

Antioxidantes em azeites 'Galega' e 'Azeiteira' provenientes de frutos obtidos em duas épocas de colheita

F. Peres, A. Nunes, C. Vitorino, C. Gouveia & L. Henriques

Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Quinta Senhora de Mércules, IPCB, Apartado 119, 6001-909 Castelo Branco, Portugal, fperes@esa.ipcb.pt

Resumo

No presente trabalho são determinados os biofenóis em azeites 'Galega' e 'Azeiteira' obtidos em duas épocas de colheita dos frutos e olivais em produção integrada. A separação da fracção fenólica foi feita por extracção líquido-líquido (ELL) e a análise dos compostos fenólicos obtida por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com detecção por díodos (DAD). São também determinados: os tocoferóis por HPLC e fluorescência (FLD); os biofenóis totais por espectroscopia VIS; e a intensidade do sabor amargo (K_{225}) por espectroscopia UV.

Os azeites 'Galega' e 'Azeiteira' apresentam teores mais elevados de antioxidantes na colheita mais temporã indicando que – do ponto de vista nutricional, sensorial e da estabilidade deste alimento – não é benéfico retardar a época de colheita.

O hidroxitirosol e a luteolina decrescem acentuadamente na segunda data de colheita para os azeites de cultivar 'Azeiteira'. Os azeites 'Galega' apresentam teores mais elevados de α -tocoferol e γ -tocoferol.

Palavras-chave: compostos fenólicos, azeite virgem, maturação, tocoferóis, HPLC.

Abstract

Antioxidants in 'Galega' and 'Azeiteira' olive oils from fruits of two harvest times

The present paper evaluates the content of biophenols in 'Galega' and 'Azeiteira' virgin olive oils for two harvest times, in olive groves submitted to Integrated Production. Chromatographic separation was performed by liquid-liquid extraction (LLE) and analysis carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) and diode array detector (DAD). Tocopherols content was evaluated by HPLC and fluorescence detector (FLD); total biophenols by VIS spectroscopy; and intensity of bitter taste (K_{225}) by UV spectroscopy.

'Galega' and 'Azeiteira' olive oils showed higher antioxidant contents for earlier stages of ripening indicating that retarding the harvest has no practical advantages on what concerns nutritional, sensory and food stability.

Hydroxytyrosol and luteolin contents decrease in the second harvest time for 'Azeiteira' olive oil. 'Galega' virgin olive oils showed higher contents of α -tocopherol and γ -tocopherol.

Keywords: phenol compounds, virgin olive oil, ripening, tocopherols, HPLC.

Introdução

Os componentes menores do azeite virgem incluem diversos esteróis, alcoóis alifáticos e triterpénicos, hidrocarbonetos, compostos voláteis e antioxidantes. Os principais compostos antioxidantes do azeite virgem são fenóis. A actividade dos fenóis está relacionada com a estabilidade oxidativa do azeite e com a intensidade do seu sabor amargo (Servili et al., 2004). Os fenóis lipofílicos – os tocoferóis – ocorrem vulgarmente em outros óleos vegetais; os fenóis hidrofílicos – aqui designados por biofenóis – são específicos do azeite e constituem um grupo de metabolitos secundários com importantes propriedades sensoriais e nutricionais. De acordo com diversos estudos, a cultivar e o estado de maturação das azeitonas constituem os dois factores preponderantes do teor de biofenóis nos azeites virgens obtidos de frutos são (Aparício & Morales, 1998; Servili et al., 2004; Beltran et al., 2005).

A análise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) para determinar fenóis em azeites e a sua separação em diversas classes de compostos fenólicos (ácidos fenólicos, alcoóis fenólicos, flavonóides, secoridoides e lignanos) tem sido objecto de numerosos estudos e revisões (Hrncirik & Fritsche, 2004; Bendini et al., 2007).

O presente trabalho determina o teor em antioxidantes – biofenóis e tocoferóis – de azeites monovarietais produzidos a partir de frutos colhidos em duas épocas de colheita (dois estados de maturação distintos) por HPLC. Apresenta ainda os valores das absorvâncias a 225 nm, reconhecidos vulgarmente por intensidade do sabor amargo.

