted increasing the vortex time and adding a second extraction step. The total content of phenolic compounds found in the olive oil analyzed was 601 mg/kg, which is in agreement with results reported in scientific literature.

Key-words: olive oil, biophenols, extraction method, HPLC-DAD.

1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos presentes no azeite de oliva têm sido associados às propriedades benéficas à saúde atribuídas ao azeite, tais como redução do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, distúrbios neurológicos e câncer de mama. Por outro lado, esses compostos também estão associados à estabilidade

oxidativa e às características sensoriais (sabor e aroma) de azeites de oliva virgem (Frankel et al., 2013). Além disso, a composição de fenóis em azeite pode variar em função do tipo de cultivar, condições de cultivo e localização geográfica dos olivais (El Riachy et al., 2011; García-Gonzalez et al., 2010; Vinha et al., 2005).

Dessa forma, a quantificação desses compostos em azeites de oliva virgem é de grande interesse tanto para caracterização de azeites monovarietais produzidos comercialmente ainda não caracterizados, como dentro dos programas de melhoramento genético de oliveiras e estudos relacionados às práticas agronômicas na olivicultura, nos quais a EPAMIG e a Embrapa têm trabalhado nos últimos anos.

Para a quantificação de compostos fenólicos em azeite o método geralmente utilizado é aquele recomendado pelo IOC (International Olive Council) (COI/T.20/Doc nº 29, 2009), o qual se baseia em uma etapa de extração seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD). O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo verificar se a etapa de extração como descrita pelo método do IOC é suficiente para a recuperação dos compostos fenólicos presentes em azeite de oliva extra virgem.

2. MATERIAL E MÉTODO

Amostras de azeite de oliva extra virgem foram obtidas no comércio local. Padrões de ácido siríngico, tirosol e oleuropeína, pureza $\geq 95\%$, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

A análise de compostos fenólicos foi realizada com base no método recomendado pelo IOC (COI/T.20/Doc nº 29, 2009), com modificação na etapa de extração a qual originalmente consiste em 1 etapa de agitação em vórtex durante 1 min seguida de agitação em ultrassom por 15 min, na presença de 5 mL de solução extratora (metanol/água 80:20), utilizando 2 g de amostra. Inicialmente os compostos fenólicos foram extraídos com 1, 3 e 5 min de agitação no vórtex. Após a definição do tempo de extração no vórtex, 2 g de azeite de oliva foram submetidos à extração com 5 mL de solução extratora e após centrifugação e coleta do sobrenadante, o material foi submetido a uma segunda etapa de extração utilizando mais 5 mL de solução extratora. Os extratos da primeira e da segunda extração foram coletados em separado e submetidos à análise cromatográfica.

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Waters Alliance (Milford, EUA), modelo 2695, equipado com sistema de bombeamento quaternário, desgaseificador *on-line*, sistema de injeção automática com válvula Rheodyne (Rheodyne LCC, Rohnert Park, EUA), forno externo para controle de temperatura na coluna e detector de arranjo de diodos modelo 2998 (Waters). Os dados foram adquiridos e processados utilizando o software Empower 2 (Waters). Os espectros de UV foram obtidos entre 200 e 400 nm e os cromatogramas foram processados a 280 nm. Os compostos fenólicos foram separados em coluna de C₁₈ X-Bridge (3,5 μ m, 150 \times 3,0 mm d.i., Waters), utilizando como fase móvel gradiente linear de solução aquosa de ácido fórmico 0,4 %_v/ acetonitrila/metanol na proporção inicial (96:2:2), seguindo para (50:25:25) em 50 min e em seguida para 0:50:50 em mais 5 min, mantendo essa proporção por mais 2 min, com fluxo de 0,4 mL/min e temperatura na coluna de 35 °C.

A definição da faixa onde ocorre a eluição dos compostos fenólicos foi realizada por meio da comparação com padrões analisados nas mesmas condições, verificação dos espectros de UV dos picos cromatográficos e comparação com os dados apresentados no método do IOC. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada considerando o somatório de área dos picos cromatográficos correspondentes aos

compostos fenólicos, utilizando ácido siríngico como padrão interno e uma solução de ácido siríngico e tirosol para calibração externa, conforme descrito no método do IOC.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1A ilustra o cromatograma obtido na análise de compostos fenólicos presentes em azeite de oliva extra virgem comercial, onde os compostos fenólicos eluem entre 8,0 e 55,5 min, sendo que o pico cromatográfico com t_R 8,5 min foi atribuído ao hidroxitirosol por comparação com padrões e dados do COI/T.20/Doc n° 29 (IOC, 2009), considerando espectro de absorção no UV e ordem de eluição em fase reversa. O último pico atribuído a composto fenólico (t_R 55,5 min) foi definido considerando espectro de absorção no UV e comparação com os dados apresentados pelo IOC no método COI/T.20/Doc n° 29 (IOC, 2009).