Material e Métodos

Foram seleccionados para este estudo dois olivais em Produção Integrada, um localizado na região de Azeite da Beira Baixa DOP, de cultivar 'Galega Vulgar' (olival de seis anos), e um localizado na região de Azeites do Norte Alentejano DOP (olival de cerca de 40 anos) de cultivar 'Azeiteira'.

O presente estudo reporta-se a três anos de produção: 2004, 2005 e 2006. Em cada campanha procedeu-se a duas recolhas de frutos: uma no final do mês de Outubro e outra em Novembro, cerca de 15 dias após a primeira recolha. A época de colheita foi decidida de acordo com o índice de maturação das azeitonas (IM > 3,5) e a estabilização do teor em gordura (ms). A extracção de azeite foi realizada em sistema OLIOMIO 50.

As determinações analíticas seguiram diversas metodologias.

A determinação de biofenóis totais fez-se por extracção líquido-líquido (ELL) e quantificação por espectroscopia VIS, utilizando reagente de Folin Ciocalteau.

A avaliação da absorvância a 225 nm (K_{225}) obteve-se por extracção dos compostos fenólicos em fase sólida com colunas C_{18} e leitura espectrofotométrica do extracto a 225 nm (Gutiérrez-Rosales et al., 1992).

Os tocoferóis foram determinados por HPLC (NP-HPLC), em cromatógrafo Agilent 1100 Series com detecção por fluorescência (excitação a 290 nm e emissão a 330 nm), coluna Lichrosorb Si 60 (5 μ m), volume de injeção 20 μ l, eluição isocrática com n-hexano e 2-propanol (99,5:0,5 v/v), fluxo 1,2 ml/min e quantificação por padrão externo.

Os biofenóis foram analisados por HPLC. A extracção fenólica foi feita por ELL com base no procedimento descrito por Montedoro et al. (1992), contudo com concentração das amostras em Speedvac®, modelo SPD121P (Thermo Savant). O extracto fenólico foi solubilizado com 2 ml de metanol e filtrado com filtros Acrodisc® 0,45 μ m, 25 mm (Pall Gelman Laboratory). A análise foi conduzida em cromatógrafo Agilent 1100 Series, detector de díodos (DAD), $\lambda = 278$ nm, coluna Purospher® STAR RP-18 (Merck), 250 mm x 4 mm, volume de injeção de 20 μ l e fluxo de 1,0 ml/min. A fase móvel foi constituída por: solvente A, 0,2% de ácido acético em água (pH=3,1); solvente B, metanol; eluição com gradiente de concentração. Foram quantificados 8 compostos fenólicos por padrão externo.

No tratamento dos resultados foi utilizado o procedimento General Linear Models do programa SPSS 16 para Windows.

Em 2006, não houve produção de azeite 'Azeiteira'. As análises de biofenóis por HPLC foram efectuadas apenas para azeites da época 2005.

Resultados e Discussão

Todos os azeites do presente estudo foram classificados como azeites virgem extra face ao Regulamento (CE) N.º1989/2003 (valores médios: acidez <0,4 g/100 g; Índice de Peróxido <13 meq O_2 kg^{-1} ; K_{270} <0,150 e K_{232} <1,78; ausência de defeitos sensoriais e intensidade de frutado >3,6).

A figura 1 apresenta os resultados globais (3 campanhas) dos teores de biofenóis totais dos azeites 'Azeiteira' e 'Galega' nas colheitas de Outubro e Novembro, com índices de maturação médios de 4 e 5. Observa-se teores menores na época de Novembro e o decrescimento é maior nos azeites 'Azeiteira'.

A figura 2 apresenta os resultados da intensidade do sabor amargo (K_{225}). Estes valores observam uma correspondência evidente com os teores de biofenóis totais: são inicialmente mais elevados nos azeites 'Azeiteira' e decrescem de Outubro para Novembro mais acentuadamente nestes azeites. Não foram atingidos valores de $K_{225} > 0,360$, valor referido por Gutiérrez-Rosales et al. (1992), como correspondentes a azeites extremamente amargos, preteridos pela maioria dos consumidores.

O quadro 1 revela que os azeites 'Galega' são mais ricos em tocoferóis que os azeites Azeiteira, distinguindo-se significativamente entre si ($P < 0,001$) pelos teores de alfa e gama tocoferol. A evolução destes antioxidantes não depende tanto da época de colheita como dependem os teores de biofenóis, resultados também obtidos por outros autores (Gimeno et al., 2002).