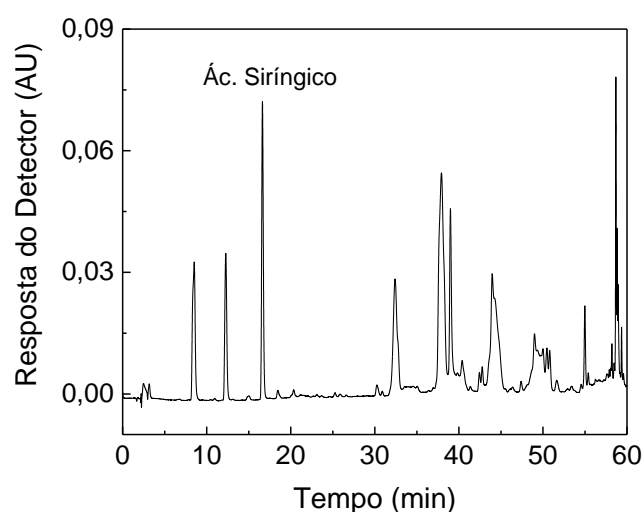


Figura 1 – Cromatograma obtido para os compostos fenólicos presentes em azeite de oliva extra virgem (1ª extração), processado a 280 nm. Demais condições cromatográficas, ver item 2 (material e método).

Na avaliação do tempo de agitação em vórtex, os extratos obtidos com 1, 3 e 5 min foram analisados por CLAE-DAD e, para comparação, foi considerado o somatório das áreas dos picos cromatográficos correspondentes aos compostos fenólicos corrigido pela massa de amostra utilizada na extração. Os resultados obtidos demonstraram que o aumento no tempo de agitação em vórtex permitiu um aumento de cerca de 2 vezes no somatório de áreas, indicando uma melhora considerável na eficiência de extração. Assim, ficou definido o tempo de 5 min de agitação em vórtex para as análises subsequentes.

Na avaliação das duas etapas de extração, os compostos fenólicos foram quantificados em uma amostra de azeite de oliva extra virgem comercial, analisada em triplicata. Os resultados obtidos (Tabela 1) mostram que o conteúdo de compostos fenólicos obtido na segunda extração representou cerca de 46 % do conteúdo extraído na primeira extração, indicando que uma etapa de extração apenas, como recomendado pelo IOC, não é suficiente para extração quantitativa dos compostos fenólicos presentes em azeite de oliva.

Tabela 1 – Conteúdo de compostos fenólicos em azeite de oliva extra virgem submetido a duas etapas de extração.

Conteúdo de Compostos Fenólicos (mg/kg)	
Extração 1	323,9 ± 32,2 ^a
Extração 2	277,0 ± 10,5
Total	600,9 ± 21,9

^a Média ± desvio padrão de análise em triplicata.

Dessa forma, recomenda-se que sejam realizadas pelo menos duas etapas de extração, combinando os dois extratos para a determinação do conteúdo de compostos fenólicos em azeite de oliva. Uma terceira etapa de extração pode ser considerada e necessita ser avaliada quanto a sua contribuição para extração quantitativa.

O conteúdo total de compostos fenólicos encontrado no azeite analisado está na mesma faixa dos teores relatados na literatura para amostras de azeite de oliva virgem (Brenes et al., 1999; Carrasco-Pancorbo et al., 2009; Garcia et al., 2012; García-González et al., 2010).

4. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou a necessidade de adaptação do método de análise de compostos fenólicos em azeite de oliva recomendado pelo IOC em relação à extração dos analitos de interesse, sendo recomendado o aumento do tempo de agitação em vórtex antes da agitação em ultrassom para pelo menos 3 min. Além disso, uma segunda etapa de extração mostrou-se necessária para a recuperação dos compostos fenólicos presentes no azeite. Como continuidade deste trabalho, sugere-se a avaliação da necessidade e viabilidade de uma terceira etapa de extração, bem como a verificação de parâmetros de validação do método.

5. REFERÊNCIAS

- BRENES, M. et al. Phenolic compounds in spanish olive oils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 3535-3540, 1999.
- CARRASCO-PANCORBO, A. et al. Use of capillary electrophoresis with UV detection to compare the phenolic profiles of extra-virgin olive oils belonging to Spanish and Italian PDOs and their relation to sensorial properties. **J. Sci. Food Agric.**, v. 89, p. 2144-2155, 2009.
- EL-RIACHY, M. et al. Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 2: Biosynthesis and biotransformation of phenolic compounds in virgin olive oil as affected by agronomic and processing factors. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 113, p. 692-707, 2011.
- FRANKEL, E. et al. Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols. **J. Agric. Food Chem.**, v. 61, p. 5179-5188, 2013.
- GARCIA, B. et al. Potential of selected Portuguese cultivars for the production of high quality monovarietal virgin olive oil. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 114, p. 1070-1082, 2012.

GARCÍA-GONZÁLEZ, D. L. et al. Quality characterization of the new virgin olive oil var. Sikitita by phenols and volatile compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 8357-8364, 2010.

IOC – International Olive Council. **Determination of biophenols in olive oils by HPLC**. COI/T.20/Doc n° 29, 2009.

VINHA, A. F. et al. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): influences of cultivar and geographical origin. **Food Chem.**, v. 89, p. 561-568, 2005.