As figuras 3 e 4 mostram cromatogramas HPLC de biofenóis de dois azeites 'Azeiteira' obtidos nos dois momentos distintos de maturação. Pode observar-se mais picos cromatográficos e uma maior área para a maioria dos mesmos na colheita de Outubro.

O quadro 2 apresenta os resultados relativos aos teores dos diferentes biofenóis quantificados; os teores de hidroxitirosol, tirosol e luteolina distinguem significativamente ($P < 0,05$) os azeites 'Galega' e 'Azeiteira' e diminuem com o aumento da maturação; resultado oposto foi obtido por Brenes et al. (1999). Nos azeites Azeiteira verifica-se a diminuição mais acentuada de hidroxitirosol, composto fenólico de grande importância para a saúde humana (Boskou et al., 2005; Bendini et al., 2007).

O presente estudo corrobora a importância da época de colheita e consequentemente do estado de maturação da azeitona como um factor que influencia claramente as características nutricionais e sensoriais do azeite virgem. A menor quantidade de antioxidantes fenólicos para colheitas mais tardias indica que não há qualquer vantagem em protelar a época de colheita da azeitona, a partir do momento em que a biossíntese de toda a gordura foi atingida.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Medida 8.1 do Programa Agro, Projecto 463: "Segurança e qualidade alimentar em produtos do olival". Os autores agradecem aos membros da equipa do projecto que colaboraram na colheita de amostras, nomeadamente J.Coutinho, C. Amaro e P. Fragoso.

Referências

- Aparicio, R. & Morales, M.T. 1998. Characterization of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.*, 46:1116-1122.
- Beltrán, G., Aguilera, M., Del Riob, P.C., Sanchez, S. & Martinez, L. 2005. Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of hojiblanca virgin olive oils. *Food Chemistry* 89:207-215.
- Bendini, A., Cerretini, L., Carrasco-Pancorbo, A., Caravaca, A.M.G., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. & Lercker, G. 2007. Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, 12:1679-1719.
- Boskou, D., Blekas, G. & Tsimidou, M. 2005. Phenolic compounds in olive oil and olives. *Curr. Topics Nutraceutical Res.*, 3:125-136

- Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., Rios, J.J. & Garrido, A. 1999. Phenolic compounds in spanish olive oils. *J. Agric. Food Chem.*, 47:3535-3540.
- Gimeno, E., Castellote, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., De la Torre, M.C. & López-Sabater, M.C. 2002. The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, α -tocopherol, and β -carotene) in virgin olive oil. *Food Chem.*, 78:207-211.
- Gutiérrez-Rosales, F., Perdiguero, S., Gutiérrez, R. & Olias, J.M. 1992. Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69:1558-9331.
- Hrnčirik, K. & Fritsche, S. 2004. Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Eur. J. of Lipid Sci. and Tech.*, 106:540-549.
- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M. & Miniati, E. 1992. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by hplc. *J. Agric. Food Chem.*, 40:1571-1576.
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G.F. & Morozzi, G. 2004. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J. Chromatogr. A*, 1054:113-127.

Quadro 1 - Teores em tocoferóis (mg kg⁻¹) nas 3 campanhas. (Valores médios \pm desvio padrão).

Cultivar	Época de Colheita	Alfa-Tocoferol	Beta-tocoferol	Gama-tocoferol
'Azeiteira'	Out (IM= 4)	134,4 \pm 9,74	1,0 \pm 0,36	1,3 \pm 0,43
	Nov (IM= 5)	114,9 \pm 38,73	1,7 \pm 0,19	2,5 \pm 1,63
'Galega'	Out (IM= 4)	147,8 \pm 11,47	1,5 \pm 0,60	6,7 \pm 1,12
	Nov (IM= 5)	150,6 \pm 16,80	2,4 \pm 1,16	6,4 \pm 1,88

Quadro 2 - Teores em biofenóis (mg kg⁻¹) na campanha de 2005. (Valores médios ± desvio padrão).

	Galega Out	Galega Nov	Azeiteira Out	Azeiteira Nov
Hidroxitirosol	1,47 ± 0,058	1,22 ± 0,052	5,60 ± 0,092	2,69 ± 0,078
Tirosol	5,61 ± 0,242	5,66 ± 0,244	11,19 ± 0,305	10,38 ± 0,315
Ác. vanílico	0,26 ± 0,013	0,44 ± 0,019	0,39 ± 0,010	0,35 ± 0,015
Vanilina	0,11 ± 0,004	0,18 ± 0,005	0,09 ± 0,014	0,09 ± 0,014
Ác. <i>p</i> -cumárico	0,17 ± 0,007	0,21 ± 0,010	0,32 ± 0,005	0,77 ± 0,046
Ác. <i>o</i> -cumárico	0,23 ± 0,049	0,20 ± 0,003	0,67 ± 0,028	0,11 ± 0,012
Ác. cinâmico	0,28 ± 0,051	0,10 ± 0,009	0,04 ± 0,017	0,12 ± 0,012
Luteolina	1,49 ± 0,156	1,22 ± 0,089	5,01 ± 0,702	1,49 ± 0,147
Apigenina	0,98 ± 0,122	1,29 ± 0,182	1,36 ± 0,008	1,65 ± 0,176

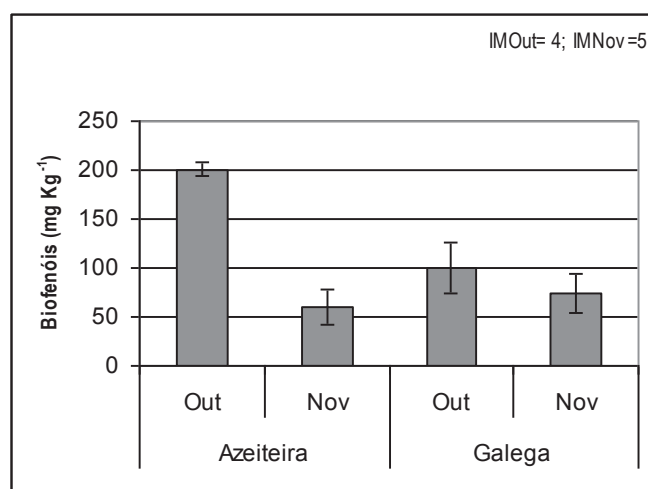


Figura 1- Teores de biofenóis totais (mg kg⁻¹) nas 3 campanhas. (Valores médios ± desvio padrão)



Figura 2 - Absorvâncias a 225 nm (K_{225}) nas 3 campanhas.
(Valores médios \pm desvio padrão)

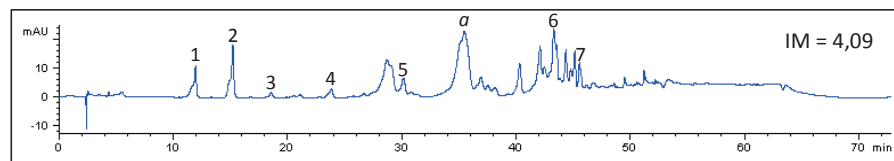


Figura 3 - Cromatograma de um azeite 'Azeiteira', Outubro de 2005, $\lambda = 278$ nm. 1 - hidroxitirosol; 2 - tirosol; 3 - ácido vanílico; 4 - ácido p-cumárico; 5 - ácido o-cumárico; a - desconhecido; 6 - luteolina; 7 - apigenina.

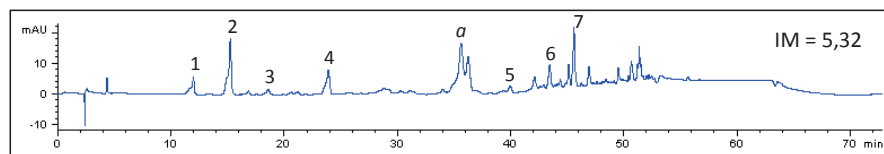


Figura 4 - Cromatograma de um azeite 'Azeiteira', Novembro de 2005, $\lambda = 278$ nm. 1 - hidroxitirosol; 2 - tirosol; 3 - ácido vanílico; 4 - ácido p-cumárico; a - desconhecido; 5 - ácido cinâmico; 6 - luteolina; 7 - apigenina.